



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**EVALUACIÓN DEL SISTEMA AUTOMATIZADO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS  
NUCLEICOS MGISP-960 Y AMPLIFICACIÓN POR EL TERMOCICLADOR  
CFX96TM DE BIO-RAD PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2**

**Línea de investigación:**

**Genética, bioquímica y biotecnología**

Trabajo académico para optar el Título de Especialista en Genética y Biología

Molecular

**Autora:**

Huamán Angeles, Estela Alejandra

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés  
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

**Jurado:**

Saez Flores, Gloria Maria  
Riveros Ramirez, Maribel Denise  
Mayanga Herrera, Ana Lucia

**Lima - Perú**

**2024**



# EVALUACIÓN DEL SISTEMA AUTOMATIZADO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MGISP-960 Y AMPLIFICACIÓN POR EL TERMOCICLADOR CFX96TM DE BIO-RAD PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2

## INFORME DE ORIGINALIDAD

21%

INDICE DE SIMILITUD

20%

FUENTES DE INTERNET

7%

PUBLICACIONES

7%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

|   |  |    |
|---|--|----|
| 1 | <a href="http://www.flickr.com">www.flickr.com</a><br>Fuente de Internet                   | 2% |
| 2 | <a href="http://alerta.salud.gob.sv">alerta.salud.gob.sv</a><br>Fuente de Internet         | 2% |
| 3 | <a href="http://polodelconocimiento.com">polodelconocimiento.com</a><br>Fuente de Internet | 1% |
| 4 | <a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a><br>Fuente de Internet                   | 1% |
| 5 | <a href="http://coronavirus.gob.mx">coronavirus.gob.mx</a><br>Fuente de Internet           | 1% |
| 6 | <a href="http://kopehealth-upp.com">kopehealth-upp.com</a><br>Fuente de Internet           | 1% |
| 7 | <a href="http://www.pfizer.es">www.pfizer.es</a><br>Fuente de Internet                     | 1% |
| 8 | <a href="http://dspace.ucuenca.edu.ec">dspace.ucuenca.edu.ec</a><br>Fuente de Internet     | 1% |



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**EVALUACIÓN DEL SISTEMA AUTOMATIZADO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS**

**NUCLEICOS MGISP-960 Y AMPLIFICACIÓN POR EL TERMOCICLADOR**

**CFX96™ DE BIO-RAD PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2**

**Línea de investigación:**

Genética, bioquímica y biotecnología

Trabajo académico para optar el Título de Segunda Especialidad en Genética y Biología

Molecular

**Autor:**

Huamán Angeles, Estela Alejandra

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés

(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

**Jurado:**

Saez Flores, Gloria Maria

Riveros Ramirez, Maribel Denise

Mayanga Herrera, Ana Lucia

**Lima - Perú**

**2024**

**Dedicatoria**

A mis queridos padres, quienes han sido mi inspiración y mi mayor apoyo en cada paso de mi vida. Su amor incondicional y aliento constante han sido fundamentales para alcanzar cada logro.

## **Agradecimientos**

Expresar mi profundo agradecimiento a mi mentor por su orientación experta y apoyo constante, Dr. George Obregon; a mi jefa de laboratorio,

Mg. Nancy Rojas Serrano por su confianza en mí y por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente. Sin su guía y apoyo, este logro no habría sido posible.

Agradezco al estimado Dr. Ramses Salas, por su orientación y apoyo brindado como asesor de esta tesis.

