



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA COVID-19 Y SU CORRELACIÓN CON EL VALOR
Ct DE LA RT-PCRq EN CASOS POSITIVOS A SARS-CoV-2 DETECTADOS EN EL
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR-DIRESA CAJAMARCA

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el título de Segunda Especialidad en Genética y Biología

Molecular

Autor:

Quiroz Ruiz, Hans Ramón

Asesor:

Chimoy Effio, Pedro Jorge

(ORCID: 0000-0003-1782-077X)

Jurado:

Bohórquez Meza, Isabel Doris

Velarde Vilchez, Mónica Margarita

Mayanga Herrera, Ana Lucia

Lima - Perú

2021

Referencia:

Quiroz, H. (2021). *Clasificación clínica de la COVID-19 y su correlación con el valor Ct de la RT-PCRq en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el Laboratorio de Biología Molecular-DIRESA Cajamarca* [Tesis de segunda especialidad, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5621>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA COVID-19 Y SU CORRELACIÓN CON EL VALOR Ct DE LA RT-PCRq EN CASOS POSITIVOS A SARS-CoV-2 DETECTADOS EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR- DIRESA CAJAMARCA

**Línea de investigación:
Genética, bioquímica y biotecnología**

Tesis para optar el título de Segunda Especialidad en Genética y Biología Molecular

Autor:

Quiroz Ruiz, Hans Ramón

Asesor:

Chimoy Effio, Pedro Jorge
(ORCID: 0000-0003-1782-077X)

Jurado:

Bohórquez Meza, Isabel Doris
Velarde Vilchez, Mónica Margarita
Mayanga Herrera, Ana Lucia

Lima-Perú
2021

Dedicatoria

A mi madre, siempre; más que nunca.

Agradecimientos

A Dios.

Agradezco al estimado Dr. Prof. Pedro Jorge Chimoy Effio,
por su orientación y por el apoyo brindado como asesor de esta tesis.

Al Dr. Joaquín Vértiz Osos,
por la orientación en la estadística de la tesis.

Al Master. Jorge Enrique Bazán Mayra,
por las autorizaciones para ejecutar esta tesis en el LRRSP-Cajamarca.

Agradezco de manera muy especial a Fiorella Hernández Palomino.

A los colegas del LRRSP-Cajamarca.

Al Blgo. Epid. Marco Antonio Bustamante Contreras.

A mis familiares por el apoyo.

A todos ellos, muchas gracias.

Índice general

Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
I. Introducción.....	1
1.1.Descripción y formulación del problema.....	1
1.2.Antecedentes.....	2
1.3.Objetivos.....	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos.....	5
1.4.Justificación.....	6
1.5.Hipótesis.....	6
II. Marco teórico.....	7
2.1.Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	7
III. Método.....	16
3.1.Tipo de investigación.....	16
3.2.Ámbito temporal y espacial.....	16
3.3.Variables.....	17
3.4.Población y muestra.....	18
3.5.Instrumentos.....	20
3.6.Procedimientos.....	21
3.7.Análisis de datos.....	24
3.8.Consideraciones éticas.....	24
IV. Resultados.....	26
V. Discusión de resultados.....	38
VI. Conclusiones.....	44
VII. Recomendaciones.....	45
VIII. Referencias.....	46
IX. Anexos.....	57

Índice de tablas

Tabla 1. Contraste del valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19.....	29
Tabla 2. Contraste del valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19, acorde al rango etario.....	31
Tabla 3. Contraste del valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19, acorde al sexo.....	32
Tabla 4. Contraste del valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19, acorde con el escenario laboral.....	34
Tabla 5. Contraste del valor Ct con los signos/síntomas de los casos positivos a COVID-19.....	35
Tabla 6. Contraste del valor Ct con las comorbilidades/factores de los casos positivos a COVID-19.....	37

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de funcionamiento de las Sondas Taqman.....	8
Figura 2. Cinética de la amplificación en una RT-PCRq.....	10
Figura 3. Estructura del genoma de SARS-CoV-2.....	12
Figura 4. Modelo externo de la estructura del SARS-CoV-2.....	13
Figura 5. Flujograma para selección de casos elegibles y su clasificación clínica al momento de la toma de muestra.....	20
Figura 6. Programa térmico de la RT-PCRq usando el kit Zybio.....	22
Figura 7. Gráficas de amplificación para muestras positivas y negativas a SARS-CoV-2.....	26
Figura 8. Rangos del valor Ct y su correspondencia con la carga viral, calculados mediante el estimador bponderado de Tukey.....	27
Figura 9. Distribución de la carga viral determinada por el valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19.....	28
Figura 10. Distribución de la carga viral determinada por el valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19, acorde con su rango etario.....	30
Figura 11. Distribución de la carga viral determinada por el valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19 acorde al sexo.....	32
Figura 12. Distribución de la carga viral determinada por el valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19 acorde a la condición de trabajador de salud.....	33

Índice de anexos

Anexo A. Clasificación clínica de la COVID-19 según normativa en Perú.....	58
Anexo B. Ficha de investigación clínico epidemiológica de COVID-19.....	59
Anexo C. Kit de extracción viral y preparación de buffers para el uso en Opentrons.....	61
Anexo D. Componentes y preparación del kit de amplificación Zybio (SARS-CoV-2).....	65
Anexo E. Fases generales del proceso en el Laboratorio de Biología Molecular.....	66
Anexo F. Autorización de la unidad de investigación Diresa Cajamarca.....	67
Anexo G. Autorización del Laboratorio de Referencia Regional Diresa Cajamarca.....	68
Anexo H. Aprobación del comité institucional de ética en investigación.....	69
Anexo I. Matriz de consistencia.....	70

Resumen

Introducción: El valor Ct de la RT-PCRq se asocia inversamente con la carga viral relativa respecto a una secuencia diana, este valor se ha relacionado con la progresión de los cuadros clínicos en infecciones respiratorias virales, cobrando importancia en el marco de la pandemia de COVID-19. **Objetivos:** Determinar el grado de correlación entre la clasificación clínica de la COVID-19 y el valor Ct, así mismo estratificar las características epidemiológicas según el valor Ct en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Dirección Regional de Salud Cajamarca. **Métodos:** Se realizó un estudio observacional correlacional de corte transversal. Se utilizó un kit comercial para detección del gen N del SARS-CoV-2 mediante RT-PCRq. La clasificación clínica (leve, moderado, severo) y las características epidemiológicas se establecieron al momento de la toma de muestra; los rangos de Ct se establecieron con un estimador robusto. Se contrastaron las variables de interés con el valor Ct. **Resultados:** Se encontró correlación significativa ($p=0.002$) inversa débil (rho de Spearman = -0.117), entre el valor Ct y la clasificación clínica. Se demostró que el sexo, la edad (menor a 65 años), la fiebre, el escalofrío, la diarrea, la anosmia y el sobrepeso-obesidad estuvieron asociadas significativamente al valor Ct. **Conclusiones:** Debido a la correlación inversa entre el valor Ct y la clasificación clínica de la Covid-19, los resultados indican que a menor valor Ct (mayor carga viral) se espera una clasificación de mayor severidad en los casos positivos a SARS-CoV-2.

Palabras clave: infecciones por coronavirus, SARS-CoV-2, carga viral, reacción en cadena de la polimerasa, umbral de ciclo.

Abstract

Introduction: The Ct value of the RT-PCRq is inversely associated with the relative viral load with respect to a target sequence, this value has been related to the progression of clinical presentation in viral respiratory infections, gaining importance in the context of the COVID-19 pandemic. **Objective:** To determine the degree of correlation between the clinical classification of COVID-19 and the Ct value, also to stratify the epidemiological characteristics according to the Ct value in positive cases for SARS-CoV-2 detected in the Molecular Biology Laboratory of the Cajamarca Regional Health Office Director. **Methods:** A cross-sectional correlational observational study was carried out. A commercial kit was used to detect the N gene of SARS-CoV-2 by RT-PCRq. The clinical classification (mild, moderate, severe) and the epidemiological characteristics were established at the time of sample collection; the Ct ranges were established with a robust estimator. The variables of interest were contrasted with the Ct value. **Results:** We found a significant correlation ($p = 0.002$) weak inverse (Spearman's $\rho = -0.117$), between the Ct value and the clinical classification. It was shown that sex, age (under 65 years), fever, chills, diarrhea, anosmia, and overweight-obesity were significantly associated with the Ct value. **Conclusions:** Due to the inverse correlation between the Ct value and the clinical classification of Covid-19, the results indicate that the lower the Ct value (higher viral load) there would be a greater severity in SARS-CoV-2 positive cases.

Keywords: coronavirus infections, SARS-CoV-2, viral load, polymerase chain reaction, cycle threshold.

I. INTRODUCCIÓN

Existen distintos tipos de coronavirus con capacidad de infectar a humanos, sin embargo, en diciembre de 2019, en China se identificó un nuevo coronavirus (2019-nCoV), denominado SARS-CoV-2, este virus causa la enfermedad denominada COVID-19 y que actualmente es una pandemia de gran impacto en la salud Pública (Alonso et al., 2020; World Health Organization, 2020).

Las cifras actuales reportadas por Johns Hopkins University, indican números superiores a 220 millones de casos y más de 4 millones de muertes en el mundo relacionadas a la COVID-19 (Center for Systems Science and Engineering, 2021). Por otra parte, las cifras en Perú no son nada alentadoras, los últimos datos indican la existencia de más de 2 153 092 casos positivos y 198 420 fallecidos a causa de esta enfermedad (Ministerio de Salud, 2020a).

Debido a la necesidad de intervenciones sanitarias inmediatas para la detección del virus, se han desarrollado distintas metodologías; sin embargo, las pruebas de PCR con transcripción reversa en tiempo real (RT-PCRq) son las de primera elección para detección del SARS-CoV-2 (Tang et al., 2020); a pesar de esto, se ha descrito que el método RT-PCR tiene limitaciones para evaluar la carga viral y relacionarla con el pronóstico y progresión de la COVID-19 (Yu, F et al., 2020)

1.1. Descripción y formulación del problema

Ante esta limitación de la RT-PCRq para evaluar carga viral y relacionarla con el pronóstico de la enfermedad, algunos estudios han propuesto que el umbral de ciclo (Ct), con capacidad semicuantitativa podría determinar la carga viral del SARS-CoV-2 en una RT-PCR en tiempo real, diversos autores proponen que este valor podría ser útil para predecir el pronóstico, así como el curso de la enfermedad en los pacientes, se ha propuesto que el valor Ct podría ser

usado para orientar intervenciones con pacientes tanto a nivel clínico, como intervenciones sanitarias enfocadas desde la salud pública (Rao et al., 2020; Magleby et al., 2020); sin embargo, la asociación del valor Ct con distintos factores como pronósticos y manifestaciones clínicas no está del todo clara; es por esta situación planteamos la presente investigación con la finalidad de determinar si existe correlación entre la clasificación clínica de la COVID-19 y el valor Ct del RT-PCRq en los casos positivos a SARS-CoV-2, que hayan sido detectados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Dirección Regional de Salud (Diresa) Cajamarca, en el periodo comprendido entre septiembre 2020 a enero del 2021.

Formulación del problema

¿Existe correlación entre la Clasificación clínica de la COVID19 y el valor Ct del RT-PCRq en los casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca?

1.2. Antecedentes

En el año 2017 se desarrolló una investigación cuya finalidad fue determinar la importancia clínica de la carga viral determinada por el valor Ct de la RT-PCR y su relación con la gravedad de infecciones respiratorias agudas (viral única y múltiple), para lo cual realizaron un monitoreo prospectivo a 582 niños con infecciones respiratorias agudas realizándose PCR para la detección de 15 virus respiratorios , estableciendo que cuando la infección es por un único virus (virus sincitial respiratorio o el coronavirus humano), existe correlación entre la carga viral indicada por el valor Ct y factores como hospitalización y gravedad. En infecciones respiratorias multivirales encontraron que los valores de Ct se correlacionan con parámetros clínicos (hospitalización, duración de la estancia hospitalaria, duración de uso de oxígeno, puntuación de gravedad); sin embargo, pese a estos hallazgos significativos, los autores indican que la relevancia clínica es

limitada debido principalmente a factores de hospedador, del virus y del laboratorio (Wishaupt et al., 2017).

Un estudio recopiló datos virológicos e información clínico-epidemiológica en 92 pacientes con COVID-19 atendidos en un hospital de China. Se determinaron las cargas virales de pacientes graves, leves y moderados al ingreso y luego a los hospitalizados que desarrollaron o no formas graves durante su hospitalización; las muestras procedieron del tracto inferior, se analizaron mediante RT-PCR y se indicó el valor umbral de ciclo (Ct). Los hallazgos de esta investigación mostraron que los pacientes con formas graves tenían valores Ct significativamente más bajos comparados con los leves y moderados al ingreso; se observó también una carga viral más alta en las muestras de pacientes que se agravaron durante la hospitalización, concluyendo que existe una asociación positiva entre la carga viral y la gravedad de la enfermedad (Yu, X et al., 2020).

Se realizó un estudio de cohorte retrospectivo en dos hospitales de Nueva York. La carga viral del SARS-CoV-2 se evaluó utilizando el valor del umbral de ciclo (Ct) de una RT-PCR para hisopados nasofaríngeos de 678 pacientes con COVID-19. La carga viral (alta, baja y media al ingreso) fue correlacionada con la mortalidad hospitalaria y el riesgo de intubación y otras variables, encontrando que la carga viral alta estaba asociada con mayor edad, comorbilidades, tabaquismo y quimioterapia reciente. La mortalidad y riesgo de intubación también estuvieron asociados a altas cargas virales (Magleby et al., 2020).

En un estudio realizado en Beijing, se analizaron muestras de 76 pacientes positivos a SARS-CoV-2 utilizando la técnica de PCR digital en gotas (ddPCR) y RT-PCR para detectar dos genes diana *ORF1ab* y *N* y un control positivo (gen de referencia). En las muestras que dieron positivas por ambas metodologías, el Ct de la RT-PCR se correlacionó altamente con el número

de copias de la ddPCR, por lo que con el Ct se podría evaluar la carga viral. Sin embargo, los autores indicaron claramente que cuando los valores Ct eran elevados, la correlación con carga viral disminuyó. Además, realizaron un análisis de la carga viral y el curso temporal de la COVID-19, mostrando que la carga viral en fases iniciales y progresivas era significativamente más elevada que cuando el paciente se hallaba en fase de recuperación (Yu, F et al., 2020).

Una investigación prospectiva de transmisión domiciliar de casos leves de COVID-19, determinó la relación de los valores Ct del ARN viral diana (N1) y distintas características (demográficas, epidemiológicas y clínicas) recopiladas mediante entrevistas y registros diarios de síntomas. Los investigadores encontraron valores Ct más bajos después de la aparición de síntomas; el valor Ct medio fue de 26.5 en los 7 días posteriores al inicio de síntomas en comparación al Ct de 35.0 a los 21 días del inicio. Los valores de Ct fueron significativamente más bajos en los participantes menores de 18 años ($p = 0,01$) y en los que tenían síntomas de las vías respiratorias superiores en el momento de la recolección de la muestra; los valores Ct fueron más altos en los participantes que no informaron síntomas ($p = 0,05$) (Salvatore et al., 2020).

Se realizó un estudio con 31 pacientes asintomáticos confirmados de tener COVID-19 con un kit de amplificación de RT-PCR dirigido a las secuencias ORF1ab y al gen (N) de la proteína de la nucleocápside. Los pacientes fueron hospitalizados, y aquellos que desarrollaron síntomas posteriores se denominaron pacientes asintomáticos en período de incubación (API), aquellos que permanecieron sin desarrollar síntomas se les denominó pacientes asintomáticos (AP), encontrándose que el valor Ct de los AP fueron superiores a los API. La carga viral fue significativamente menor en pacientes asintomáticos que en los asintomáticos en periodo de incubación, sugiriendo que, pese a que los pacientes pueden estar asintomáticos, existe la posibilidad de diseminación viral y de la transmisión del virus en este periodo (Rui et al., 2020).

Una revisión sistemática de la utilidad del valor Ct en el contexto de la COVID-19, encontró 18 estudios sobre el valor Ct o cargas virales determinadas mediante el valor Ct y resultados de carácter clínico, concluyendo que, el valor Ct permitiría el manejo clínico de pacientes y la toma de decisiones en salud pública para el control con la COVID-19 (Rao et al., 2020).

En un hospital de India se planteó encontrar la asociación entre el valor de Ct y la mortalidad y gravedad de la COVID-19. Los investigadores incluyeron en el estudio a pacientes confirmados de COVID-19 por RT-PCR, encontraron que pacientes con cuadros leves tenían significativamente valores Ct bajos (carga viral alta) comparados con los que padecían un cuadro grave, sin embargo, la duración de la enfermedad antes de la prueba, fue más corta en el grupo con enfermedad leve en comparación con aquellos con enfermedad grave; respecto a los fallecidos, estos presentaron Ct bajos comparados con el de los sobrevivientes, en este caso los días con la enfermedad antes de hacerse la prueba fueron menores en comparación de los sobrevivientes. Los autores no establecieron correlación entre los valores Ct y la gravedad de la COVID-19, sugiriendo que se controle el tiempo de la prueba desde el inicio de los síntomas mientras se correlacionan los valores de Ct con la gravedad de la enfermedad (Shah et al., 2021).

1.3. Objetivos

Objetivo general

- Determinar la correlación entre la clasificación clínica de la COVID-19 y el valor Ct de la RT-PCRq en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca.

Objetivos específicos

- Establecer puntos de corte para agrupar valores Ct que permitan establecer carga viral: alta,

baja y media.

- Determinar las características epidemiológicas estratificadas de acuerdo con el valor Ct en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados mediante RT-PCRq en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca.

1.4. Justificación

Esta investigación, revelaría si existe asociación positiva o negativa, entre el valor Ct de la RT-PCRq y la clasificación clínica de casos confirmados con COVID-19 basada en síntomas y signos, permitiendo sumar información a la posible importancia clínica del Ct en el marco de esta pandemia para la toma de decisiones en la admisión o tratamiento o monitoreo. Por otro lado, este estudio es importante en la Región Cajamarca, donde se vienen desarrollando estudios de seroprevalencia, esta investigación sería la primera que utiliza datos de biología molecular para analizar un valor relacionado a carga viral y su asociación con la sintomatología que permita procesar, evaluar y establecer formulas tablas para el pronóstico de la enfermedad en la Región Cajamarca.

1.5. Hipótesis:

H₀: La clasificación clínica de la COVID-19 no está asociada (no es dependiente) al valor Ct de la RT- PCRq en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca.

H_a: La clasificación clínica de la COVID-19 está asociada (es dependiente) al valor Ct de la RT-PCRq en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. RT- PCR en Tiempo Real

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa o denominada por sus siglas RT-PCRq, es una técnica de biología molecular ampliamente usada (en biología, medicina, etc.) para la detección de ARN de manera altamente eficiente; de fácil manejo, altamente sensible y específica (Du et al., 2017).

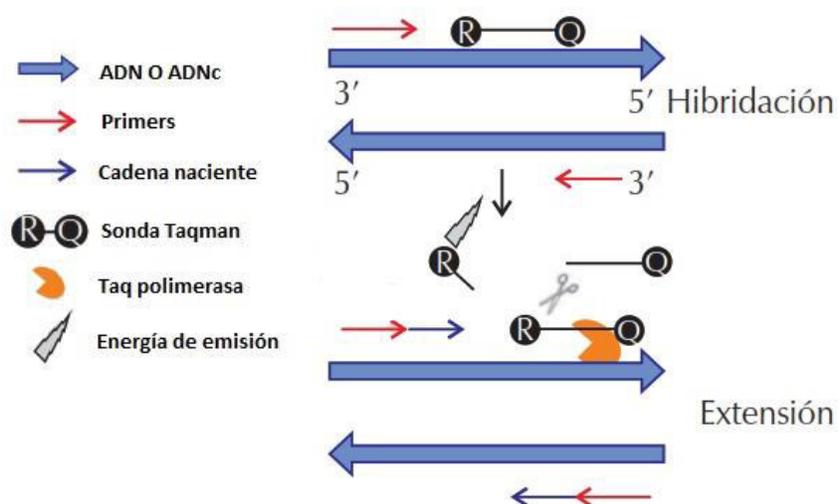
La RT-PCRq también es denominada como RT-PCR cinética o RT-PCR fluorescente cuantitativa, la que utiliza la RT-PCR tradicional más el mecanismo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), para lo cual se usa cebadores fluorogénicos; determinando los cambios de intensidad de la fluorescencia en tiempo real mediante un sistema óptico en un termociclador; comprende los siguientes pasos: (a) Se purifica el ARN; (b) el ARN se transcribe de manera inversa formando ADNc; (c) se usan primers específicos para los genes de interés en el segmento de ADNc, continuando con la reacción en tiempo real; (d) la concentración de los amplicones son calculados mediante la fase exponencial de la reacción, siendo factible realizar una cuantificación del mismo en un termociclador (Wagner, 2013).

Los termocicladores integran un sistema que excita los fluoróforos y un sistema que permite detectar la señal fluorescente integrada por canales de detección. Los fluoróforos utilizados en esta técnica pueden ser aquellos que son afines por el ADN (intercalantes), el más empleado es el SYBR Green I y las sondas de hibridación específicas para fragmentos de ADN, estas últimas están marcadas con dos fluoróforos: Un fluoróforo reportero (donador) de alta energía y un apagador (quencher) aceptor de baja energía; mientras que la sonda no se hibride

ambos están vinculados; al ocurrir la hibridación, la Taq Polimerasa debido a su actividad como exonucleasa 5'-3' elimina este vínculo, logrando que el fluoróforo reportero se libere emitiendo fluorescencia, lo cual es captado por el termociclador; justamente esta es la bondad de las sondas pues de no existir un blanco de ADN, no existirá amplificación y por ende ninguna fluorescencia, existen distintos tipos de sondas, en la figura 1, tomada de Tamay et al., 2013; se muestra el funcionamiento de las sondas Taqman, la cual contiene un fluoróforo reportero y un quencher; de existir una secuencia diana la sonda se hibrida corriente abajo del Primer y la actividad de exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompe la unión separando al reportero emitiendo señal. Eliminada la sonda del ADN diana, el proceso de extensión del Primer continúa.

Figura 1

Mecanismo de funcionamiento de las Sondas Taqman



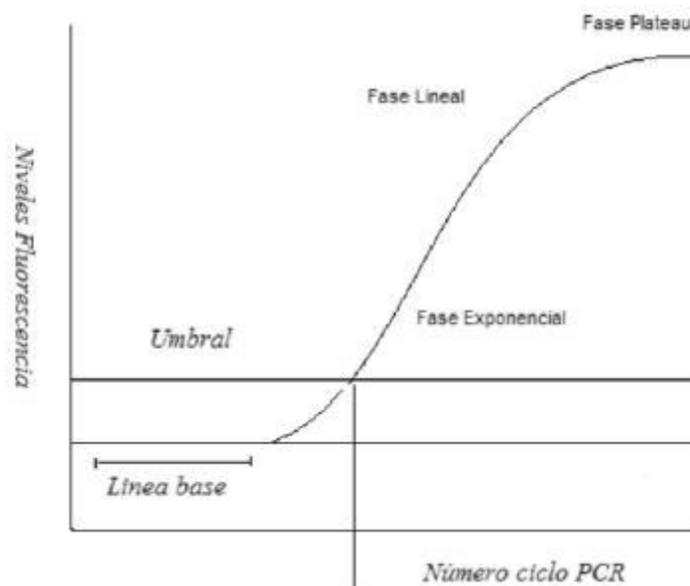
La cinética de la RT-PCRq se muestra en la figura 2 (tomada de Cubillos et al., 2018) y tiene 4 fases marcadas: Una fase basal o inicial (background) seguida de la fase exponencial (logarítmica), una fase lineal y la fase plateau denominada estacionaria. La fase basal ocurre en

los primeros ciclos de la corrida se caracteriza debido a que el nivel de fluorescencia es bajo para distinguirlo del ruido; la fase exponencial se caracteriza debido a que el nivel de fluorescencia supera el threshold (umbral), en esta fase se logra una amplificación óptima, es decir, en cada ciclo por cada molécula de ADN se generan dos; en la fase lineal los reactivos de la PCR tienden a ser limitantes en las reacciones de cada ciclo; finalmente en la fase plateau existe una señal saturada, los reactivos se agotan y la reacción se detiene, la concentración de amplicones se mantiene constante a pesar que continúen los ciclos; en toda la cinética de la RT-PCRq es importante el threshold que hace referencia al nivel de fluorescencia fijado sobre la línea basal (Cubillos et al., 2008; Aguilera et al., 2014); usualmente el threshold se fija en la mitad de la curva exponencial, evitando ruidos; los equipos modernos fijan el threshold de manera automática.

En una RT-PCRq se evidencia un valor Ct (threshold cycle) este valor puede recibir otras denominaciones, dependiendo de la plataforma de amplificación usada, puede denominarse también Cq (quantification cycle) o Cp (crossing point) que en la práctica son lo mismo, pues estos valores semicuantitativos hacen referencia al ciclo en el cual la fluorescencia es detectada de manera significativa sobre la señal de la línea basal; el valor es inversamente proporcional a la concentración inicial de la secuencia diana de la muestra.

Figura 2

Cinética de la amplificación en una RT-PCRq



2.1.2. Aspectos Clínicos epidemiológicos de la COVID-19

El 12 de diciembre de 2019 se notificó un brote de neumonía viral con etiología desconocida en la ciudad de Wuhan, China; el brote progresó y en enero de 2020 la Organización Mundial de la Salud informó de un nuevo virus vinculado a dicho brote, al que inicialmente se denominó 2019- nCoV (Ji et al., 2020) y que posteriormente el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus lo designó como SARS-CoV-2 (Gorbalenya et al., 2020). La aparición del coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave conocido como SARS-CoV-2 y que es el causante de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), es considerada una emergencia de salud pública y global de proporciones históricas y con grave impacto a nivel mundial (Bullard et al., 2020).

Esta enfermedad presenta distintas manifestaciones clínicas siendo las principales: fiebre,

tos seca, disnea, febrícula, y se asocia a distintas comorbilidades siendo las más frecuentes: las enfermedades cardiovasculares, además la edad y la obesidad se relacionan a peores procesos evolutivos de esta enfermedad (Gil-Rodrigo et al., 2020); también se han descrito algunas manifestaciones atípicas estrechamente relacionadas con la infección, como expectoración, dolor de cabeza, hemoptisis, náuseas, vómitos y diarrea, disfunción quimio sensorial, como anosmia y pérdida del gusto; en base a estas características en China se encontró tres estadios de la enfermedad: Los casos graves, normales y leves, también se ha descrito que buen número de pacientes confirmados son asintomáticos, sin embargo un alto porcentaje corresponde a casos de tipo normal- leves (Guo et al.,2020), otros autores indican un cuarto estadio de la enfermedad sintomática al que denominan caso crítico (Mendoza-Ticona et al., 2020; Liang et al., 2020).

En Perú, la COVID-19 según documento técnico (Ministerio de Salud, 2020b) aprobado por la Resolución Ministerial 193-2020/MINSA, esta enfermedad se clasifica según distintos criterios (Anexo A) en:

- Caso leve (incluye asintomáticos)
- Caso moderado
- Caso severo

Las características clínico-epidemiológicas de las personas con esta enfermedad son recogidas en la ficha epidemiológica oficial (Ministerio de Salud, 2020c) (Anexo B).

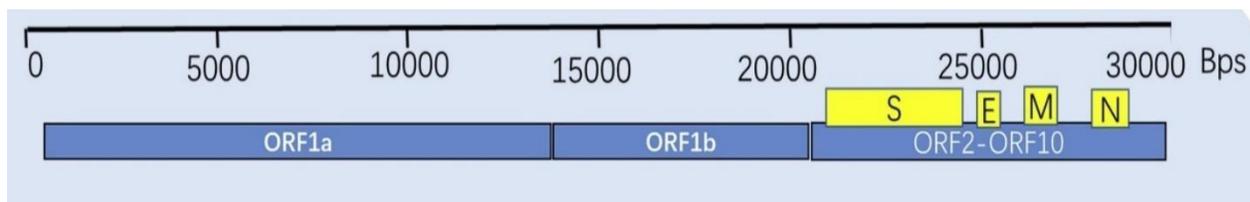
2.1.3. Sobre el agente etiológico.

Respecto al agente etiológico de esta enfermedad, se conoce que es una de las siete especies que pueden causar enfermedad en el humano y pertenece al género Beta coronavirus (Sarbecovirus) de la familia Coronaviridae (Salas et al., 2020); los coronavirus son virus envueltos

del tipo ARN positivo, específicamente el SARS-CoV-2 presentan un genoma cuyo tamaño oscila entre 29,8 kb a 29,9 kb y su estructura genómica como se representa en la figura 3 (tomada de Wu et al., 2020) presenta características genéticas de otros coronavirus ya descritos (Khailany et al., 2020), presenta en su genoma diez marcos de lectura abiertos (ORF siglas en ingles Open Reading Frames), muchas de las proteínas que son codificadas por estos ORFs son proteínas no estructurales, los ORF1 y ORF2 que representan dos tercios del genoma, codifican poliproteínas siendo una de las más descritas la RdRp es decir una ARN polimerasa dependiente de ARN (Díaz-Castrillón y Toro-Montoya, 2020), la ORF1ab es responsable de codificar la poliproteína 1ab de la replicasa, asimismo indicamos que ORF2- ORF10 codifican distintas proteínas virales principalmente estructurales.

Figura 3

Estructura del genoma de SARS-CoV-2

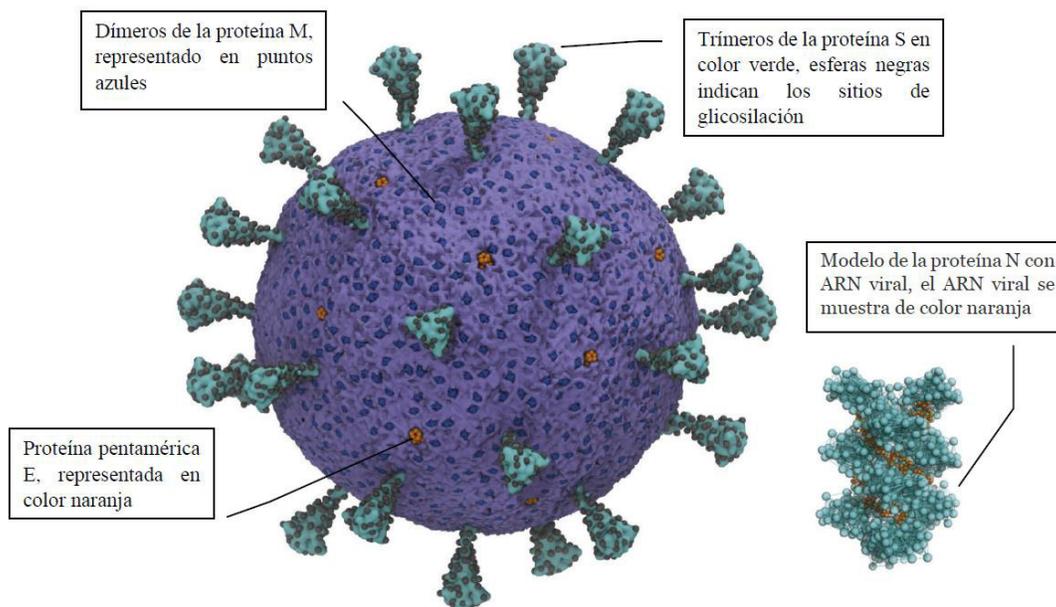


Las proteínas estructurales dan forma al virus como se evidencia en la figura 4 (tomada de Yu, A et al., 2021) y destacan la proteína Spike (S), proteína de envoltura (E), proteína de membrana (M) y proteína de la nucleocápside (N); siendo la proteína Spike de importancia en la unión del virus a la célula durante la infección; la proteína E se le atribuye la formación de canales iónicos para favorecer la liberación viral; respecto a la proteína dimérica M su función no está definida del todo, pero se le atribuye participación en el ensamblaje vírico, por su parte la proteína

N es importante para el empaquetamiento del ARN viral (Wu et al., 2020).

Figura 4

Modelo externo de la estructura del SARS-CoV-2



Desde el secuenciamiento del genoma de este virus se dispone de distintas dianas genéticas para detección mediante amplificación, básicamente los procesos de detección mediante RT-PCR usan algunos de los siguientes genes: Gen E de la envoltura el cual es propio de los Beta-coronavirus (Sarbecovirus), los genes RpRd de la ARN polimerasa ARN dirigida y el gen N de la nucleocápside (Reina y Suarez, 2020), también se ha descrito en algunos kits de investigación, la combinación de genes ORF1ab y gen de N (Liu et al., 2020), utilizando la detección molecular del gen E como cribado inicial, la detección del gen RdRp o del gen N como una prueba confirmatoria para SARS-CoV-2, dependiendo de la combinación de los kits usados (Lippi et al., 2020). Es importante indicar que la detección de estas secuencias diana y sus protocolos respectivos dependen del País y/o institución cuyo protocolo ha sido aceptado por la OMS (Díaz-

Jimenez, 2020).

El SARS-CoV-2 es detectado por RT-PCR en tiempo real, los resultados de esta técnica molecular arrojan los Ct, estos valores proporcionan mediciones semicuantitativas e indirectas de la carga viral, se dispone de información científica que han estudiado tendencias temporales de estos valores durante el curso de una infección por SARS-CoV-2 (Salvatore et al., 2020), por ejemplo se ha planteado que en los trabajadores con COVID-19 positivos, el Ct podría ser de utilidad para evaluar el retorno del trabajador a laborar, debido a que un estudio correlacionó el valor Ct inicial más bajo con el tiempo total transcurrido hasta obtener una prueba negativa por RT-PCR (Domeracki et al., 2020).

El valor Ct ha cobrado mucha importancia en el monitoreo de la carga viral estimada del SAR-CoV-2, existen diversos estudios que plantean la utilidad del valor Ct en el actual contexto de la COVID-19, aunque estos valores usualmente no se informan; actualmente no está claro si el valor de Ct de SARS-CoV-2 es totalmente útil para el manejo clínico del paciente, pero la evidencia sugiere que el informe de estos valores podría ofrecer beneficios en la toma de decisiones (Rao et al., 2020).

2.2. Definición de conceptos

- Ct (Umbral de ciclo o Cq): En una RT-PCR hace referencia al número de ciclos de amplificación necesarios para que pueda detectarse la fluorescencia de un amplicón, e indica la intersección entre la curva de amplificación y la línea umbral (threshold). Este valor es una medida relativa a la concentración de la secuencia diana de la PCR, reflejaría de manera inversa los niveles de ARN viral.