## Índice general

|  |      |
|--|------|
| Resumen  | viii |
| Abstract   | ix   |
| I. INTRODUCCIÓN  | 10   |
| 1.1. Descripción y formulación el problema                                     | 11   |
| 1.2. Antecedentes  | 11   |
| 1.2.1. Epidemiología y características del SARS-CoV-2                          | 11   |
| 1.2.2. Técnicas de diagnóstico molecular del SARS-CoV-2                        | 12   |
| 1.2.3. Desafíos y necesidades en el diagnóstico de COVID-19                    | 13   |
| 1.3. Objetivos   | 14   |
| 1.4. Justificación   | 14   |
| 1.5. Impactos esperados del trabajo académico                                  | 15   |
| 1.5.1. Contribución al avance científico                                       | 15   |
| 1.5.2. Orientación en la selección de herramientas                             | 15   |
| 1.5.3. Mejora en la atención médica  | 16   |
| 1.5.4. Impulso a la investigación futura                                       | 16   |
| II. METODOLOGÍA  | 17   |
| 2.1. Diseño de la evaluación   | 17   |
| 2.1.1. Proceso de extracción mediante el sistema MGISP-960                     | 17   |
| 2.1.2. Proceso de amplificación mediante el RT-PCR CFX96 <sup>TM</sup> Bio-Rad | 17   |
| 2.2. Proceso de extracción mediante el sistema MGISP-960                       | 17   |
| 2.2.1. Proceso con el MGISP-960  | 18   |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.2. Operaciones específicas del MGISP-960 en extracción automatizada                                 | 18 |
| 2.2.3. Contaminación cruzada en el sistema MGISP-960  | 20 |
| 2.3. Proceso de amplificación mediante el RT-PCR CFX96™ Bio-Rad   | 21 |
| III. RESULTADOS   | 25 |
| 3.1. Tiempo del proceso de extracción mediante el sistema MGISP-960                                     | 25 |
| 3.1.1. Proceso con el MGISP-960   | 25 |
| 3.1.2. Operaciones específicas del MGISP-960 en extracción automatizada                                 | 25 |
| 3.1.3. Riesgos de contaminación cruzada en el sistema automatizado de preparación de muestras MGISP-960 | 28 |
| 3.2. Proceso de amplificación mediante el RT-PCR CFX96™ Bio-Rad   | 28 |
| 3.2.1. Recolección de datos   | 29 |
| IV. CONCLUSIONES  | 31 |
| V. RECOMENDACIONES  | 32 |
| VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS  | 33 |

## Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Consumibles requeridos por corrida en el MGISP-960   | 20 |
| <b>Tabla 2.</b> Componentes del Kit de extracción MGIEasy Magnetic Beads Virus<br>DNA/RNA x 1728 determinaciones | 21 |
| <b>Tabla 3.</b> Opciones de dispensado de reactivos por corrida con el software en el<br>MGISP-960               | 22 |
| <b>Tabla 4.</b> Componentes del buffer de lisis y unión  | 23 |
| <b>Tabla 5.</b> Componentes de la mezcla maestra para la RT-PCR  | 23 |
| <b>Tabla 6.</b> Interpretación de resultados del kit Allplex™ 2019-nCoV Assay                                    | 24 |
| <b>Tabla 7.</b> Preparación de los consumibles   | 26 |
| <b>Tabla 8.</b> Preparación del Buffer de lisis y unión  | 28 |
| <b>Tabla 9.</b> Recolección de datos   | 30 |



## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo de la detección de SARS-CoV-2 por el método RT-PCR | 19 |
| <b>Figura 2.</b> Diagrama de flujo de la extracción en el MGISP-960                   | 20 |

## Resumen

A principios de 2020 se identificó un nuevo coronavirus posteriormente denominado SARS-CoV-2, agente causante de la COVID-19. Ante la posible introducción de este patógeno en las Américas, la Organización Panamericana de la Salud apoyó a los Centros Nacionales de Influenza en la implementación del diagnóstico molecular del SARS-CoV-2. El Instituto Nacional de Salud del Perú con el fin de satisfacer la alta demanda de diagnósticos del SARS-CoV-2 adquirió tecnologías basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) en tiempo real, como los métodos automatizados con tecnología robótica (Cobas® 6800, GeneXpert) y metodologías semiautomatizadas (MGISP-960, oKtopure™). El objetivo del presente estudio fue evaluar el proceso de extracción de ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 utilizando el sistema MGISP-960 y el proceso de amplificación mediante el termociclador CFX96™. Entre los resultados más importantes se pueden señalar que el proceso de extracción del sistema MGISP-960 fue de 1 hora 40 min en promedio, 50% adicional al tiempo indicado por el fabricante (52 min). Se revisaron los resultados de la amplificación de 36,821 muestras, determinándose resultados inválidos en el 1.5% de las muestras, 3.5% en controles negativos y 7.0% en controles positivos. En conclusión, el MGISP-960 no es un sistema automatizado debido a que 50% del trabajo es manual; asimismo, la duración del proceso de extracción de ácidos nucleicos superó en más del 50% al indicado por el fabricante. Por otro lado, se determinó que la mayor proporción de resultados inválidos del proceso de amplificación fueron controles positivos (7.0%).