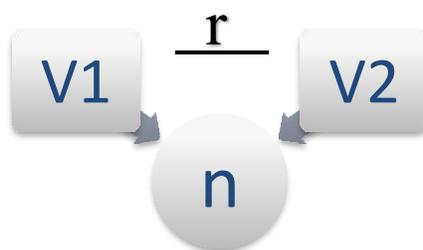
- Opentrons: Equipo automatizado para extracción de ARN viral.
- RT-PCR en tiempo real: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, es una técnica de biología molecular, que permite en base a una hebra de ARN, formar ADN complementario; esta detección se realiza en tiempo real.
 - Threshold (Línea umbral): En una RT-PCR en tiempo real hace referencia al umbral de fluorescencia establecido en el punto medio de la fase exponencial de la amplificación del control positivo incluido en el kit de detección.

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación:

La presente investigación es de tipo observacional correlacional de corte transversal.

Diseño específico:



n= muestra

V1= Variable valor Ct del RT-PCR en casos positivos a SARS-CoV-2

V2= Variable clasificación clínica de la COVID-19

r=Coefficiente de relación

3.2. Ámbito temporal y espacial

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Laboratorio de Referencia Regional de Salud Pública (LRRSP) de la Dirección Regional de Salud (Diresa) Cajamarca, en el periodo comprendido entre septiembre de 2020 a enero de 2021.

3.3 Variables

Definición operacional de variables

Variables	Definición conceptual	Indicador	Dimensión	Escala
Variable independiente: Valor Ct de la RT-PCR de casos positivos a SAR-CoV-2.	Medida semi cuantitativa relativa a la concentración de la secuencia diana en la RT-PCR, obtenida entre la intervención de la curva de amplificación y el Threshold	Valor numérico del Ciclo de umbral (Ct)*	valores Ct bajos	Ordinal
			valores Ct medios	Ordinal
			valores Ct altos	Ordinal
Variable dependiente: Clasificación clínica de la COVID-19	Características clínicas que permiten determinar el nivel de severidad del paciente con COVID-19 confirmado	Síntomas, signos y demás datos registrados en la ficha epidemiológica y que permitan clasificar el caso según normativa vigente	Caso leve (incluye asintomáticos)	Ordinal
			Caso moderado	Ordinal
			Caso severo	Ordinal

*El cual se expresó en niveles, los puntos de corte se establecieron con un estimador M (estimador bponderado de Tukey),

donde: Ct bajos= Carga viral alta; Ct medios= Carga viral media y Ct altos= Carga viral baja.

3.4. Población y muestra

Población diana:

Casos positivos a SARS-CoV-2 mediante RT-PCRq.

Población de estudio:

Casos positivos a SARS-CoV-2 mediante RT-PCRq, detectados en el Laboratorio de Biología Molecular- Diresa Cajamarca, en el periodo comprendido de septiembre 2020 a enero 2021, sumando un total de 1486 casos positivos.

Muestra:

La muestra fue calculada utilizando la plataforma online WinEpi: Working in Epidemiology (<http://www.winepi.net/f102.php>); para determinar el tamaño de muestra mínima necesaria se empleó el apartado “muestreo aleatorio y diagnóstico perfecto”, introduciendo los siguientes datos: Nivel de confianza 95%, tamaño de la población 1486, proporción esperada fijada al 34% y un error absoluto fijado al 2.5%; obteniendo que se debe seleccionar una muestra de 726 individuos, se reconoce una amplitud del intervalo de confianza igual al doble del error aceptado (5%) con un nivel de confianza del 95%. El método de muestreo fue aleatorio simple utilizando la misma plataforma proporcionando listado. Según el diagrama de flujo y siguiendo los criterios de exclusión, este estudio se desarrolló en base a 718 casos elegibles, lo que corresponde al tamaño de unidades muestrales (Figura 5).

Nota: Tener en cuenta que el error aceptado y el nivel de confianza son establecidos por el investigador. La literatura o información sobre el tema u otras fuentes pueden aclarar la idea acerca del valor de proporción esperada; si no se dispone de datos en el escenario más desfavorable para

el cálculo de muestra se puede optar por valores cercanos a 50%, o 50% cuando se desconoce la prevalencia.

a) Criterio de inclusión

Caso positivo a SARS-CoV-2 con amplificación del gen N mediante RT-PCRq y que cuenta con ficha epidemiológica.

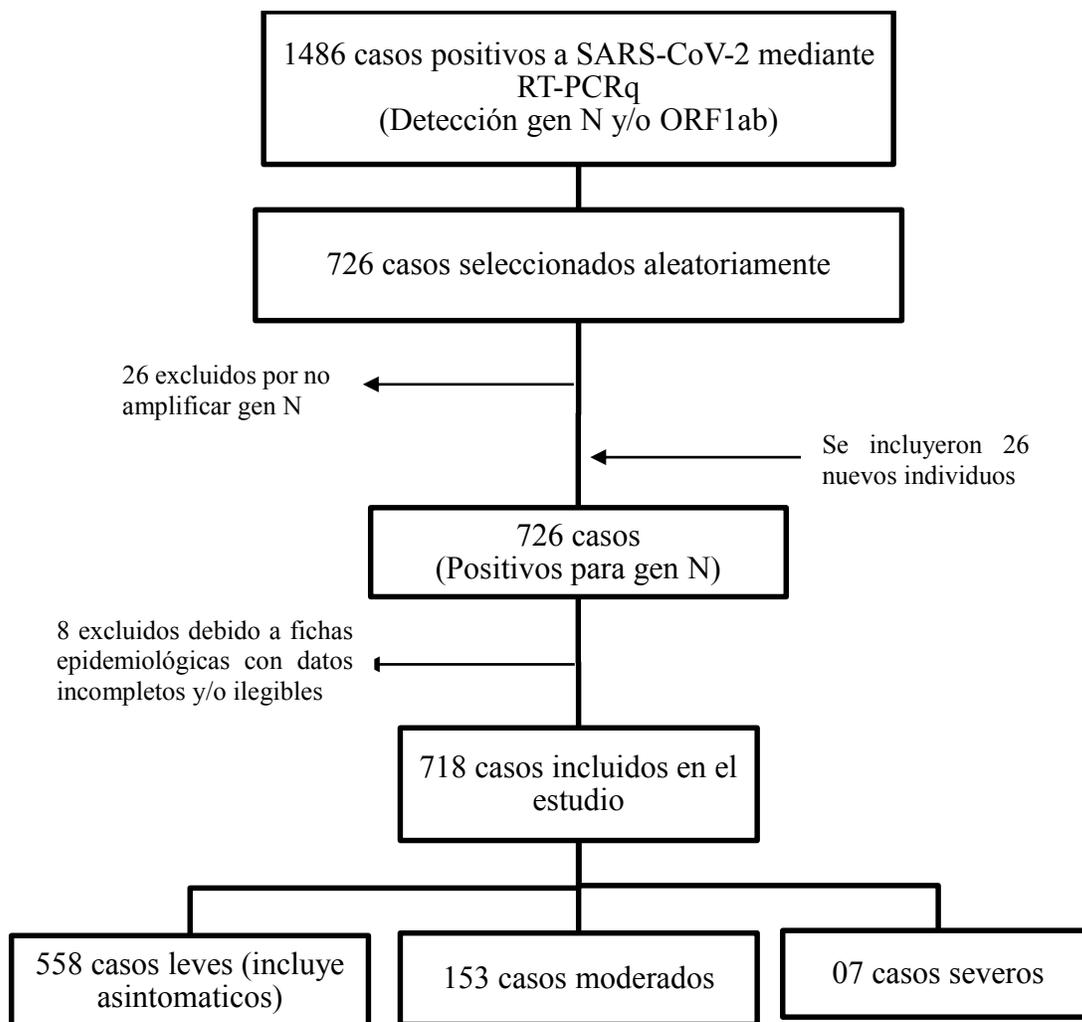
b) Criterio de exclusión

Caso positivo a SARS-CoV-2 que habiendo amplificado el gen ORF1ab no amplifica el gen N.

Caso positivo a SARS-CoV-2 con amplificación del gen N cuya ficha epidemiológica presentó datos demográficos y/o epidemiológicos incompletos que impidió su incorporación para cumplimiento del objetivo específico.

Figura 5

Flujograma para selección de casos elegibles (unidades muestrales) y su clasificación clínica al momento de la toma de muestra



3.5. Instrumentos

Se utilizó como instrumento de recolección de datos la ficha clínico-epidemiológica (Anexo B) de los casos confirmados para SARS-CoV-2, además cada código de la ficha se vinculó con su respectiva lectura del valor de umbral de ciclo, para lo cual se utilizó una base de datos en Excel.

3.6. Procedimientos

Obtención de muestras

Las muestras correspondieron a hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos (02 hisopos de dracón o poliéster con mango plástico) recolectados por los distintos establecimientos que derivan muestras al Laboratorio de Biología Molecular de Diresa Cajamarca, transportados en medio de transporte viral manteniendo cadena de frío 2-8 °C.

Extracción de ARN viral

La extracción se realizó de manera semi-automatizada con el equipo Opentrons modelo OT2, utilizando el kit de purificación de ARN viral SbeadexTM (Anexo C), este kit utiliza perlas magnéticas que están validados para este uso, las muestras se homogenizaron vigorosamente en un vortex (Gemmy), se dejaron reposar por unos minutos para evitar la dispersión de aerosoles, en placas de pocillos de 2 ml, se adicionó una alícuota de 100 µL de cada muestra y 1 µL de control interno del kit de amplificación, se continuó el procesamiento según las condiciones del fabricante (Anexo C), adicionando a las muestras de 100 µL de buffer de lisis, seguido de 180 µL de binding buffer + perlas, la placa se colocó en el equipo y se programó la extracción para muestras en múltiplos de 8, este procedimiento incluye el tratamiento con tres buffer de lavado (BN1, TN1, TN2) y finalmente la elusión con el buffer AMP en una placa de PCR, el ARN eluido se mantuvo en refrigeración si el procesamiento de amplificación se retomó luego, si la ampliación se continuó al día siguiente el eluido se congeló a -20 °C.

RT-PCRq

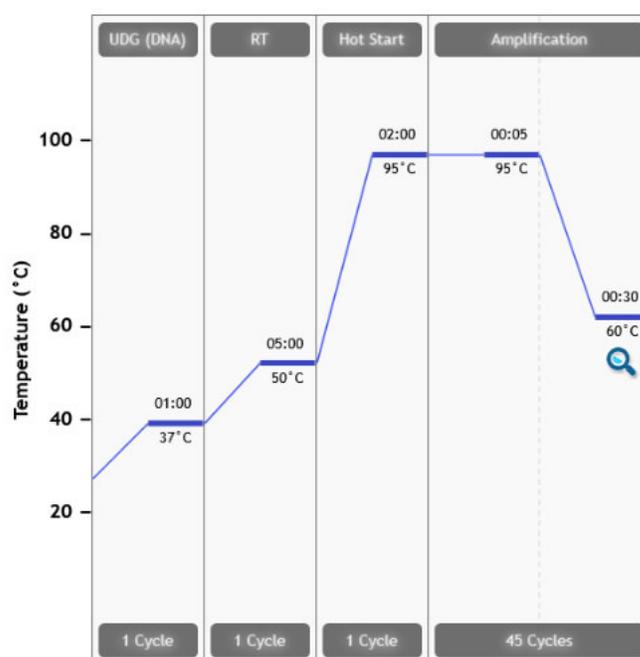
Para la detección del material genético del utilizó el Sistema de PCR en tiempo real AriaMx

modelo G883A (termociclador marca Agilent) y el kit comercial SARS- CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit Zybio (Anexo D), el cual se basa en una PCR con el método de sonda fluorescente, mediante generación de ADN complementario a partir del ARN del SARS-CoV-2, este kit incluye sondas y cebadores específicos de acuerdo a las secuencias dianas de las regiones conservadas del gen ORF1ab y el gen N y no se espera reacciones cruzadas con otros coronavirus respiratorios; el kit incluye, con la finalidad de evitar falsos negativos, una secuencia como control positivo exógeno y con control negativo. En cada placa corrida se incluyen 05 controles: Control de alicuotado, control de extracción, NTC para área limpia, control negativo y control positivo.

El ciclaje sigue lo indicado por el fabricante (figura 6), debiendo utilizarse los canales FAM para detección del gen N, ROX para detección del gen ORF1ab y el canal VIC para el control interno. El fabricante declara que el límite de detección del kit es de 200 copias/mL.

Figura 6

Programa térmico de la RT-PCRq usando el kit Zybio



Interpretación y lecturas de curvas de amplificación

Terminado el ciclaje, la lectura se realizó con el software Agilent Aria 1.7; usando el control positivo se fijó el threshold en la mitad de la curva de la fase exponencial para cada canal, finalmente para un resultado positivo o negativo se tomó en cuenta los siguientes criterios:

- Resultado positivo: Se evidencia amplificación con curva sigmoideal en los marcadores diagnósticos (FAM y ROX) con valor de $Ct < 40$.
- Resultado negativo: No debe haber curva de amplificación en los marcadores diagnósticos (FAM y ROX) o $Ct = 45$, debe presentar curva de amplificación con $Ct < 40$ en el marcador del control interno (VIC).
- Zona gris: Amplificación en FAM o ROX, con valor $Ct \geq 40$ y < 45 ; además $Ct < 40$ en el marcador del control interno (VIC). Es necesario repetir la prueba, si en el reproceso el resultado arroja la amplificación de una curva sigmoideal, debe reportarse como positivo.
- Resultado inválido: $Ct = 45$ o ningún valor de fluorescencia en canales FAM, ROX y $Ct > 40$ o ningún valor en el marcador interno (canal VIC); los resultados no son válidos y se repite la prueba.

Las fases generales del proceso laboratorial se muestran en el Anexo E.

Recopilación de información de fichas epidemiológicas

Se obtuvo los datos de forma manual de las fichas epidemiológicas, para lo cual se elaboró una base de datos en Excel conteniendo información: síntomas signos, hospitalización, ventilación mecánica los cuales servirán para clasificar el caso leve, moderado o severo: Esta clasificación se asoció con el valor Ct ; además se recopilaron datos sobre las características epidemiológicas; agrupándolas en edad, sexo, escenario laboral (si es o no trabajador de salud), síntomas-signos y

comorbilidades y factores asociados.

3.7. Análisis de datos

Los datos fueron analizados con el software IBM SPSS Statistics 25 (<https://www.ibm.com/support/pages/downloading-ibm-spss-statistics-25>), en una primera etapa mediante un estimador robusto central (estimador bponderado de Tukey) se estableció los puntos de corte para los valores Ct respecto a la clasificación clínica de la COVID-19 para definir los rangos que permitan establecer la carga viral: alta, baja y media. Para establecer correlación entre ambas variables se utilizó el Rho de Spearman, asimismo se calculó el coeficiente de incertidumbre para establecer la reducción proporcional del error cuando el Ct es empleado para predecir clasificación clínica de la COVID-19.

Para el caso de la estratificación de características epidemiológicas respecto a valores del Ct se utilizó en Chi cuadrado- X^2 para determinar asociación, del mismo modo se midió el coeficiente de incertidumbre.

3.8. Consideraciones éticas

Respecto a las muestras y fichas epidemiológicas de los pacientes; el Laboratorio de Biología Molecular de la Dirección Regional de Salud, codifica todas ellas en la etapa preanalítica, todo procesamiento de información se realizó exclusivamente con el código asignado salvaguardando el anonimato; debido a que se requiere acceso a datos sensibles protegidos por ley; el plan de tesis fue revisado y cuenta con la autorización del área de investigación de la Diresa Cajamarca (Anexo F), y la autorización del Laboratorio de Referencia Regional de Salud Pública Cajamarca (Anexo G), se aseguró la confidencialidad y protección de datos de acuerdo a la ley

Peruana, no se divulgó ningún dato sensible, tratando toda la información obtenida con sumo cuidado ético; asimismo indicamos que el plan de tesis fue evaluado y aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo (Anexo H).

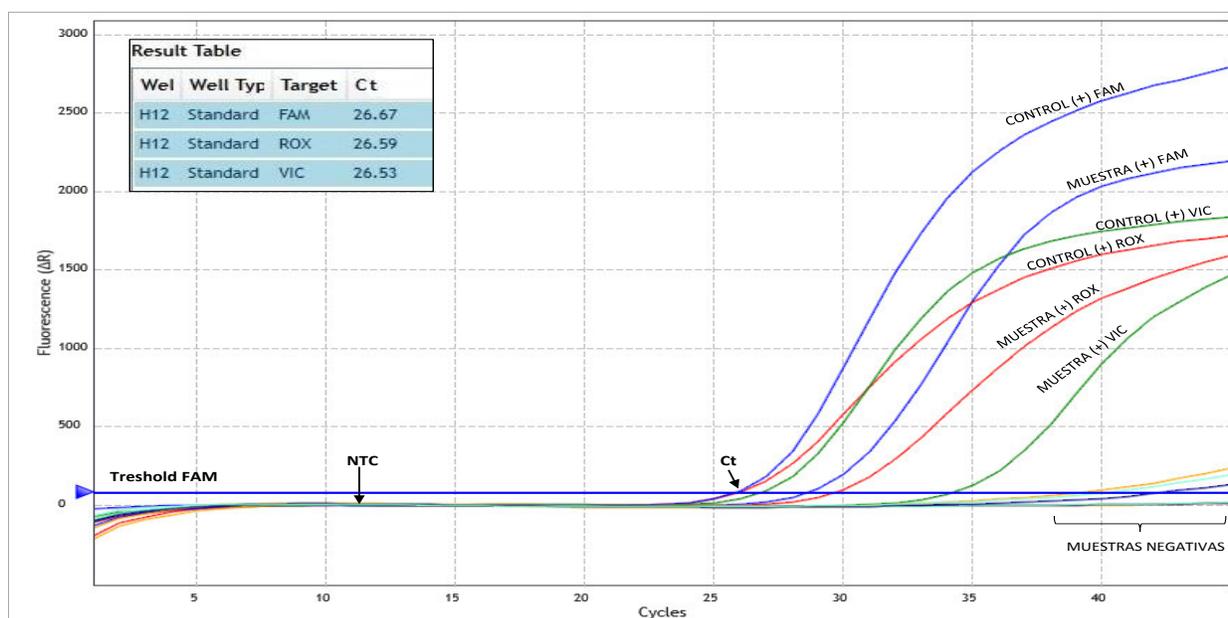
IV. RESULTADOS

4.1. Detección del Gen N del SARS-CoV-2 mediante RT-PCRq

Con el propósito de establecer la asociación entre el Ct y la clasificación clínica de la COVID-19, se seleccionaron 718 casos positivos a SARS-CoV-2, mediante la detección del gen de interés, para este estudio es el Gen N; en la figura 7 se muestra las gráficas de amplificación con el Kit utilizado.