*Palabras clave:* SARS-CoV-2, COVID-19, RT-PCR, MGISP-960.

## Abstract

In early 2020, a new coronavirus was identified as SARS-CoV-2, the causative agent of COVID-19. Faced with the possible introduction of this pathogen in the Americas, the Pan American Health Organization supported the National Influenza Centers in the implementation of molecular diagnosis of SARS-CoV-2. In order to meet the high demand for SARS-CoV-2 diagnostics, the Peruvian National Institute of Health acquired technologies based on real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), such as automated methods with robotic technology (Cobas® 6800, GeneXpert) and semi-automated methodologies (MGISP-960, oKtopure™). The objective of the present study was to evaluate the SARS-CoV-2 nucleic acid extraction process using the MGISP-960 system and the amplification process using the CFX96™ thermal cycler. Among the most important results it can be noted that the extraction process of the MGISP-960 system was 1 hour 40 min (average), 50% additional to the time indicated by the manufacturer (52 min). The amplification results of 36,821 samples were reviewed, determining invalid results in 1.5% of the samples, 3.5% in negative controls and 7.0% in positive controls. In conclusion, the MGISP-960 is not an automated system because 50% of the work is manual; also, the duration of the nucleic acid extraction process was more than 50% longer than indicated by the manufacturer. On the other hand, it was determined that the greatest proportion of invalid results from the amplification process were positive controls (7.0%).

*Keywords:* SARS-CoV-2, COVID-19, RT-PCR, MGISP-960.

## I. INTRODUCCIÓN

Al 31 de diciembre de 2019, se notificaron 27 casos de neumonía en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, en el sudeste de China, y a principios de 2020 se identificó un nuevo coronavirus denominado *2019-nCoV*. Los días 13 y 14 de enero de 2020, Tailandia y Japón notificaron sus primeros casos y continuaron propagándose a otros países. Ante la posible introducción de nuevos patógenos virales en las Américas, la Organización Panamericana de Salud/Organización Mundial de Salud (OPS/OMS) alentó a los Estados Miembros a intensificar los esfuerzos de vigilancia para detectar cualquier condición inusual de salud respiratoria. Esto incluyó laboratorios que garantizaran la recolección adecuada de muestras y el envío oportuno al Centro Nacional de Referencia de Influenza o al laboratorio nacional para la vigilancia y pruebas de virus respiratorios (Organización Panamericana de la Salud, 2020). La OPS/OMS apoyó a los Centros Nacionales de Influenza en la implementación del diagnóstico molecular del 2019-nCoV en laboratorios con Nivel de Bioseguridad 2 (Organización Panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud, 2020).

El brote del SARS-CoV-2 (del inglés *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) agente causal de la COVID-19, al 27 de junio de 2020 se convirtió en una pandemia que afectó a cerca de 10 millones de personas en 188 países, con un aumento exponencial de casos y un estimado de muertes de cerca 500 mil personas a nivel mundial, lo cual puso en peligro de colapso a todos los sistemas de salud, incluidos los países de altos ingresos (Johns Hopkins University, 2020; Sun et al., 2020).

El Perú notificó su primer caso COVID-19 el 6 de marzo de 2020, contando hasta mediados de ese año con más de 275 mil casos confirmados y cerca de 9 mil muertes, siendo el sexto país con más casos en el mundo (Ministerio de Salud del Perú, 2020). Esta progresión exponencial de la enfermedad exigió ampliar la capacidad diagnóstica del Laboratorio de

Referencia Nacional de Virus Respiratorio (LRNVR) del Instituto Nacional de Salud (INS) para poder satisfacer la alta demanda mediante el uso de la prueba molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) en tiempo real para el diagnóstico del SARS-CoV-2, contando para ello con tecnologías moleculares, entre las cuales destacaron métodos automatizados con tecnología robótica (Cobas® 6800, GeneXpert) y metodologías semiautomatizadas (MGISP-960, oKtopure™).

### **1.1. Descripción y formulación el problema**

La detección y diagnóstico preciso del SARS-CoV-2 fueron fundamentales para controlar la propagación de la enfermedad COVID-19. Sin embargo, la eficiencia y la fiabilidad de los sistemas de extracción y amplificación de ácidos nucleicos utilizados en las pruebas de diagnóstico pueden variar. Por lo tanto, fue necesario evaluar el sistema automatizado MGISP-960 y del termociclador CFX96™ para determinar su idoneidad en el proceso de detección del virus.

El estudio implica la evaluación del sistema de extracción de ácidos nucleicos MGISP-960, sistema automatizado según lo declarado por el fabricante, en comparación con la capacitación brindada por el proveedor, así como la evaluación del termociclador CFX96™ en la amplificación de los ácidos nucleicos extraídos del virus SARS-CoV-2, mediante la frecuencia de los resultados inválidos, tanto en las muestras como en los controles.

### **1.2. Antecedentes**

#### ***1.2.1. Epidemiología y características del SARS-CoV-2***

En diciembre de 2019, la ciudad de Wuhan, en la provincia china de Hubei, se convirtió en el centro de una epidemia de neumonía de origen desconocido, que atrajo mucha atención no solo a nivel nacional, sino también de la comunidad internacional. Las autoridades sanitarias chinas iniciaron inmediatamente una investigación para caracterizar y controlar la

enfermedad, incluido el aislamiento de posibles infecciones, una estrecha vigilancia de los contactos, la recopilación de datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes y el desarrollo de procedimientos de detección, diagnóstico y tratamiento (Wang et al., 2020). El 31 de diciembre, la comisión Municipal de Salud de Wuhan notificó al público sobre un brote de neumonía de causa no identificada e informó a la OMS (Hu et al., 2021). El 7 de enero de 2020, científicos chinos aislaron un nuevo coronavirus (CoV) en Wuhan, identificando la secuencia genética del nuevo coronavirus de 2019 (2019-nCoV), lo cual impulsó el rápido desarrollo de pruebas de diagnóstico RT-PCR para 2019-nCoV basados en datos de la secuencia del genoma completo compilados en la plataforma GISAID (del inglés *Global Initiative on Sharing All Influenza Data*)(Wang et al., 2020). El 11 de marzo, la OMS anunció el brote de la COVID-19 como pandemia (Organización Mundial de la Salud, 2020).

El SARS-CoV-2 se transmite principalmente entre personas a través de gotículas respiratorias y por contacto directo, determinándose que los procedimientos médicos que generan aerosoles, como el tratamiento con nebulizador o la intubación, aumentan el riesgo de transmisión. Las investigaciones mostraron que el SARS-CoV-2 puede permanecer viable en una variedad de superficies, incluido el acero inoxidable, plástico, vidrio y cartón, durante días, lo que explicaría la rápida propagación geográfica de la COVID-19, (Hu et al., 2021; Park, 2020).

### ***1.2.2. Técnicas de diagnóstico molecular del SARS-CoV-2***

La RT-PCR es un método de laboratorio que se usa para la identificación, detección y cuantificación de ARN, utilizando el ARN como molde para sintetizar ADN complementario, el cual a su vez es la plantilla para una reacción de PCR en tiempo real. El aumento exponencial en las copias de ADN se ve reflejado en la aparición de fluorescencia cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de ARN en la muestra, haciendo que esta reacción sea

altamente sensible aún a bajas concentraciones de ácidos nucleicos virales. Es posible usar la RT-PCR para detectar ciertos cambios en un gen o cromosoma, o para identificar la activación de ciertos genes, lo que ayuda a diagnosticar enfermedades (Cuadra et al., 2021; National Institute of Health, 2017).