Figura 7

Gráficas de amplificación para muestras positivas y negativas a SARS-CoV-2



Nota. Canal FAM: gen N, Canal ROX: gen ORF1ab, Canal VIC: Control interno (secuencia positiva exógena). Se muestran valores Ct del control positivo señalando el Ct gen N.

4.2. Agrupación de Valores Ct

Los valores de Ct se agruparon de acuerdo con los puntos calculados mediante el estimador

biponderado de Tukey estableciéndose los siguientes rangos como se muestra en la figura 8.

Figura 8

Rangos del valor Ct y su correspondencia con la carga viral, calculados mediante el estimador biponderado de Tukey

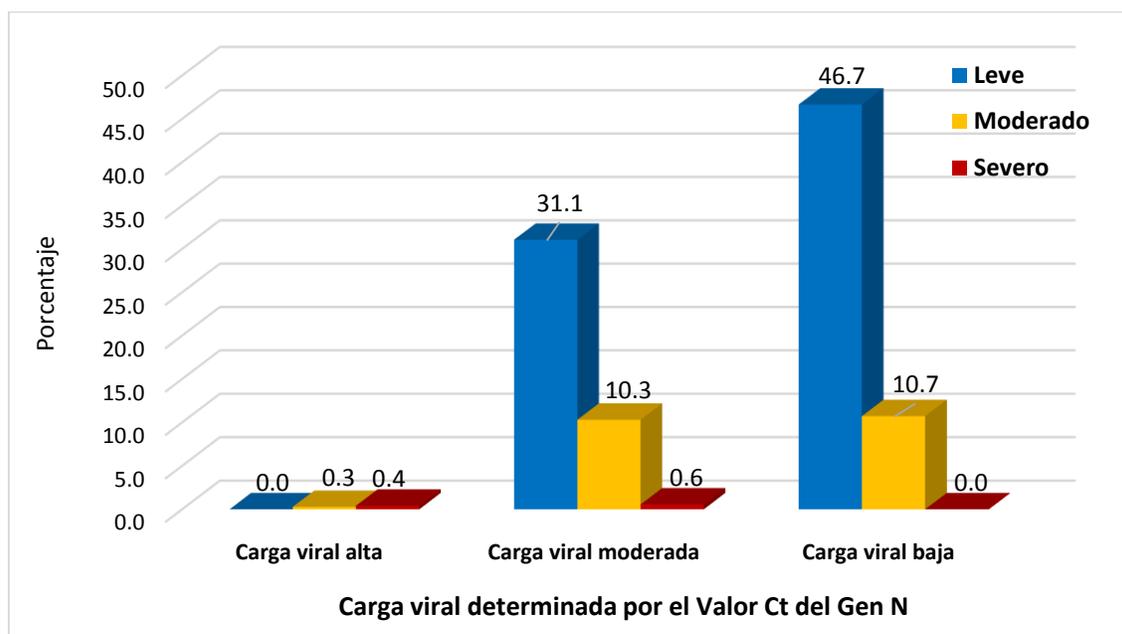


4.3. Determinación del grado de correlación entre la clasificación clínica de la COVID-19 y el valor Ct del RT-PCRq en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el laboratorio de biología molecular-Diresa Cajamarca.

Al estudio ingresaron 558 (77.7%) casos leves, 153 (21.3%) casos moderados y 7 (1%) de casos severos, al interceptar estos casos con el valor Ct, se observó que la distribución de los casos mayoritariamente pertenece a la categoría 'leve' de la clasificación clínica interceptada por la categoría 'carga viral baja (Ct \geq 30.1017)' con 335 personas (46.7%), lo que significó una buena categorización considerando que la asociación inicia en esa intercepción, se observó también que en la intercepción entre 'carga viral alta (Ct \leq 18.8359)' y casos 'severos' tuvo una frecuencia de 3 personas (0.42%) siendo notoria la tendencia que señaló una buena distribución de casos (Figura 9).

Figura 9

Distribución de la carga viral determinada por el valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19



En el contraste de la independencia de variables (Tabla 1), mediante la prueba de Chi-Cuadrado (X^2), se vio que hubo significancia bilateral ($p=0.000$; $X^2 = 191.824$), lo que proporciona evidencia para rechazar la hipótesis nula señalando que la clasificación según signos y síntomas de los pacientes es dependiente de la categorización del valor Ct del Gen N, con este resultado significativo se corroboró el poder predictivo con el Coeficiente de incertidumbre - U, el mismo que mide la reducción proporcional del error cuando los valores de la variable valor Ct Gen N se emplea para predecir valores de la clasificación clínica de la COVID-19, indicándose que hay una reducción de 4.8% ($U=0.048$; $p=0.000$) del error al pronosticar la clasificación clínica mediante el valor Ct del Gen N, esto significaría un avance en el proceso de dilucidación de procedimientos para predecir. Por otra parte, en el análisis adicional de correlación mediante Rho Spearman, se

encontró una relación significativa ($p=0.002$) inversa y de nivel débil ($r=-0.117$), lo que reafirma lo previsto, es decir a menor valor Ct del Gen N (mayor carga viral) se tiene una clasificación clínica de mayor severidad en los casos que participaron en el estudio.

Tabla 1

Contraste del valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19

Clasificación clínica	Valor Ct Gen N			χ^2 / p-value	Coeficiente de incertidumbre / p-value	Rho Spearman /p-value
	Ct \leq 18.83 (Carga viral alta)	18.83 < Ct \leq 30.10 (carga viral media)	Ct > 30.10 (carga viral baja)			
Leve	0	223	335	191.824	0.048	-0.117
Moderado	2	74	77	0.000	0.000	0.002
Severo	3	4	0			
N		718				

4.4. Determinación de las características epidemiológicas estratificadas de acuerdo con el valor Ct en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados mediante RT-PCRq en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca.

Los resultados de este objetivo se muestran en tres apartados: a). Contraste de la distribución de grupos de edad, sexo, escenario laboral (si es o no trabajador de salud) de acuerdo con el valor Ct. b). Estratificación de signos y síntomas de acuerdo con el valor Ct y c). Comorbilidades y factores asociados estratificadas de acuerdo con el valor Ct.

a) Contraste de la distribución de grupos de edad, sexo, escenario laboral de acuerdo con el Ct.

Respecto al patrón de distribución de los casos por grupos de edad fue análogo al análisis general (figura 10), sin embargo, en el contraste mediante la prueba Chi cuadrado (Tabla 2)

solamente se observó significancia estadística en las personas menores de 65 años (igual o menores a 34 años: $p = 0.029$; de 35 a 65 años: $p = 0.000$); los mayores de 65 no tuvieron significancia en el contraste; por ende únicamente en los casos de 65 años o menos, se indica que la clasificación clínica es dependiente de la categorización del valor Ct del Gen N; adicionalmente, se tuvo solamente significancia en el coeficiente de incertidumbre del grupo comprendido entre los 35 a 65 años ($U=0.078$; $p=0.000$), obteniéndose una reducción de 7.8% del error al pronosticar la clasificación clínica mediante el valor Ct; finalmente, solo para este mismo grupo se vio significancia ($p=0.012$) en la correlación mediante el Rho de Spearman, con un valor negativo y de intensidad débil ($r = -0.127$) teniendo la misma interpretación del contraste general.

Figura 10

Distribución de la carga viral determinada por el valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19, acorde con su rango etario

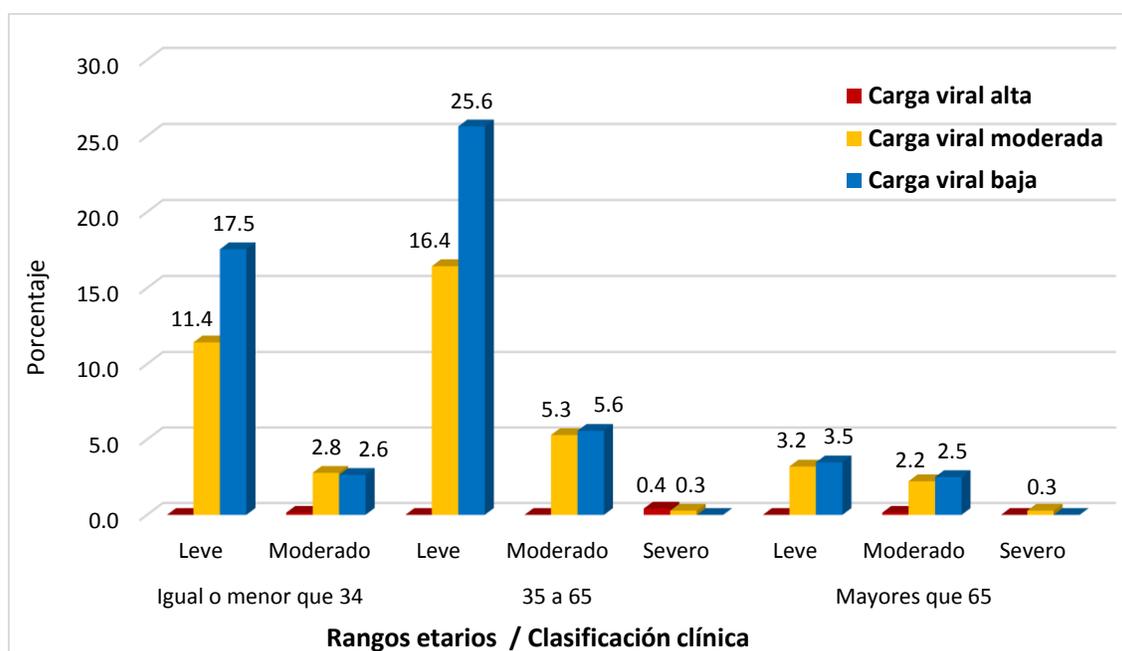


Tabla 2

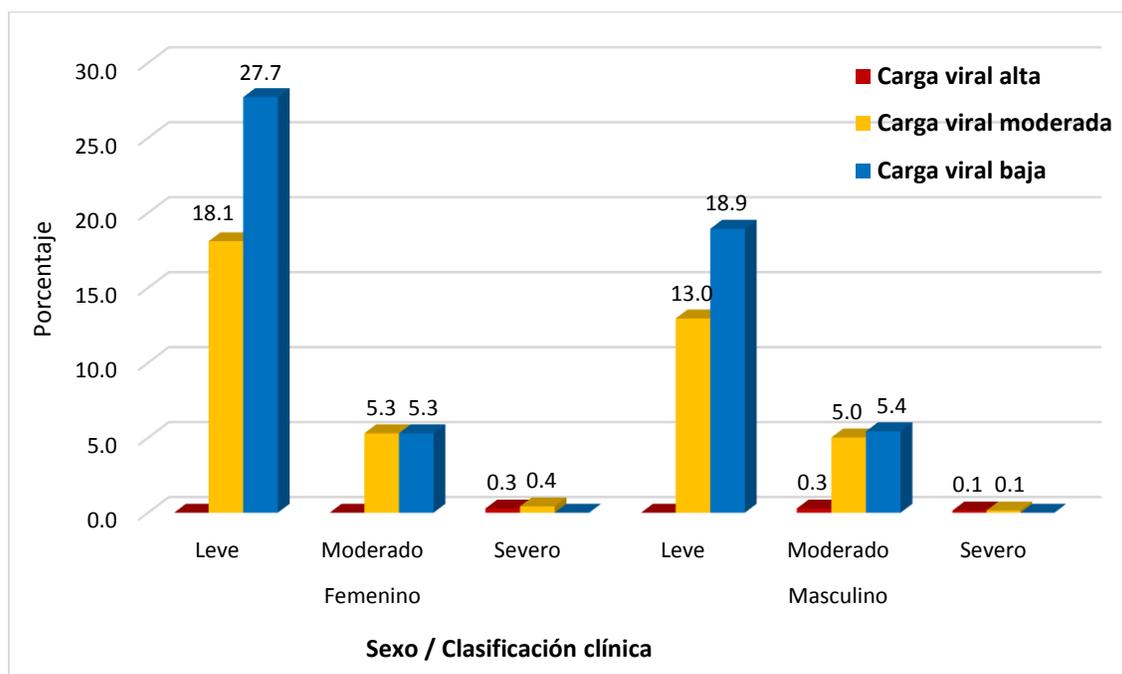
Contraste del valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19, acorde al rango etario

Edad (años)	Clasificación clínica	Valor Ct Gen N			X ² / p-value	Coeficiente de incertidumbre / p-value	Rho Spearman /p-value
		Ct ≤ 18.83 (Carga viral alta)	18.83 < Ct ≤ 30.10 (carga viral media)	Ct > 30.10 (carga viral baja)			
≤34	Leve	0	82	126	7.094	0.025	-0.105
	Moderado	1	20	19	0.029	0.062	0.100
35 a 65	Leve	0	118	184	233.345	0.078	-0.127
	Moderado	0	38	40	0.000	0.000	0.012
	Severo	3	2	0			
>65	Leve	0	23	25	3.625	0.036	-0.065
	Moderado	1	16	18	0.459	0.318	0.392
	Severo	0	2	0			

Para el sexo, las tendencias fueron similares a lo anteriormente observado (figura 11). Por otra parte, en la desagregación se observó que la prueba de X^2 señaló diferencias significativas tanto para los varones como para las mujeres (Tabla 3), entendiéndose que para ambos sexos la clasificación clínica depende de Valor Ct Gen N. Asimismo, para el coeficiente de incertidumbre (U) hubo significancia en ambos sexos, aunque para las mujeres hubo un 6% de reducción del error al pronosticar la clasificación clínica mediante el valor Ct del Gen N, en comparación de un 4.2% observado para los varones. Finalmente, solo para el sexo femenino hubo significancia en la correlación del Rho Spearman ($p=0.012$; $r= -0.125$) siendo esta inversa y de intensidad débil.

Figura 11

Distribución de la carga viral determinada por el valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19 acorde al sexo

**Tabla 3**

Contraste del valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19, acorde al sexo

Sexo	Clasificación clínica	Valor Ct Gen N canal FAM			χ^2 / p-value	Coeficiente de incertidumbre / p-value	Rho Spearman /p-value
		Ct \leq 18.83 (Carga viral alta)	18.83 < Ct \leq 30.10 (carga viral media)	Ct > 30.10 (carga viral baja)			
Femenino	Leve	0	130	199	168.134	0.060	-0.125
	Moderado	0	38	38	0.000	0.000	0.012
	Severo	2	3	0			
Masculino	Leve	0	93	136	56.129	0.042	-0.107
	Moderado	2	36	39	0.000	0.004	0.061
	Severo	1	1	0			

Respecto al escenario laboral (si es o no trabajador de salud) se observó que el comportamiento de las frecuencias fue similar a los analizados previamente (figura 12). En la prueba Chi Cuadrado se vio significancia para ambos grupos (Tabla 4), interpretándose que tanto para los que fueron trabajadores de salud como para los que no lo fueron, la clasificación clínica de los casos depende del valor Ct del Gen N. Por su parte, el coeficiente de incertidumbre mostró significancia para ambos grupos, sin embargo, en el grupo de los que declararon ser personal de salud se determinó un 10.2% de reducción del error al pronosticar la clasificación clínica mediante el valor Ct del Gen N, en comparación de un 4.4% observado para las personas que no fueron personal de salud. Por último, solo para el grupo que no fue personal de salud hubo significancia en la correlación del Rho Spearman ($p=0.001$; $r= -0.132$) siendo esta inversa y aunque de intensidad débil o baja como en los casos vistos anteriormente en este análisis.