Con la disponibilidad de la secuencia del genoma del SARS-CoV-2 (Gralinski & Menachery, 2020), la OMS publicó un protocolo para el diagnóstico molecular de la COVID-19 basado en RT-PCR en tiempo real, que se convirtió en la base para el desarrollo de kits comerciales (Acevedo Muñoz et al., 2021; Kwok, 2022).

Algunas pruebas de diagnóstico RT-PCR en tiempo real disponibles comercialmente para COVID-19 tienen una sensibilidad de aproximadamente el 95% y un límite de detección de 10 copias/reacción, lo que permite una detección oportuna y precisa. Para la mayoría de las pruebas de diagnóstico molecular, las muestras que incluyen son hisopados o aspirados nasofaríngeos, hisopados orofaríngeos, esputo e incluso saliva, que son relativamente fáciles de recolectar de pacientes con sospecha de infección; asimismo, han demostrado ser adecuadas para la extracción de ARN. Las plataformas comerciales utilizan principalmente regiones objetivo-específicas, incluidos los genes ORF1ab, RdRp, N y S, para detectar infecciones virales mediante RT-PCR en tiempo real. Durante toda la pandemia, el diagnóstico molecular mediante RT-PCR en tiempo real fue el *gold standard* para garantizar que los resultados de las pruebas sean lo suficientemente precisos y sensibles (Kwok, 2022).

### ***1.2.3. Desafíos y necesidades en el diagnóstico de COVID-19***

Los desafíos que se tuvieron en el diagnóstico de COVID-19, al inicio de la pandemia, fueron la disponibilidad limitada de recursos y la necesidad de técnicas más rápidas, sensibles

y específicas (Acevedo Muñoz et al., 2021; Casquero-Cavero et al., 2021), lo cual justificó la evaluación de nuevas herramientas diagnósticas.

El diagnóstico temprano fue crucial para controlar la propagación de COVID-19. Muchos kits de detección de ácidos nucleicos virales tuvieron un tiempo de detección que variaba desde varios minutos hasta horas dependiendo de la tecnología. La detección molecular se ve afectada por muchos factores. Si bien el SARS-CoV-2 se ha detectado a partir de una variedad de fuentes respiratorias, incluidos hisopos de garganta, saliva orofaríngea posterior, hisopos nasofaríngeos, esputo y líquido bronquial, la carga viral es mayor en muestras del tracto respiratorio inferior (Hu et al., 2021).

### **1.3. Objetivos**

#### **Objetivo general**

- Evaluar el tiempo del proceso de extracción de ácidos nucleicos utilizando el sistema MGISP-960 y del proceso de la amplificación mediante el termociclador CFX96<sup>TM</sup> de Bio-Rad para la detección del SARS-CoV-2.

#### **Objetivos específicos**

- Comparar el tiempo requerido para el proceso completo de extracción de ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 utilizando el sistema automatizado MGISP-960 según inserto del fabricante en comparación con el flujo de trabajo en laboratorio.
- Determinar la proporción de resultados inválidos del termociclador CFX96<sup>TM</sup> en la amplificación de los ácidos nucleicos extraídos del virus SARS-CoV-2.

### **1.4. Justificación**

Dada la continua amenaza del SARS-CoV-2 y la importancia de realizar pruebas diagnósticas precisas y eficientes para controlar la propagación de la enfermedad COVID-19, era fundamental evaluar y validar sistemas automatizados de extracción de ácidos nucleicos y



equipos de amplificación para garantizar la fiabilidad y la rapidez en el proceso de detección del virus. Este estudio se justificó por la necesidad de identificar y seleccionar las mejores herramientas disponibles en el mercado, como el sistema MGISP-960 y el termociclador CFX96<sup>TM</sup> de Bio-Rad Laboratories, para optimizar los procesos de extracción y amplificación de ácidos nucleicos del SARS-CoV-2, lo que contribuirá a mejorar la eficacia de los programas de diagnóstico y monitoreo de la enfermedad.

Considerando la evolución continua del SARS-CoV-2 y la necesidad de adaptar y mejorar constantemente las técnicas de diagnóstico molecular, este estudio se justificó para proporcionar una evaluación exhaustiva y comparativa del rendimiento del sistema automatizado MGISP-960 y del termociclador CFX96<sup>TM</sup> en el contexto específico de la extracción y amplificación de ácidos nucleicos del virus. Esta investigación identificó posibles limitaciones y ventajas de cada sistema, facilitando así la toma de decisiones informadas para la implementación y mejora de protocolos de diagnóstico de la COVID-19 en entornos clínicos y de investigación.

## **1.5. Impactos esperados del trabajo académico**

### ***1.5.1. Contribución al avance científico***

Proporcionar nuevos conocimientos sobre los sistemas automatizados de extracción de ácidos nucleicos y equipos de amplificación en el contexto específico de la detección del SARS-CoV-2, contribuyendo a mejorar las técnicas de diagnóstico molecular y la gestión de la pandemia.

### ***1.5.2. Orientación en la selección de herramientas***

Ayudar a los profesionales de la salud y a los investigadores a tomar decisiones basadas en evidencia sobre la selección de sistemas automatizados de extracción y amplificación de

ácidos nucleicos para el diagnóstico de la COVID-19, mejorando la eficiencia y la precisión de las pruebas diagnósticas.

### ***1.5.3. Mejora en la atención médica***

Contribuir a la mejora de la atención médica al proporcionar información sobre la eficacia de las herramientas de diagnóstico utilizadas en la detección del SARS-CoV-2, lo que resulta en una identificación más rápida y precisa de los casos de COVID-19 y una mejor gestión de la enfermedad.

### ***1.5.4. Impulso a la investigación futura***

Servir como base para investigaciones futuras relacionadas con las técnicas de diagnóstico molecular para enfermedades infecciosas, así como para la evaluación de otros sistemas y equipos utilizados en el campo de la biología molecular.

Se espera que el trabajo académico tenga un impacto positivo en la mejora de los diagnósticos y en la investigación relacionada con la detección de enfermedades infecciosas, lo que puede conducir a una mejor atención médica.

## II. METODOLOGÍA

### 2.1. Diseño de la evaluación

#### 2.1.1. *Proceso de extracción mediante el sistema MGISP-960*

Evaluación del tiempo del proceso de preparación de muestras para la extracción de ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 en el sistema MGISP-960, según instrucciones descritas en el manual del usuario (MGI Tech Co Ltd, 2020a, 2020b) e información de la página Web oficial del fabricante frente a la capacitación brindada por la empresa proveedora, entre el 8 al 10 de junio de 2020.

#### 2.1.2. *Proceso de amplificación mediante el RT-PCR CFX96™ Bio-Rad*

Evaluación del proceso de amplificación (*Bio-Rad Laboratories Inc., 2010; Medical Technology Promedt Consulting, 2020*) mediante la determinación de la frecuencia de resultados inválidos de las muestras y controles positivos y negativos de la prueba de detección de SARS-CoV-2, emitidos entre el 3 al 25 de junio de 2020.

### 2.2. Proceso de extracción mediante el sistema MGISP-960

Según el fabricante (MGI Tech Co Ltd, 2020a), el MGISP-960 contaba con las siguientes características:

- Económico y eficiente: sistema autónomo, procesa muestras en lotes, reduce en gran medida la entrada de mano de obra.
- Protección integral: lámpara UV integrada y campana de flujo laminar, diseño integral de prevención de la contaminación.
- Plataforma abierta: soporte de desarrollo personalizado de acuerdo con diferentes necesidades.

### **2.2.1. Proceso con el MGISP-960**

El MGISP-960 completa la extracción automatizada y la configuración de la reacción RT-PCR en este proceso. En cuanto a la extracción (*MGI Tech Co Ltd, 2020b, 2020a*), MGISP-960 ofrece ejecutar 96 muestras/análisis en 60 minutos, siguiendo la siguiente secuencia:

- a) Inactivación: se recomienda inactivar a 56°C durante 30 minutos (manualmente);
- b) Muestreo: transferir la muestra del tubo a una placa de 96 pocillos (manualmente);
- c) Preparación automatizada: preparar consumibles y reactivos para la automatización (manualmente);
- d) Extracción automatizada: extraer ADN/ARN viral;
- e) Configuración de reacción de RT-PCR: mezclar las muestras extraídas y los reactivos de detección (MGISP-960 + parte manualmente);
- f) Reacción RT-PCR: colocar la placa de 96 pocillos del paso 5 en el instrumento RT-PCR (instrumento qPCR);
- g) Análisis de resultados: analizar en función de los resultados de las pruebas y enviar informes como corresponde (Figura 1).