Figura 12

Distribución de la carga viral determinada por el valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19 acorde a la condición de trabajador de salud

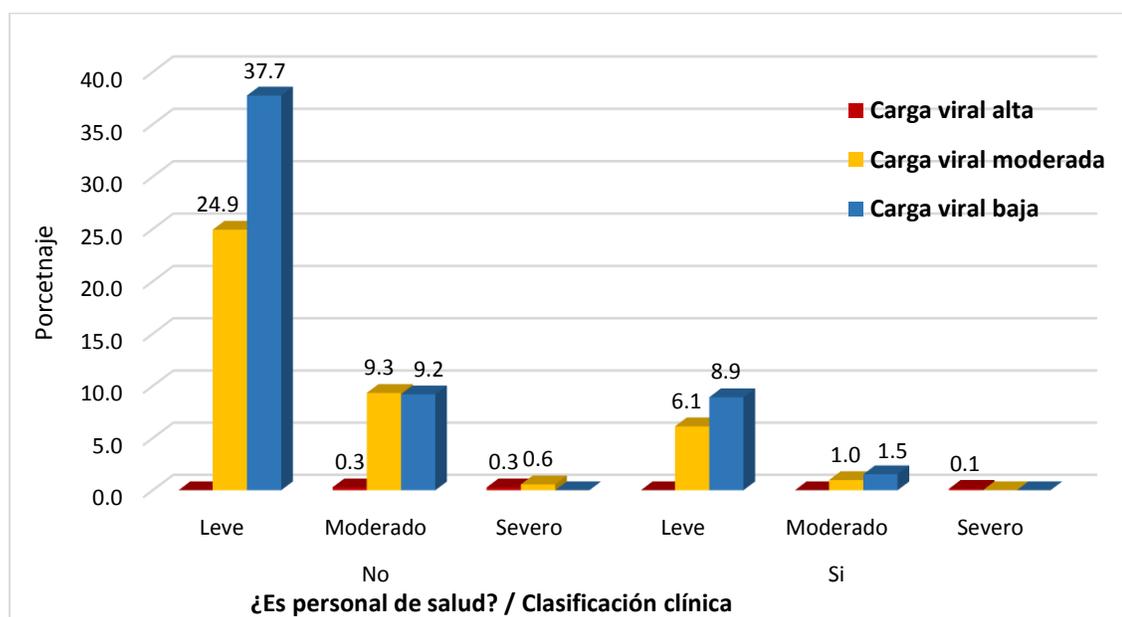


Tabla 4

Contraste del valor Ct y la clasificación clínica de la COVID-19, acorde con el escenario laboral

¿Es trabajador de salud?	Clasificación según signos y síntomas	Valor Ct Gen N canal FAM			X^2 / p-value	Coeficiente de incertidumbre / p-value	Rho Spearman /p-value
		Ct \leq 18.83 (Carga viral alta)	18.83 < Ct \leq 30.10 (carga viral media)	Ct > 30.10 (carga viral baja)			
No	Leve	0	179	271	107.907	0.044	-0.132
	Moderado	2	67	66	0.000	0.000	0.001
	Severo	2	4	0			
Si	Leve	0	44	64	127.022	0.102	-0.032
	Moderado	0	7	11	0.000	0.020	0.723
	Severo	1	0	0			

b) Estratificación de signos y síntomas de acuerdo con el valor Ct en casos positivos a SARS-CoV-2

Las tendencias de las distribuciones de los casos no fueron disimiles como lo analizado en el contraste general, sin embargo, se observó que mayoritariamente la prueba de Chi Cuadrado (X^2) no fue significativa para la mayoría de los casos analizados (Tabla 5), siéndolo solamente para fiebre y escalofrío ($X^2 = 6.476$; $p = 0.039$); diarrea ($X^2 = 9.497$; $p = 0.009$) y anosmia ($X^2 = 6.896$; $p = 0.032$), por lo que estos signos/síntomas dependen del valor Ct del Gen N para los casos positivos a SARS-CoV-2 en el tiempo y realidad estudiada. Complementando este resultado, los coeficientes de incertidumbre (U), no presentaron mucha potencia para estos signos/síntomas pues para el caso del indicador fiebre y escalofrío fue solo de un 0.9%; para diarrea 1.8% y para anosmia 1.9% de reducción del error al pronosticar estos signos/síntomas de pacientes mediante el valor Ct del Gen N.

Tabla 5*Contraste del valor Ct con los signos/síntomas de los casos positivos a COVID-19*

Indicadores	Valor Ct Gen N			X ² / p-value	Coeficiente de incertidumbre / p-value
	Ct ≤ 18.83 (Carga viral alta)	18.83 < Ct ≤ 30.10 (carga viral media)	Ct > 30.10 (carga viral baja)		
¿Es sintomático?					
No	0	25	42	1.251	0.004
Si	5	276	370	0.535	0.423
Dificultad respiratoria					
No	3	244	353	4.735	0.007
Si	2	57	59	0.094	0.118
Tos					
No	1	117	186	3.835	0.004
Si	4	184	226	0.147	0.140
Dolor de garganta					
No	2	119	179	1.101	0.001
Si	3	182	233	0.577	0.576
Fiebre y escalofrío					
No	5	170	260	6.476	0.009
Si	0	131	152	0.039	0.016
Malestar general					
No	1	103	174	5.451	0.006
Si	4	198	238	0.066	0.063
Cefalea					
No	1	182	256	3.792	0.004
Si	4	119	156	0.150	0.152
Diarrea					
No	4	276	346	9.497	0.018
Si	1	25	66	0.009	0.007
Congestión nasal					
No	3	216	308	1.263	0.001
Si	2	85	104	0.532	0.542
Dolor abdominal					
No	5	290	402	1.074	0.006
Si	0	11	10	0.584	0.548
Dolor muscular					
No	4	228	294	1.827	0.002
Si	1	73	118	0.401	0.398
Dolor de articulaciones					
No	5	292	396	0.595	0.004
Si	0	9	16	0.743	0.680
Dolor de pecho					
No	5	275	379	0.542	0.002
Si	0	26	33	0.763	0.622
Nauseas / vómitos					
No	5	285	373	4.653	0.013
Si	0	16	39	0.098	0.075
Ageusia					
No	5	295	391	4.826	0.023
Si	0	6	21	0.090	0.069
Anosmia					
No	5	286	370	6.896	0.019
Si	0	15	42	0.032	0.023
Dolor de espalda					
No	5	298	406	0.391	0.004
Si	0	3	6	0.835	0.807
Irritabilidad / confusión					
No	5	300	406	2.326	0.034
Si	0	1	6	0.313	0.261

c) Comorbilidades y factores asociados estratificados de acuerdo con el valor Ct en casos positivos a SARS-CoV-2

En el cruce de las categorías del valor Ct Gen N con las comorbilidades y factores identificados en cada uno de los casos analizados, se determinó que solamente para la comorbilidad sobrepeso/obesidad se obtuvo diferencia significativa ($X^2= 8.942$; $p = 0.011$) por lo que solo para ésta se determina asociación respecto al valor Ct del Gen N para los casos positivos a SARS-CoV-2. Finalmente, para complementar este resultado, el coeficiente de incertidumbre (U) de este resultado significativo no presentó mucha potencia teniendo solamente un 3.5% de reducción del error al pronosticar la clasificación según el sobrepeso/obesidad de los pacientes mediante el valor Ct del Gen N detectados positivos a SARS-CoV-2.

Tabla 6*Contraste del valor Ct con las comorbilidades/factores de los casos positivos a COVID-19*

Indicadores		Valor Ct Gen N			X ² / p-value	Coeficiente de incertidumbre / p-value
		Ct ≤ 18.83 (Carga viral alta)	18.83 < Ct ≤ 30.10 (carga viral media)	Ct > 30.10 (carga viral baja)		
Comorbilidad						
	No	3	222	329	4.514	0.006
	Si	2	79	83	0.105	0.111
Alergia						
	No	5	300	411	0.064	0.003
	Si	0	1	1	0.968	0.962
Cáncer						
	No	5	296	407	0.325	0.004
	Si	0	5	5	0.850	0.823
Asma						
	No	5	296	409	1.431	0.017
	Si	0	5	3	0.489	0.483
Enfermedad cardiovascular (incluye hipertensión)						
	No	4	270	374	0.830	0.002
	Si	1	31	38	0.660	0.703
Diabetes						
	No	5	292	400	0.155	0.002
	Si	0	9	12	0.925	0.860
Sobrepeso/obesidad						
	No	5	280	402	8.942	0.035
	Si	0	21	10	0.011	0.011
Enfermedad pulmonar crónica						
	No	5	297	409	0.700	0.009
	Si	0	4	3	0.705	0.693
Enfermedad crónica neurológica o neuromuscular						
	No	5	299	408	0.240	0.004
	Si	0	2	4	0.887	0.867
Enfermedad renal						
	No	5	301	409	2.238	0.086
	Si	0	0	3	0.327	0.188
Enfermedad hepática						
	No	5	298	412	4.174	0.135
	Si	0	3	0	0.124	0.073
Hipotiroidismo						
	No	5	299	406	1.047	0.013
	Si	0	2	6	0.593	0.561
Embarazo						
	No	5	299	406	1.047	0.013
	Si	0	2	6	0.593	0.561
Gastritis						
	No	5	299	411	0.765	0.020
	Si	0	2	1	0.682	0.680

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Existen reportes antes de la pandemia por SARS-CoV-2, donde se evaluó el valor Ct como marcador útil de la gravedad y progreso clínico en infecciones respiratorias virales, incluyendo MERS-CoV (Memish et al., 2014) y el coronavirus humano-HCoV (Wishaupt et al., 2017). La detección del ARN del SARS-CoV-2 mediante RT-PCRq, no necesariamente indica presencia de virus infecciosos; Gniazdowski et al., 2020, demostraron que valores altos de Ct no se asocian con crecimiento de SARS-CoV en cultivos celulares, siendo el crecimiento eficiente con Ct bajos, planteando el Ct como indicador de infectividad viral. En este escenario, los resultados en primer lugar muestran una distribución al ingreso del estudio de 77.7% casos leves, 21.3% casos moderados y 1% casos graves, esta distribución inicial concuerda con el espectro de enfermedad reportado en un brote previo (Wu y McGoogan, 2020); al interceptar la clasificación clínica de la COVID-19 con el valor Ct, los resultados muestran correlación débil pero significativa entre ambas variables; sugiriendo que a medida que el valor Ct desciende (carga viral alta) puede presentarse un cuadro más grave de la infección con un coeficiente de incertidumbre de 4.8 %, datos que concuerdan con los hallazgos de Zheng et al., 2020 y Huang et al., 2020 quienes encontraron que casos graves y críticos de COVID-19 presentaban cargas virales significativamente más altas en contraste con los casos leves y pacientes en general que presentaron cargas virales más bajas.

Los resultados se asemejan también a lo encontrado por Yu, X et al., 2020, ellos reportaron que la carga viral alta de muestras del tracto respiratorio inferior está asociada con la gravedad de la COVID-19, estos autores realizaron seguimiento a pacientes en un hospital, comunicando que aquellos con carga viral alta al ingreso tienen mayor probabilidad de agravarse en hospitalización; sin embargo, es necesario mencionar que en esta tesis utilizamos muestras del tracto respiratorio

superior (hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos) que poseen menores niveles de carga viral en comparación del tracto respiratorio inferior, esto podría indicar que la asociación persiste a pesar del lugar de obtención de muestra; incluso existe evidencia que, en muestras respiratorias frescas, la RT-PCRq sin extracción de ARN es una alternativa económica y rápida, con alta tasa de detección del SARS-CoV-2 para todos los materiales respiratorios, frente a una RT-PCRq con extracción (Lübke et al., 2020); respecto a la asociación de Ct y progreso de la enfermedad, en esta tesis no fue posible realizar seguimiento a pacientes, por lo que todos los resultados se establecieron con la clasificación del caso al momento de la toma de muestra. Por otro lado, Rui et al., en el 2020, demostraron que los pacientes asintomáticos de COVID-19 tenían menor carga viral (Ct significativamente mayor) que los asintomáticos que posteriormente presentaron síntomas, esto concuerda con los resultados de esta tesis debido a que los casos asintomáticos se incorporaron dentro del grupo “casos leves” manteniéndose la correlación significativa con el valor Ct (carga viral).

Los resultados obtenidos en esta investigación, concuerdan con los hallazgos de distintos autores, pudiendo plantear la posibilidad que los valores Ct utilizados para estimar de manera indirecta la carga viral pueden servir para evaluar inclusive el pronóstico de la enfermedad causada por el SARS-CoV-2; sin embargo también es importante indicar que en la revisión de la literatura encontramos que los resultados mostrados difieren de los obtenidos por Shah et al., 2021 y Le Borgne et al., 2021, quienes no pudieron demostrar la existencia de correlación entre los valores Ct y la gravedad y mortalidad por la COVID-19, sin embargo, Le Borgne et al., 2021 sugieren que las comorbilidades previas podrían ser más útiles para predecir la gravedad que el mismo virus; Shah et al., 2021 sugieren la posibilidad que los días transcurridos desde la aparición de síntomas hasta la realización de la prueba molecular tienen una relación más fuerte con el Ct en comparación

con la gravedad de la enfermedad; asimismo Gniazdowski et al., 2020, mostraron que el seguimiento en pacientes previamente negativos arrojan resultados positivos con Ct altos, no asociados a recuperación viral en cultivo celular (infectividad), y recomiendan la realización de pruebas repetidas después de la prueba inicial de negativa para SARS-CoV-2, sin embargo estos últimos aspectos no son abordados en esta tesis.

En cuanto al sexo, los resultados muestran correlación con la carga viral, resultados semejantes a los de Yan et al., 2020, quienes indican la existencia de asociación significativa del género con positividad a SARS-CoV-2, estos resultados son diferentes a los de Huang et al., 2020 quienes no encontraron asociación respecto a esta variable; en lo concerniente a la edad, algunos autores también encontraron asociación entre esta variable y la carga viral del SARS-CoV-2 (Huang et al., 2020), los resultados de esta tesis muestran que solamente en los casos menores a 65 se tuvo significancia en la asociación clasificación clínica y valor Ct, los mayores de 65 no tuvieron significancia en el contraste, esto podría indicar que en los adultos mayores de 65 años la posibilidad de agravarse no depende, ni está asociada a mayor carga viral, es decir en este grupo de edad existe la posibilidad de agravarse incluso con cargas virales medias o bajas; esto debido a que el adulto mayor es más vulnerable y susceptible a la COVID-19, presentando manifestaciones atípicas en las que intervienen otros factores involucrados (Serra Valdés, 2020), claramente las personas mayores tienen mayor probabilidad de hacer cuadros graves de esta enfermedad; en un informe de la Organización de las Naciones Unidas se indica que esto se debe a condiciones subyacentes que afectan a adultos mayores de 70 años, indicándose que en América la mayoría de muertes por COVID-19 ocurren en personas mayores de 70 años, y en el grupo de edad entre 60 a 69 años (Organización Panamericana de la Salud, 2020).

Respecto al personal de salud, si bien es cierto se ha descrito porcentajes elevados de

personal sanitario infectado por COVID-19 (Cuenca-Pardo et al., 2020), se ha propuesto que al estar expuestos a cargas virales elevadas por contacto directo, podría ser que el personal sanitario desarrolle cuadros más graves que el resto de la población (Sabio, 2020); sin embargo los hallazgos obtenidos en esta tesis muestran que indistintamente en el personal de salud y en la población general la clasificación clínica depende del valor Ct, además mostramos que únicamente en el grupo que no fue personal de salud (población general) hubo correlación débil significativa entre carga viral y severidad, proponemos que esto podría explicarse a que el personal de salud pese a estar expuesto, cuenta con medidas de bioseguridad implementadas en los establecimientos de salud, incluyendo buenas prácticas, concienciación y equipos de protección individual adecuados que la población general no dispone.

Respecto a los signos y síntomas estratificados según el valor Ct (carga viral) identificamos que la mayoría de estos no fueron significativos respecto a la carga viral, coincidiendo con lo indicado por Kimball et al., 2020; quienes incluso habiendo encontrado valores bajos de Ct, en la mayoría de los sujetos de su estudio, tampoco encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los valores Ct y los grupos de síntomas. En los resultados se muestra que los únicos síntomas/signos asociados significativamente con mayor carga viral fueron fiebre-escalofrío, anosmia y diarrea; esto es similar a lo reportado por Yan et al., 2020 quienes determinaron que los síntomas asociados significativamente con la positividad de COVID-19 fueron fiebre (70%), anosmia (68%) y diarrea (48%) entre otros. Los resultados también son similares a otros estudios en enfermedades respiratorias virales por coronavirus, por ejemplo, Hung et al., 2004 encontró que la carga viral de pacientes con SARS-CoV se asoció con la presencia de cuadros diarreicos. En otro estudio (Cheng et al., 2004) se demostró correlación significativa entre mayor carga de virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) con la

presencia de diarrea.

Respecto a los resultados acerca de fiebre y anosmia asociados significativamente con la carga viral, se ha demostrado que, en enfermedades respiratorias virales, la diseminación viral y la carga viral se correlaciona significativamente con esta fiebre (Boivin et al., 2003; Hung et al., 2004), por otro lado la anosmia se ha descrito en un número considerable de casos de COVID-19, usualmente asociada a fiebre (Vaira et al., 2020); además en comparación con otros síntomas de COVID-19, la pérdida del olfato es uno de los síntomas que mostró mayor magnitud de asociación con la positividad de COVID-19 (Yan et al., 2020; Bagheri et al., 2020), incluso algunos autores encontraron que la anosmia y fiebre se correlacionó con hospitalizaciones por la COVID-19, es decir la anosmia puede estar asociada con COVID-19 y su gravedad (Denis et al., 2020).

En esta tesis mostramos una asociación significativa entre obesidad/sobrepeso y carga viral del SARS-Cov-2, lo cual se refuerza por la evidencia de particularidades que favorecen mayor carga viral del SARS-CoV-2 y diseminación viral más extensa en personas con obesidad (Rubio-Herrera y Bretón-Lesmes, 2021; Ryan y Caplice, 2020), siendo que se reconoce que el tejido adiposo es reservorio del virus y por ende incrementa la carga viral integral (Kruglikov et al., 2020), asimismo se ha demostrado la existencia de asociación significativa entre obesidad y el COVID-19 grave y crítico (Caussy et al; 2020), reportándose que las personas con obesidad tenían más probabilidad de agravarse incluso hasta recibir ventilación mecánica (Goyal et al., 2020), todo esto se relaciona evidentemente a que la obesidad es ampliamente conocida por su condición pro-inflamatoria (Petrilli et al., 2020; Magdy Beshbishy et al., 2020), que conlleva a una disfunción metabólica sistémica, alterando las respuestas inmunitarias frente a la patogenicidad de enfermedades (Ouchi et al., 2011).

Finalmente, si bien es cierto que los resultados obtenidos en la presente investigación

demuestran correlación significativa entre el valor Ct (que expresa indirectamente carga viral) y la clasificación clínica de la COVID-19, compartimos la preocupación del Comité de Microbiología del College of American Pathologists (CAP) quienes reconocen la importancia de estos tipos de estudio, no obstante indican que los valores Ct pueden variar entre distintos métodos, se debe tener precaución al tratar de extrapolar estos datos a otras realidades y como dicho comité lo ha hecho notar, el método de recolección de muestras puede variar la cantidad de ARN viral detectable en la muestra, del mismo modo, considerar que ningún ensayo cuantitativo de SARS-CoV-2 ha recibido autorización por la FDA, tampoco hay material estandarizado de referencia internacional para la validación de ensayos cuantitativos comparables entre fabricantes de kits de diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 (Rhoads, et al., 2021).

Limitaciones del estudio.

Una de las principales limitaciones de este estudio es que el llenado de fichas epidemiológicas en las que nos basamos para la clasificación clínica de la COVID-19, se realizó por diferentes profesionales de la salud en distintos establecimientos de salud de la región, esto podría llevar a falta de información y calidad variable de recogida de datos dependiendo de la experiencia del entrevistador lo cual podría limitar las conclusiones de este estudio; otra limitación del estudio se relaciona con la calidad de la toma de muestra la cual puede interferir en la carga viral, la toma de muestra fue realizada por el personal de laboratorio de los distintos establecimientos de salud; una tercera limitación se relaciona a que la clasificación clínica se estableció en la toma de muestra y en este estudio no se realizó seguimiento de casos por lo que la clasificación podría variar en el tiempo e influir en las conclusiones de esta tesis.

VI. CONCLUSIONES

- Existe correlación significativa ($p=0.002$; Rho Spearman $r=-0.117$) débil e inversa entre la clasificación clínica de la COVID-19 y el valor Ct del SARS-CoV-2 en casos positivos detectados en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca; esto indica que a menor valor Ct (mayor carga viral) se espera una clasificación clínica de mayor severidad. No obstante, debido a que la correlación es débil, su utilidad como predictor de severidad es limitada.
- Se determinó que el sexo, la edad menor a 65 años, la condición como personal de salud o no, se asociaron con el valor Ct y la clasificación de la enfermedad; asimismo la fiebre-escalofrío, diarrea, anosmia y sobrepeso/obesidad estuvieron asociadas al valor Ct en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca.

VII. RECOMENDACIONES

Debido a la particularidad de este trabajo, se recomienda ampliar el estudio incluyendo el monitoreo de las variables: Días transcurridos entre el inicio de síntomas y carga viral más alta, determinando la velocidad de progresión de la enfermedad asociada a carga viral como predictor de letalidad por COVID-19.

VIII. REFERENCIAS

- Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Graciela, M., Munive, R., & Olvera, B. P. (2014). PCR en tiempo real. In *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (pp. 175–202). INECC-SEMARNAT.
- Alonso, D. C., López, M. M., Moral, P. M. T., Flores, A. B., y Pallás, A. C. R. (2020). Primer caso de infección neonatal por SARS-CoV-2 en España [First case of neonatal infection due to SARS-CoV-2 in Spain]. *Anales de Pediatría*, 92(4), 237–238. doi: 10.1016/j.anpedi.2020.03.002
- Bagheri, S. H., Asghari, A., Farhadi, M., Shamshiri, A. R., Kabir, A., Kamrava, S. K., Jalessi, M., Mohebbi, A., Alizadeh, R., Honarmand, A. A., Ghalehbaghi, B., Salimi, A., & Dehghani Firouzabadi, F. (2020). Coincidence of COVID-19 epidemic and olfactory dysfunction outbreak in Iran. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*, 34, 62. doi:10.34171/mjiri.34.62
- Boivin, G., Coulombe, Z., & Wat, C. (2003). Quantification of the influenza virus load by real-time polymerase chain reaction in nasopharyngeal swabs of patients treated with oseltamivir. *The Journal of infectious diseases*, 188(4), 578–580. doi:10.1086/377046
- Bullard, J., Dust, K., Funk, D., Strong, J. E., Alexander D., Garnett, L., ... Poliquin, G. (2020). Predicting Infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 From Diagnostic Samples. *Clinical Infectious Diseases*, 71(10), 2663–2666. doi: 10.1093/cid/ciaa638
- Caussy, C., Pattou, F., Wallet, F., Simon, C., Chalopin, S., Telliam, C., Mathieu, D., Subtil, F., Frobert, E., Alligier, M., Delaunay, D., Vanhems, P., Laville, M., Jourdain, M., Disse, E., & COVID Outcomes HCL Consortium and Lille COVID–Obesity Study Group (2020). Prevalence of obesity among adult inpatients with COVID-19 in France. *The lancet*.

- Diabetes & endocrinology, 8(7), 562–564. doi:10.1016/S2213-8587(20)30160-1
- Cheng, V. C., Hung, I. F., Tang, B. S., Chu, C. M., Wong, M. M., Chan, K. H., Wu, A. K., Tse, D. M., Chan, K. S., Zheng, B. J., Peiris, J. S., Sung, J. J., & Yuen, K. Y. (2004). Viral replication in the nasopharynx is associated with diarrhea in patients with severe acute respiratory syndrome. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38(4), 467–475. doi:10.1086/382681
- Center for Systems Science and Engineering (s.f.). *COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University*. Johns Hopkins University. Recuperado el 05 de septiembre de 2021. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
- Cubillos, K., Pinilla MSC, G., & Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Nova*, 6(9), 65-75. doi:10.22490/24629448.397
- Cuenca-Pardo, J., Ramos-Gallardo, G., Vélez-Benítez, E., et al. (2020). La importancia de reducir la carga viral para disminuir el riesgo de contagio por COVID-19. *Cir Plast*, 30(2):78-93. doi:10.35366/97674.
- Denis, F., Galmiche, S., Dinh, A., Fontanet, A., Scherpereel, A., Benezit, F., & Lescure, F. X. (2020). Epidemiological Observations on the Association Between Anosmia and COVID-19 Infection: Analysis of Data From a Self-Assessment Web Application. *Journal of medical Internet research*, 22(6), e19855. doi:10.2196/19855
- Díaz-Jiménez, I.V. (2020). Interpretation of diagnostic tests for the SARS-Cov-2 virus. *Acta Pediatr Méx*, 41(Supl 1), S51-S57.
- Díaz-Castrillón, F. J., & Toro-Montoya, A. I. (2020). SARS-CoV-2/COVID-19: el virus, la enfermedad y la pandemia. *Medicina y Laboratorio*, 24(3), 183-205. doi:10.36384/01232576.268

- Domeracki, S., Clapp, R. N., Taylor, K., Lu, C.M., Lampiris, H., y Blanc, P.D. (2020). Cycle Threshold to Test Positivity in COVID-19 for Return to Work Clearance in Health Care Workers, *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 62(11), 889-891. doi: 10.1097/JOM.0000000000001996
- Du, S. H., Li, D. R., Wang, H. J., & Wang, Q. (2017). [Application of RT-qPCR in the Study of Forensic Pathology] *Fa yi xue za zhi*, 33(5), 526–531. doi:10.3969/j.issn.1004-5619.2017.05.017
- Gil-Rodrigo, A., Miró, O., Piñera, P., Burillo-Putze, G., Jiménez. S., Martín, A., ... Llorens, P. (2020). Evaluación de las características clínicas y evolución de pacientes con COVID-19 a partir de una serie de 1000 pacientes atendidos en servicios de urgencias españoles. *Emergencias*, 32(4), 233-41.
- Gniazdowski, V., Morris, C. P., Wohl, S., Mehoke, T., Ramakrishnan, S., Thielen, P., Powell, H., Smith, B., Armstrong, D. T., Herrera, M., Reifsnnyder, C., Sevdali, M., Carroll, K. C., Pekosz, A., & Mostafa, H. H. (2020). Repeat COVID-19 Molecular Testing: Correlation of SARS-CoV-2 Culture with Molecular Assays and Cycle Thresholds. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, ciaa1616. Advance online publication. doi:10.1093/cid/ciaa1616
- Gorbalenya, A.E., Baker, S.C., Baric, R.S., de Groot, R.J., Drosten, C., Gulyaeva, A.A., ... Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndromerelated coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5, 536–544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z
- Goyal, P., Choi, J. J., Pinheiro, L. C., Schenck, E. J., Chen, R., Jabri, A., Satlin, M. J., Campion, T. R., Jr, Nahid, M., Ringel, J. B., Hoffman, K. L., Alshak, M. N., Li, H. A., Wehmeyer,

- G. T., Rajan, M., Reshetnyak, E., Hupert, N., Horn, E. M., Martinez, F. J., Gulick, R. M., ... Safford, M. M. (2020). Clinical Characteristics of Covid-19 in New York City. *The New England journal of medicine*, 382(24), 2372–2374. doi:10.1056/NEJMc2010419
- Guo, G., Ye, L., Pan, K., Chen, Y., Xing, D., Yan, K., Chen, Z., Ding, N., Li, W., Huang, H., Zhang, L., Li, X., y Xue, X. (2020). New Insights of Emerging SARS-CoV-2: Epidemiology, Etiology, Clinical Features, Clinical Treatment, and Prevention. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 410. doi: 10.3389/fcell.2020.00410
- Hung, I. F., Cheng, V. C., Wu, A. K., Tang, B. S., Chan, K. H., Chu, C. M., Wong, M. M., Hui, W. T., Poon, L. L., Tse, D. M., Chan, K. S., Woo, P. C., Lau, S. K., Peiris, J. S., & Yuen, K. Y. (2004). Viral loads in clinical specimens and SARS manifestations. *Emerging infectious diseases*, 10(9), 1550–1557. doi:10.3201/eid1009.040058
- Huang, JT, Ran, RX, Lv, ZH, Feng, LN, Ran, CY, Tong, YQ, Li, D., Su, HW, Zhu, CL, Qiu, SL, Yang, J., Xiao, MY, Liu, MJ, Yang, YT, Liu, SM y Li, Y. (2020). Cambios cronológicos de la diseminación viral en pacientes adultos hospitalizados con COVID-19 en Wuhan, China. *Enfermedades infecciosas clínicas: una publicación oficial de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América*, 71 (16), 2158–2166. doi:10.1093/cid/ciaa631
- Ji, W., Wang, W., Zhao, X., Zai, J y Li, X. (2020). Cross- species transmission of the newly identified coronavirus 2019- nCoV. *J Med Virol*. 92(4): 433– 440. doi: 10.1002/jmv.25682
- Khailany, R. A., Safdar, M., & Ozaslan, M. (2020). Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene reports*, 19, 100682. doi:10.1016/j.genrep.2020.100682
- Kimball, A., Hatfield, K. M., Arons, M., James, A., Taylor, J., Spicer, K., Bardossy, A. C., Oakley, L. P., Tanwar, S., Chisty, Z., Bell, J. M., Methner, M., Harney, J., Jacobs, J. R., Carlson, C. M., McLaughlin, H. P., Stone, N., Clark, S., Brostrom-Smith, C., Page, L. C., ... CDC

- COVID-19 Investigation Team (2020). Asymptomatic and Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections in Residents of a Long-Term Care Skilled Nursing Facility - King County, Washington, March 2020. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 69(13), 377–381. doi:10.15585/mmwr.mm6913e1
- Kruglikov, I. L., Shah, M., & Scherer, P. E. (2020). Obesity and diabetes as comorbidities for COVID-19: Underlying mechanisms and the role of viral-bacterial interactions. *eLife*, 9, e61330. doi:10.7554/eLife.61330
- Le Borgne, P., Solis, M., Severac, F., Merdji, H., Ruch, Y., Alamé Intern, K., Bayle, E., Hansmann, Y., Bilbault, P., Fafi-Kremer, S., Meziani, F., & CRICS TRIGGERSEP Group (Clinical Research in Intensive Care and Sepsis Trial Group for Global Evaluation and Research in Sepsis) (2021). SARS-CoV-2 viral load in nasopharyngeal swabs in the emergency department does not predict COVID-19 severity and mortality. *Academic emergency medicine: official journal of the Society for Academic Emergency Medicine*, 28(3), 306–313. doi:10.1111/acem.14217
- Liang, T., Cai, H., Chen, Y., Chen, Z., Fang, Q., Han, W., ...Jianying, Z. (2020). Handbook of COVID-19 Prevention and Treatment. Zhejiang: Universidad de Zhejiang. Recuperado de <https://gmcc.alibabadoctor.com/prevention-manual>
- Lippi, G., Simundic, A. M., y Plebani, M. (2020). Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 58(7), 1070–1076. doi: 10.1515/cclm-2020-0285.
- Liu, R., Han, H., Liu, F., Lv, Z., Wu, K., Liu, Y., Feng, Y. y Zhu, C. (2020). Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China,

- from Jan to Feb 2020. *Clinica Chimica Acta*, 505, 172-175. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.009.
- Lübke, N., Senff, T., Scherger, S., Hauka, S., Andrée, M., Adams, O., Timm, J., & Walker, A. (2020). Extraction-free SARS-CoV-2 detection by rapid RT-qPCR universal for all primary respiratory materials. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 130, 104579. doi:10.1016/j.jcv.2020.104579
- Magdy Beshbishy, A., Hetta, H. F., Hussein, D. E., Saati, A. A., C Uba, C., Rivero-Perez, N., Zaragoza-Bastida, A., Shah, M. A., Behl, T., & Batiha, G. E. (2020). Factors Associated with Increased Morbidity and Mortality of Obese and Overweight COVID-19 Patients. *Biology*, 9(9), 280. doi:10.3390/biology9090280.
- Magleby, R., Westblade, L.F., Trzebucki, A., Simon, M.S., Rajan, M., Park, J., ... Satlin, M. J. (2020). Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality Among Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019, *Clinical Infectious Diseases*, ciaa851. doi: 10.1093/cid/ciaa851
- Memish, Z. A., Al-Tawfiq, J. A., Makhdoom, H. Q., Assiri, A., Alhakeem, R. F., Albarrak, A., Alsubaie, S., Al-Rabeeah, A. A., Hajomar, W. H., Hussain, R., Kheyami, A. M., Almutairi, A., Azhar, E. I., Drosten, C., Watson, S. J., Kellam, P., Cotten, M., & Zumla, A. (2014). Respiratory tract samples, viral load, and genome fraction yield in patients with Middle East respiratory syndrome. *The Journal of infectious diseases*, 210(10), 1590–1594. doi:10.1093/infdis/jiu292
- Mendoza-Ticona, A., Valencia Mesias, G., Quintana Aquehua, A., Cerpa Chacaliza, B., García Loli, G., Álvarez Cruz, C., ... Rivero Vallenias, J. (2020). Clasificación clínica y tratamiento temprano de la COVID-19. Reporte de casos del Hospital de Emergencias Villa

- El Salvador, Lima-Perú, *Acta Med Peru*, 37(2),186-91. doi: 10.35663/amp.2020.372.968
- Ministerio de Salud. (2020a). *Sala Situacional Covid-19 Perú*. Recuperado de https://covid19.minsa.gob.pe/sala_situacional.asp
- Ministerio de Salud (2020b). *Documento técnico Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de personas afectadas por COVID-19 en el Perú* (R.M. N° 193-2020/MINSA). Recuperado de https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/582567/Prevencio%CC%81n_Diagno%CC%81stico_y_Tratamiento_de_personas_afectadas_por_COVID-19_en_el_Peru%CC%81_PDF
- Ministerio de Salud (2020c). *Directiva Sanitaria para la Vigilancia Epidemiológica de la Enfermedad por Coronavirus (COVID-19) en el Perú*. (Directiva Sanitaria N° 122-MINSA/2020/CDC). Recuperado de <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1422276/RM%20N%C2%B0905-2020-MINSA%20DIRECTIVA%20SANITARIA%20122.pdf.pdf>
- Organización Panamericana de la Salud (2020). *Las personas mayores de 60 años han sido las más afectadas por la COVID-19 en las Américas*. Recuperado de <https://www.paho.org/es/noticias/30-9-2020-personas-mayores-60-anos-han-sido-mas-afectadas-por-covid-19-americas>
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews. Immunology*, 11(2), 85–97. doi:10.1038/nri2921
- Petrilli, C. M., Jones, S. A., Yang, J., Rajagopalan, H., O'Donnell, L., Chernyak, Y., Tobin, K. A., Cerfolio, R. J., Francois, F., & Horwitz, L. I. (2020). Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New

- York City: prospective cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 369, m1966.
doi:10.1136/bmj.m1966
- Rao, S. N., Manissero, D., Steele, V. R., y Pareja, J. (2020). A Narrative Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. *Infect Dis Ther*, 9, 573–586. doi: 10.1007/s40121-020-00324-3
- Reina, J., y Suarez, L. (2020). Evaluation of different genes in the RT-PCR detection of SARS-CoV-2 in respiratory samples and its evolution in infection. *Rev Esp Quimioter* 2020, 33(4), 292–293. doi: 10.37201/req/045.2020.
- Rhoads, D., Peaper, D. R., She, R. C., Nolte, F. S., Wojewoda, C. M., Anderson, N. W., & Pritt, B. S. (2021). College of American Pathologists (CAP) Microbiology Committee Perspective: Caution Must Be Used in Interpreting the Cycle Threshold (Ct) Value. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 72(10), e685–e686. doi:10.1093/cid/ciaa1199
- Rubio-Herrera, M. A., & Bretón-Lesmes, I. (2021). Obesidad en tiempos de COVID-19. Un desafío de salud global [Obesity in the COVID era: A global health challenge]. *Endocrinología, diabetes y nutrición*, 68(2), 123–129. doi:10.1016/j.endinu.2020.10.001
- Rui, Z., Li, F., Chen, F., Liua, H., Zheng, J., Lei, C., y Wu, X. (2020). Viral dynamics in asymptomatic patients with COVID-19. *International Journal of Infectious*, 96, 288-290. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.030
- Ryan, P. M., & Caplice, N. M. (2020). Is Adipose Tissue a Reservoir for Viral Spread, Immune Activation, and Cytokine Amplification in Coronavirus Disease 2019? *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 28(7), 1191–1194. doi:10.1002/oby.22843
- Sabio, R. (2020). COVID-19: ¿Cómo podemos proteger al personal sanitario expuesto? *Revista*

Argentina de Medicina, 8(1). Recuperado de <http://revistasam.com.ar/index.php/RAM/article/view/386/344>

- Salas, R., Iannacone, J., Guillén, A., Tantaléan, J., Alvariño L., Castañeda, L., y Cuellar, L. (2020). Coronavirus COVID-19: knowing the cause of the pandemic. *The Biologist (Lima)*, 18(1), 9-27. doi:10.24039/rb2020181442
- Salvatore, P. P., Dawson, P., Wadhwa, A., Rabold, E.M., Buono, S., Dietrich, E.A., ... Kirking, H.L. (2020). Epidemiological Correlates of PCR Cycle Threshold Values in the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clinical Infectious Diseases*, ciaa1469. doi: 10.1093/cid/ciaa1469
- Serra Valdés, M.A. (2020). COVID-19. De la patogenia a la elevada mortalidad en el adulto mayor y con comorbilidades. *Rev haban cienc méd*, 19(3):e3379.
- Shah, S., Singhal, T., Davar, N., y Thakkar, P. (2021). No correlation between Ct values and severity of disease or mortality in patients with COVID 19 disease. *Indian journal of medical microbiology*, 39(1), 116–117. doi:10.1016/j.ijmmb.2020.10.021
- Tamay, D.L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2):70-78.
- Tang Y-W., Schmitz, J. E., Persing, D. H., Stratton, C. W. (2020). Laboratory diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. *J Clin Microbiol* 58(6), e00512-20. doi: 10.1128/JCM.00512-20
- Vaira, L. A., Salzano, G., Deiana, G., & De Riu, G. (2020). Anosmia and Ageusia: Common Findings in COVID-19 Patients. *The Laryngoscope*, 130(7), 1787. doi:10.1002/lary.28692
- Wagner E. M. (2013). Monitoring gene expression: quantitative real-time rt-PCR. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1027, 19–45. doi:10.1007/978-1-60327-369-5_2

- Wishaupt, J. O., Van der Ploeg, T., Smeets, L. C., De Groot, R., Versteegh, F. G .A., y Hartwig, N. G. (2020). Pitfalls in interpretation of CT-values of RT-PCR in children with acute respiratory tract infections. *Journal of Clinical Virology*, 90, 1-6. doi: 10.1016/j.jcv.2017.02.010
- World Health Organization. (2020). *Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human case: interim guidance, 2 March 2020*. Recuperado de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>
- Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., Wang, Y., ... Li, H. (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(5), 766-788. doi: 10.1016/j.apsb.2020.02.008
- Wu, Z., McGoogan, J.M. (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. *JAMA*, 323(13):1239–1242. doi:10.1001/jama.2020.2648
- Yan, C. H., Faraji, F., Prajapati, D. P., Boone, C. E., & DeConde, A. S. (2020). Association of chemosensory dysfunction and COVID-19 in patients presenting with influenza-like symptoms. *International forum of allergy & rhinology*, 10(7), 806–813. doi:10.1002/alr.22579
- Yu, A., Pak, A. J., He, P., Monje-Galvan, V., Casalino, L., Gaieb, Z., Dommer, A. C., Amaro, R. E., & Voth, G. A. (2021). A multiscale coarse-grained model of the SARS-CoV-2 virion. *Biophysical journal*, 120(6), 1097–1104. doi:10.1016/j.bpj.2020.10.048
- Yu, F., Yan, L., Wang, N., Yang, S., Wang, L., Tang, Y., ...Zhang, F.(2020). Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients. *Clinical*

Infectious Diseases, 71(15), 793–798. doi: 10.1093/cid/ciaa345.

Yu, X., Sun, S., Shi, Y., Wang, H., Zhao, R., y Sheng, J. (2020). SARS-CoV-2 viral load in sputum correlates with risk of COVID-19 progression. *Critical Care*, 24, 170. doi: 10.1186/s13054-020-02893-8

Zheng, S., Fan, J., Yu, F., Feng, B., Lou, B., Zou, Q., Xie, G., Lin, S., Wang, R., Yang, X., Chen, W., Wang, Q., Zhang, D., Liu, Y., Gong, R., Ma, Z., Lu, S., Xiao, Y., Gu, Y., Zhang, J., ... Liang, T. (2020). Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 369, m1443. doi:10.1136/bmj.m1443

IX. ANEXOS

ANEXO A.

CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA COVID-19 SEGÚN NORMATIVA EN PERÚ

Enfermedad	Clasificación de caso	Características
COVID-19	Severo	Persona con infección respiratoria aguda con dos o más de los siguientes criterios: a) Alteración del nivel de la conciencia. b) Frecuencia respiratoria >22 respiraciones por minuto o PaCo ₂ <32mmHg, c) Presión arterial sistólica menor a 100 mmHg o PAM <65 mmHg, d) Signos clínicos de fatiga muscular: aleteo nasal, uso de músculos accesorios, desbalance torácico abdominal. Necesidad de ventilación mecánica.
	Moderado	Persona con infección respiratoria aguda que cumple alguno de los siguientes requisitos: a) Disnea o dificultad respiratoria, b) Saturación de oxígeno menor a 95%, c) Frecuencia respiratoria >22 respiraciones por minuto, d) Desorientación, confusión, e) Hipotensión arterial o shock, f) Signos clínico o radiológicos de neumonía.
	Leve	Persona con infección respiratoria aguda que presenta al menos dos de los siguientes síntomas: tos, malestar general, dolor de garganta, fiebre, congestión nasal, pueden presentar alteraciones de gusto olfato y exantema.

Fuente: Adaptado de Ministerio de Salud-PERÚ (2020b). Documento técnico Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de personas afectadas por COVID-19 en el Perú.

ANEXO B.

FICHA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA DE COVID-19

 PERU Ministerio de Salud Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades		FICHA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA COVID-19	
I. DATOS GENERALES DE LA NOTIFICACIÓN			
1. Fecha notificación: ____/____/____		4. Inst. Adm: <input type="checkbox"/> Minsa	
2. GERESA/DIRESA/DIRIS: _____		<input type="checkbox"/> EsSalud	
3. IPRESS: _____		<input type="checkbox"/> FFAA / PNP	
5. Clasificación del caso: <input type="checkbox"/> Confirmado <input type="checkbox"/> Probable <input type="checkbox"/> Sospechoso		<input type="checkbox"/> Privado	
II. DATOS DEL PACIENTE			
6. Apellidos y nombres: _____		7. N° Teléfono: _____	
8. Fecha de nacimiento: ____/____/____		9. Edad: ____ <input type="checkbox"/> Año <input type="checkbox"/> Mes <input type="checkbox"/> Día	
10. Sexo: <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Femenino		11. N° DNI/CE/Pasaporte: _____	
12. Peso: _____ gramos		13. Talla: _____ metros	
14. Etnia o raza: <input type="checkbox"/> Mestizo <input type="checkbox"/> Andino <input type="checkbox"/> Asiático descendiente			
<input type="checkbox"/> Afrodescendiente <input type="checkbox"/> Indígena amazónico <input type="checkbox"/> Otro _____			
15. Nacionalidad <input type="checkbox"/> Peruano <input type="checkbox"/> Extranjero		País de nacionalidad: _____	
16. Migrante <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No		País de origen: _____	
17. Dirección de residencia actual: _____ País: _____			
Departamento: _____		Provincia: _____	Distrito: _____
III. ANTECEDENTES EPIDEMIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS			
18. Fecha de inicio de síntomas: ____/____/____		Fecha de inicio de aislamiento: ____/____/____	
19. Lugar probable de infección: _____			
Departamento: _____		Provincia: _____	Distrito: _____
20. Síntomas:			
<input type="checkbox"/> Tos	<input type="checkbox"/> Malestar general	<input type="checkbox"/> Dolor de oído	
<input type="checkbox"/> Dolor de garganta	<input type="checkbox"/> Diarrea	<input type="checkbox"/> Irritabilidad/confusión	
<input type="checkbox"/> Congestión nasal	<input type="checkbox"/> Náuseas/vómitos	<input type="checkbox"/> Dolor Marque todos los que aplica:	
<input type="checkbox"/> Dificultad respiratoria	<input type="checkbox"/> Cefalea	() Muscular	() Pecho
<input type="checkbox"/> Fiebre	<input type="checkbox"/> Anosmia	() Abdominal	() Articulaciones
<input type="checkbox"/> Escalofrío	<input type="checkbox"/> Ageusia		
<input type="checkbox"/> Otros, especificar: _____			
21. Signos:			
<input type="checkbox"/> Exudado faríngeo	<input type="checkbox"/> Disnea/taquipnea	<input type="checkbox"/> Hallazgos anormales en radiografía	
<input type="checkbox"/> Inyección conjuntival	<input type="checkbox"/> Auscultación pulmonar anormal	<input type="checkbox"/> Hallazgos anormales en ecografía	
<input type="checkbox"/> Convulsión			<input type="checkbox"/> Hallazgos anormales en tomografía
<input type="checkbox"/> Otros, especificar: _____			<input type="checkbox"/> Hallazgos anormales en RMN
22. Condiciones de comorbilidad o factores de riesgo			
<input type="checkbox"/> Embarazo (Edad gestacional: _____)	<input type="checkbox"/> Post parto/aborto (< 6 semanas o 42 días)		
<input type="checkbox"/> Enfermedad cardiovascular (incluye hipertensión)	<input type="checkbox"/> Inmunodeficiencia (incluye VIH)		
<input type="checkbox"/> Diabetes	<input type="checkbox"/> Enfermedad renal		
<input type="checkbox"/> Enfermedad hepática	<input type="checkbox"/> Enfermedad pulmonar crónica		
<input type="checkbox"/> Enfermedad crónica neurológica o neuromuscular	<input type="checkbox"/> Asma		
<input type="checkbox"/> Obesidad	<input type="checkbox"/> Cáncer		
<input type="checkbox"/> Tuberculosis			
<input type="checkbox"/> Otros, especificar: _____			
23. Fecha de culminación del embarazo: ____/____/____			



24. Ocupación <input type="checkbox"/> Trabajador de Salud → Si es trabajador de salud, especificar profesión: <input type="checkbox"/> Policía <input type="checkbox"/> Médico <input type="checkbox"/> Laboratorista <input type="checkbox"/> Militar <input type="checkbox"/> Enfermera <input type="checkbox"/> Técnico en enfermería <input type="checkbox"/> Estudiante <input type="checkbox"/> Obstetra <input type="checkbox"/> Otros _____ <input type="checkbox"/> Otros especificar _____ 25. Lugar de trabajo IPRESS _____ Departamento _____ Provincia _____ Distrito _____				
26. ¿Ha tenido contacto directo con una caso sospechoso, probable o confirmado en los 14 días previos al inicio de síntomas? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido Si la respuesta es sí, marque según corresponda: <input type="checkbox"/> Entorno de salud <input type="checkbox"/> Entorno familiar <input type="checkbox"/> Entorno laboral <input type="checkbox"/> Casa de reposo <input type="checkbox"/> Centro penitenciario <input type="checkbox"/> Albergue <input type="checkbox"/> Desconocido <input type="checkbox"/> Otros, especifique: _____				
IV. HOSPITALIZACIÓN (Si fue hospitalizado, complete la siguiente información)				
27. Hospitalizado: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No 28. Fecha de hospitalización: ____/____/____				
29. Nombre del Hospital: _____ Tipo de seguro: _____				
30. Diagnóstico de ingreso: _____				
31. Signos: <input type="checkbox"/> Convulsión <input type="checkbox"/> Coma <input type="checkbox"/> Hallazgos anormales en radiografía <input type="checkbox"/> Disnea/taquipnea <input type="checkbox"/> Auscultación pulmonar anormal <input type="checkbox"/> Hallazgos anormales en ecografía <input type="checkbox"/> Otros, especifique: _____ <input type="checkbox"/> Hallazgos anormales en tomografía <input type="checkbox"/> Hallazgos anormales en RMN				
32. Servicio de hospitalización: <input type="checkbox"/> Sala de aislamiento <input type="checkbox"/> UCI <input type="checkbox"/> Otro _____				
33. El paciente estuvo en ventilación mecánica: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido				
34. ¿El caso está o estuvo intubado en algún momento durante la enfermedad? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No				
35. ¿El caso tiene o tuvo diagnóstico de neumonía durante la enfermedad? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No				
VI. EVOLUCIÓN				
36. Evolución del paciente: <input type="checkbox"/> Favorable <input type="checkbox"/> Desfavorable <input type="checkbox"/> Falleció <input type="checkbox"/> Alta				
37. Fecha de alta, si aplica: ____/____/____				
38. Fecha de defunción, si aplica: ____/____/____ 39. Hora de defunción: ____:____				
40. Lugar de defunción: <input type="checkbox"/> Hospital / Clínica <input type="checkbox"/> Vivienda <input type="checkbox"/> Centro de aislamiento temporal <input type="checkbox"/> Centro penitenciario <input type="checkbox"/> Via pública <input type="checkbox"/> Otras: _____				
V. LABORATORIO				
41. Fecha de toma de muestra: ____/____/____	42. Tipo de muestra: _____	43. Tipo de prueba <input type="checkbox"/> Prueba molecular <input type="checkbox"/> Prueba antigénica <input type="checkbox"/> Prueba serológica	44. Resultado <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	45. Fecha resultado ____/____/____
2 ____/____/____	_____	<input type="checkbox"/> Prueba molecular <input type="checkbox"/> Prueba antigénica <input type="checkbox"/> Prueba serológica	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	____/____/____
3 ____/____/____	_____	<input type="checkbox"/> Prueba molecular <input type="checkbox"/> Prueba antigénica <input type="checkbox"/> Prueba serológica	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	____/____/____
VI. INVESTIGADOR				
45. Persona que llena la ficha: _____				
46. Firma y sello				



Fuente: Ministerio de Salud (2020c). Directiva Sanitaria N° 122-MINSA/2020/CDC

ANEXO C

KIT DE EXTRACCIÓN VIRAL Y PREPARACIÓN DE BUFFERS PARA EL USO EN OPENTRONS

KIT DE PURIFICACIÓN DE ARN VIRAL SBEADEx™.



Componentes del kit de extracción viral

PREPARACIÓN DE REACTIVOS DEL KIT DE EXTRACCIÓN PREVIO AL USO DEL OPENTRONS (96 MUESTRAS)

PASO 1:

- Agregar 100 uL de muestra inicial en la placa de 2ml.
- Adicionar 100 uL de buffer de lisis por muestra.
- Usar pipeta multicanal de 200 uL y un reservorio de 15 mL de lisis para que alcance para toda la placa.

PASO 2:

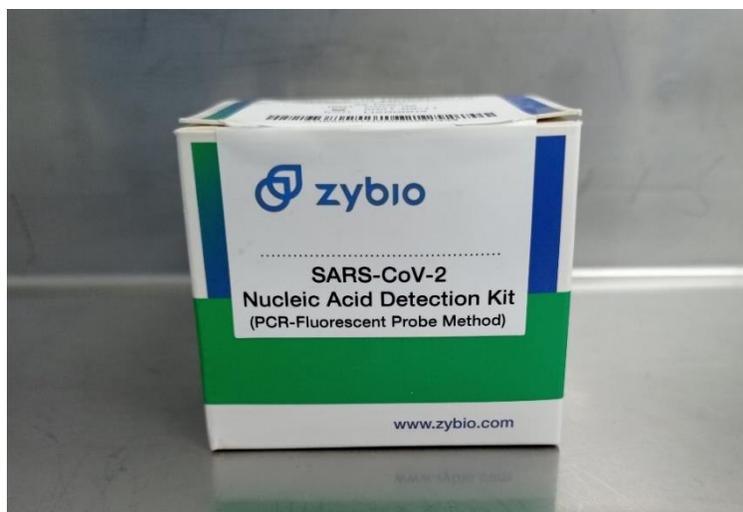
- Preparar una mezcla de 16.8 mL de binding buffer + 2.1 mL de perlas(beads) en un falcon de 50 ml.
- Adicionar la mezcla en un reservorio, con una pipeta multicanal de 200 uL, dispensar 180 uL por muestra, homogenizando.

VOLÚMENES DE LISIS Y MEZCLA DE BUFFER BINDING MÁS PERLAS

Lisis		
Número de muestras	Volumen de lisis en reservorio (mL)	Volumen por muestra a dispensar con multicanal
8	3.8	100 uL
16	4.6	100 uL
24	5.4	100 uL
32	6.2	100 uL
40	7.0	100 uL
48	7.8	100 uL
56	8.6	100 uL
64	9.4	100 uL
72	10.2	100 uL
80	11.0	100 uL
88	11.8	100 uL
96	12.6	100 uL

Mezcla de buffer binding + perlas magnéticas				
Número de muestras	Binding (mL)	Beads (mL)	Mezcla (mL)	Volumen por muestra a dispensar con multicanal
8	4	0.5	4.5	180 uL
16	5.28	0.66	5.94	180 uL
24	6.56	0.82	7.38	180 uL
32	7.84	0.98	8.82	180 uL
40	9.12	1.14	10.26	180 uL
48	10.4	1.3	11.7	180 uL
56	11.68	1.46	13.14	180 uL
64	12.96	1.62	14.58	180 uL
72	14.24	1.78	16.02	180 uL
80	15.52	1.94	17.46	180 uL
88	16.8	2.1	18.9	180 uL
96	18.08	2.26	20.34	180 uL

ANEXO D
COMPONENTES Y PREPARACIÓN DEL KIT DE AMPLIFICACIÓN ZYBIO
(SARS-CoV-2)



Presentación del Kit

Componentes principales

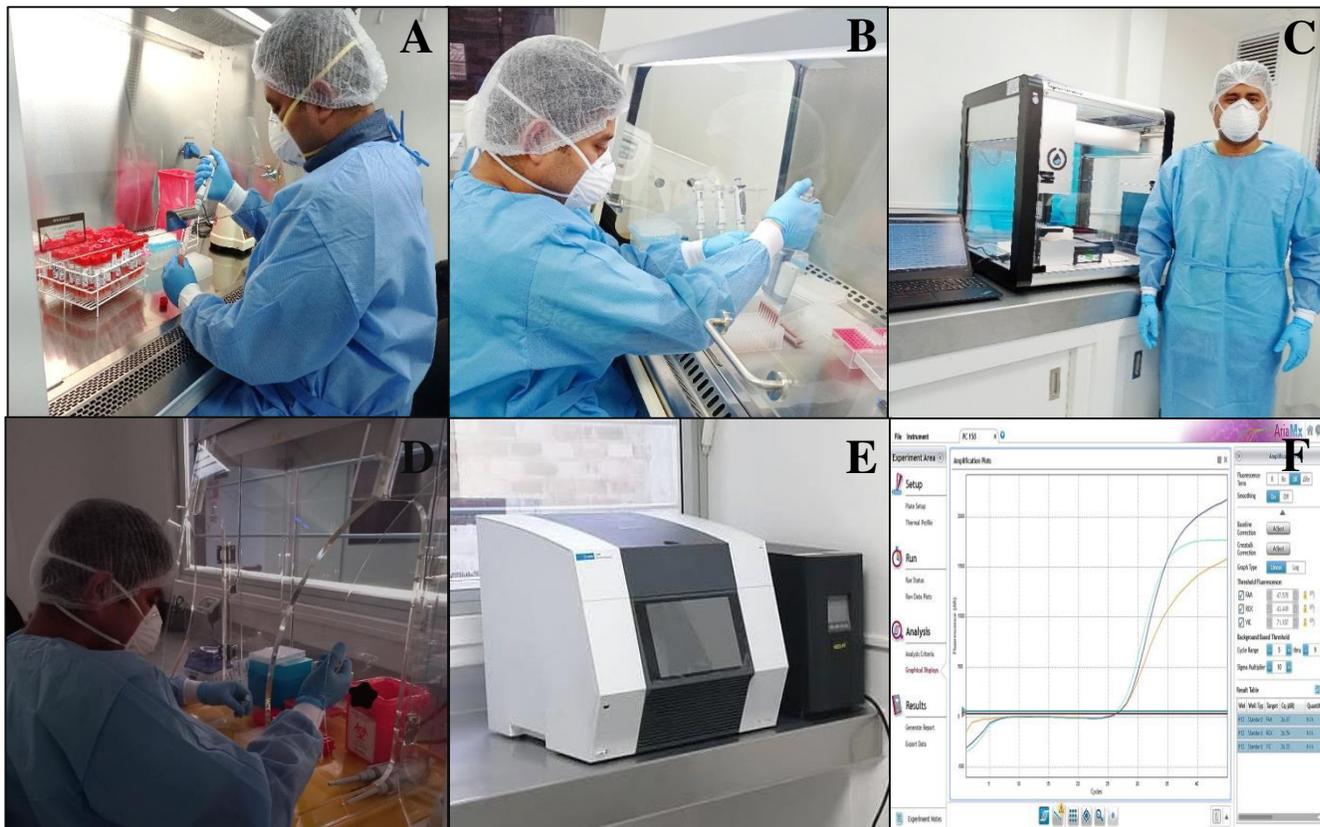
Nº	Componentes	constituyentes principales	Volumen (uL)
1	Solución de reacción de PCR SARS-Cov-2	Buffer Tris-HCl, dNTPs, Mg ²⁺ , Sondas y primers	256
2	Solución enzimática SARS-Cov-2	Transcriptasa reversa, Taq AND Polimerasa, Uracil N-Glycosylasa (UNG)	64
3	Control Negativo SARS-Cov-2	0.9% (w/v) NaCl	800
4	Control positivo SARS-Cov-2	Virus blindado conteniendo secuencia diana del SARS-Cov-2	800
5	Control interno SARS-Cov-2	Virus blindado conteniendo secuencia de fragmentos de control interno	32

Preparación de los reactivos del kit

Constituyentes	Volumen (uL) por reacción
Solución de reacción de PCR SARS-Cov-2	8
Solución enzimática SARS-Cov-2	2
Total volumen por reacción	10
Muestra	10

ANEXO E

FASES GENERALES DEL PROCESO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



Se muestran las etapas y áreas en el proceso de detección del SARS-CoV-2 en el Laboratorio de Biología Molecular de Diresa Cajamarca. (A) Área de alicuotado exclusiva para esta etapa, el proceso se continúa en el área de extracción donde se realiza: (B) Preparación de buffers para extracción, acondicionamiento de estos en los reservorios del equipo; (C) extracción de ARN viral de manera semiautomatizada con el equipo Opentrons. (D) Área limpia con luz tenue exclusiva para la preparación del master mix. (E) Área de Siembra y amplificación, se muestra la plataforma de PCR real time AriaMx-agilent. (F) Lectura e interpretación, en la imagen se muestra la interfaz del software del termociclador.

ANEXO F

AUTORIZACIÓN DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DIRESA CAJAMARCA



GOBIERNO REGIONAL DE CAJAMARCA
DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD CAJAMARCA
Centro Regional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades
"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"



OFICIO N° 223 - 2021-GR.CAJ-DRSC-ORE

MAD: 5582443

Cajamarca, 15 de enero de 2021

Señor:
MPH(c) Hans Ramón Quiroz Ruiz

Presente.-

ASUNTO : AUTORIZACIÓN PARA REALIZAR TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REFERENCIA : SOLICITUD S/N (MAD 5567140)

De mi especial consideración:

Tenemos el grado de dirigirnos a usted para saludarle y acusar recibo de su documento de autorización para realizar el trabajo de investigación titulada: **"Clasificación clínica de la COVID-19 y su correlación con el valor Ct del RT-PCRq en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el laboratorio de biología molecular – Diresa Cajamarca"**.

Al respecto, la Unidad de Investigación de la Oficina Regional de Epidemiología de la DIRESA Cajamarca, **AUTORIZA** realizar el trabajo de investigación mencionado en el párrafo anterior, debiendo cumplir las buenas prácticas de investigación.

Sin otro particular quedo de usted, no sin antes manifestarle las muestras de mi especial consideración y estima personal.

Atentamente;

GOBIERNO REGIONAL DE CAJAMARCA
DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD

Pedro Alejandro Cruzado Puente
DIRECTOR REGIONAL

PACP/MSZG/kvoch
C.c. Archivo
Folios: 01

ANEXO G

AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO DE REFERENCIA REGIONAL DIRESA CAJAMARCA



GOBIERNO REGIONAL CAJAMARCA
DIRECCION REGIONAL DE SALUD CAJAMARCA
DIRECCION DE LABORATORIO DE REFERENCIA REGIONAL



“Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia”

MAD: 5582062

OFICIO N° 10 -2021-GR.CAJ DRSC/LRR

Cajamarca, 15 de enero de 2021

Señor:

Mblgo. Hans Ramón Quiroz Ruiz

Cajamarca. -

ASUNTO : Autorización para ejecución de trabajo de investigación
REFERENCIA : Solicitud S/N (MAD 5567140)

De mi especial consideración:

Es grato dirigirme a usted para saludarle cordialmente y a la vez respecto a la solicitud presentada, comunicarle: Que el Director del Laboratorio de Referencia Regional de Salud Pública de la Dirección Regional de Salud Cajamarca, **autoriza** a Hans Ramón Quiroz Ruiz, egresado de la Segunda Especialidad en Genética y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, para realizar la ejecución de su proyecto de investigación titulado: **“CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA COVID-19 Y SU CORRELACIÓN CON EL VALOR Ct DEL RT-PCRq EN CASOS POSITIVOS A SARS-CoV-2 DETECTADOS EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR- DIRESA CAJAMARCA”**.

Por tal motivo como investigador deberá cumplir con las buenas prácticas de investigación, sujetándose a las normas existentes.

Es propicia la oportunidad para reiterarle las muestras de mi consideración y estima.

Atentamente

JEBM/mvp
Cc. Archivo
01 folio

GOBIERNO REGIONAL CAJAMARCA
DIRECCION REGIONAL DE SALUD
Jorge Enrique Baza Mayra
DIRECCION DE LABORATORIO DE REFERENCIA
REGIONAL DE SALUD PUBLICA

ANEXO H

APROBACIÓN DEL COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo
Red Asistencial Lambayeque
Comité Institucional de Ética en Investigación

“Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia”

CERTIFICADO DE APROBACIÓN ÉTICA N° 22

El Comité Institucional de Ética en Investigación de la Red Asistencial Lambayeque “Juan Aita Valle”, hace constar que el protocolo de investigación señalado a continuación fue **APROBADO**.

- **Título del Estudio:** “Clasificación clínica de la COVID-19 y su correlación con el valor Ct del RT-PCRq en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el laboratorio de biología molecular- Diresa Cajamarca”
- **Investigador (es):** MPH. Hans Ramón Quiroz Ruiz
- **Asesor (es):** Ph.D. Pedro Jorge Chimoy Effio
- **Institución:** UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL. FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA. Segunda Especialidad en Genética y Biología Molecular.

Para la aprobación se ha considerado el cumplimiento de pautas éticas en investigación, incluyendo el balance beneficio/riesgo, confidencialidad de los datos y otros.

Cualquier enmienda en los objetivos secundarios, metodología y aspectos éticos debe ser solicitada a este comité.

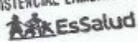
El periodo de vigencia de la presente aprobación será de **04 meses**; desde el 20 de Abril hasta el 20 de Agosto del 2021, debiendo solicitar la renovación con 30 días de anticipación.

Sírvanse enviar el **informe final del estudio**, una vez concluido el mismo a la Unidad de Capacitación Investigación y Docencia del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo.

Chiclayo, 20 de Abril del 2021

CDV/cva
(CIEI-RAL: 022-ENE-2021)
Folios: ()

NIT	7550	2021	17
-----	------	------	----

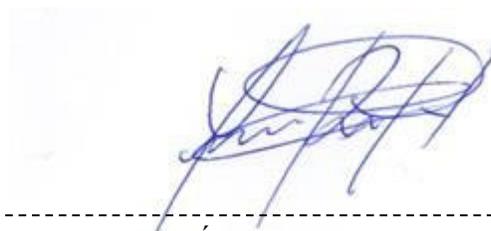

Dr. Stalin Tello Vera
PRESIDENTE TITULAR
COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
RED ASISTENCIAL LAMBAYEQUE - JAV


ANEXO I

MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES E INDICADORES																
<p>PROBLEMA GENERAL ¿Existe correlación entre la clasificación clínica de la COVID19 y el valor Ct del RT-PCRq en los casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca?</p> <p>PROBLEMAS ESPECÍFICOS ¿cuáles son los puntos de corte para agrupar valores Ct que permitan establecer carga viral: alta, baja y media?</p> <p>¿Cuáles son las características epidemiológicas estratificadas de acuerdo con el valor Ct en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados mediante RT-PCRq en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca?</p>	<p>OBJETIVO GENERAL Determinar la correlación entre la clasificación clínica de la COVID-19 y el valor Ct de la RT-PCRq en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca.</p> <p>OBJETIVO ESPECÍFICO Establecer puntos de corte para agrupar valores Ct que permitan establecer carga viral: alta, baja y media.</p> <p>Determinar las características epidemiológicas estratificadas de acuerdo con el valor Ct en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados mediante RT-PCRq en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca.</p>	<p>H0: La clasificación clínica de la COVID-19 no está asociada (no es dependiente) al valor Ct de la RT-PCRq en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca.</p> <p>Ha: La clasificación clínica de la COVID-19 está asociada (es dependiente) al valor Ct de la RT-PCRq en casos positivos a SARS-CoV-2 detectados en el Laboratorio de Biología Molecular-Diresa Cajamarca.</p>	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE: Valor Ct de la RT-PCR de casos positivos a SARS-CoV-2.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</th> <th>INDICADOR</th> <th>DIMENSIÓN</th> <th>ESCALA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Medida semi cuantitativa relativa a la concentración de la secuencia diana en la RT- PCR, obtenida entre la intervención de la curva de amplificación y el Threshold</td> <td>Valor numérico del Ciclo de umbral (Ct)</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> • Valor Ct bajo • Valor Ct medio • Valor Ct alto </td> <td>Ordinal</td> </tr> </tbody> </table> <p>VARIABLE. DEPENDIENTE: Clasificación clínica de la COVID-19</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</th> <th>INDICADOR</th> <th>DIMENSIÓN</th> <th>ESCALA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Características clínicas que permiten determinar el nivel de severidad del paciente con COVID-19 confirmado</td> <td>Síntomas, signos y demás datos registrados en la ficha epidemiológica y que permitan clasificar el caso según normativa vigente</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> • Caso leve • Caso moderado • Caso severo </td> <td>Ordinal</td> </tr> </tbody> </table>	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADOR	DIMENSIÓN	ESCALA	Medida semi cuantitativa relativa a la concentración de la secuencia diana en la RT- PCR, obtenida entre la intervención de la curva de amplificación y el Threshold	Valor numérico del Ciclo de umbral (Ct)	<ul style="list-style-type: none"> • Valor Ct bajo • Valor Ct medio • Valor Ct alto 	Ordinal	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADOR	DIMENSIÓN	ESCALA	Características clínicas que permiten determinar el nivel de severidad del paciente con COVID-19 confirmado	Síntomas, signos y demás datos registrados en la ficha epidemiológica y que permitan clasificar el caso según normativa vigente	<ul style="list-style-type: none"> • Caso leve • Caso moderado • Caso severo 	Ordinal
DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADOR	DIMENSIÓN	ESCALA																
Medida semi cuantitativa relativa a la concentración de la secuencia diana en la RT- PCR, obtenida entre la intervención de la curva de amplificación y el Threshold	Valor numérico del Ciclo de umbral (Ct)	<ul style="list-style-type: none"> • Valor Ct bajo • Valor Ct medio • Valor Ct alto 	Ordinal																
DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADOR	DIMENSIÓN	ESCALA																
Características clínicas que permiten determinar el nivel de severidad del paciente con COVID-19 confirmado	Síntomas, signos y demás datos registrados en la ficha epidemiológica y que permitan clasificar el caso según normativa vigente	<ul style="list-style-type: none"> • Caso leve • Caso moderado • Caso severo 	Ordinal																

TIPO Y DISEÑO	POBLACIÓN Y MUESTRA	INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTOS	ANÁLISIS DE DATOS
<p>La presente investigación es de tipo observacional correlacional de corte transversal.</p>	<p>POBLACIÓN:</p> <p>Casos positivos a SARS-CoV-2 mediante RT-PCRq, detectados en el Laboratorio de Biología Molecular- Diresa Cajamarca, en el periodo comprendido de septiembre 2020 a enero 2021, sumando un total de 1486 casos positivos.</p> <p>MUESTRA:</p> <p>Se calculó mediante la plataforma WinEpi: Working in Epidemiology), apartado "muestreo aleatorio y diagnóstico perfecto", nivel de confianza 95%, tamaño de la población 1486, proporción esperada 34% y un error absoluto de 2.5%; la plataforma indicó seleccionar una muestra de 726 individuos, se excluyeron 8 casos y finalmente se trabajó con 718 casos elegibles.</p> <p>TECNICA DE MUESTREO</p> <p>Muestreo aleatorio simple utilizando la misma plataforma proporcionando listado</p>	<p>INSTRUMENTOS</p> <p>Ficha clínico-epidemiológica del ministerio de Salud de Perú de los casos confirmados para SARS-CoV-2; cada ficha se vinculó con su respectiva lectura del valor de umbral de ciclo, para lo cual se utilizó una base de datos en Excel.</p> <p>PROCEDIMIENTOS</p> <p>1. Obtención de muestras</p> <p>Hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo en Medio de transporte viral transportado en cadena de frío</p> <p>2.Extracción de ARN viral</p> <p>Se usó el kit de purificación de ARN viral SbeadexTM siguiendo recomendaciones de fabricante</p> <p>3.RT-qPCR</p> <p>Se usó el termociclador real AriaMx modelo G883A y el kit comercial SARS- CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit Zybío la lectura se realizó según inserto del fabricante</p>	<p>Se utilizó el software IBM SPSS Statistics 25.</p> <p>Primero mediante el estimador bponderado de Tukey se estableció los puntos de corte para los valores Ct respecto a la clasificación clínica de la COVID-19.</p> <p>Para establecer correlación entre ambas variables se utilizó el Rho de Spearman, se calculó el coeficiente de incertidumbre.</p> <p>Para el caso de la estratificación de características epidemiológicas asociadas al Ct se utilizó en Chi cuadrado, también se midió el coeficiente de incertidumbre.</p>

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Hans Ramón Quiroz Ruiz', written in a cursive style.

HANS RAMÓN QUIROZ RUIZ
AUTOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Pedro Jorge Chimoy Effio', written in a cursive style.

Ph.D. PEDRO JORGE CHIMOY EFFIO
ASESOR