### **2.2.2. Operaciones específicas del MGISP-960 en extracción automatizada**

El diagrama de flujo de trabajo de la extracción de DNA/RNA en el sistema MGISP-960 (Figura 2) se realizó con 96 muestras por corrida de ejecución de cada proceso (excluyendo la configuración de RT-PCR), implicando los siguientes pasos (*MGI Tech Co Ltd, 2020b*):

Paso 1: Preparación de reactivos (manualmente). Antes de realizar la extracción en el MGISP-960, se requiere preparar los consumibles, para lo cual se debe tomar la cantidad correspondiente de consumibles automáticos, como se muestra en la tabla 1.

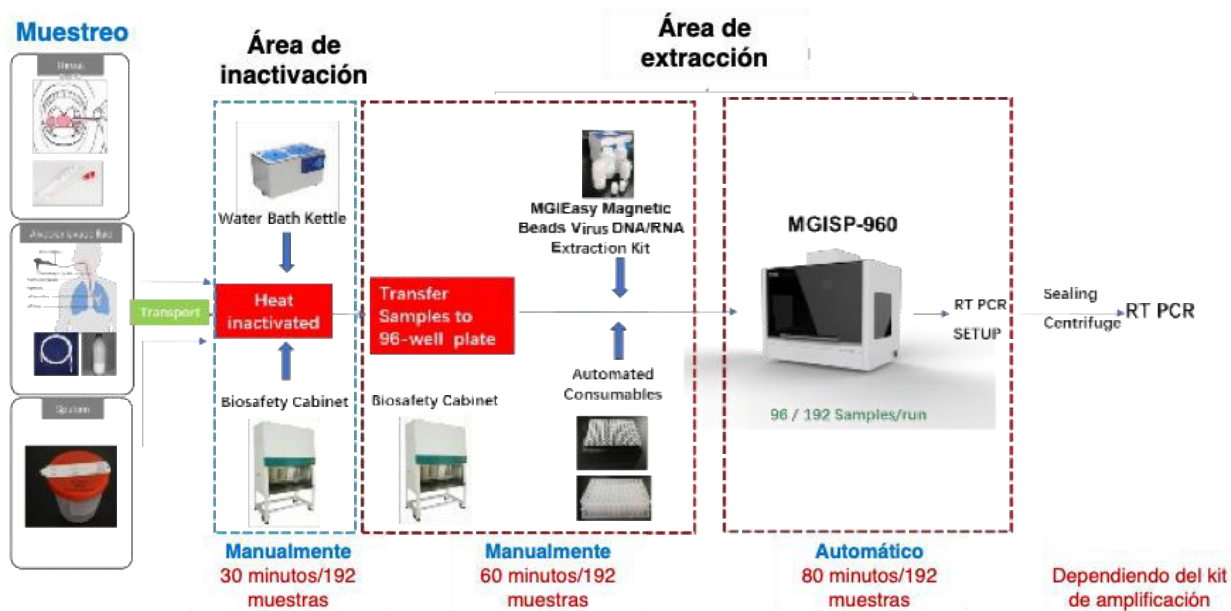
Paso 2: Pretratamiento del kit de extracción (manualmente). Los componentes del kit de extracción se describen en la tabla 2.

- Preparación de reactivos. Transferir el reactivo de la botella a una placa de 96 pocillos de pocillos profundos mediante la configuración del equipo “MGISP-960 Nucleic Acid Extraction Kit Reagent separation” (Tabla 3).
- Preparar el buffer de lisis y unión, y separarlo en una placa de 96 pocillos (360 $\mu$ l por pocillo) de pocillos profundos manualmente. El buffer debe ser usado dentro de los 30 minutos posteriores a la preparación (Tabla 4).
- Preparación de la muestra. Transferir manualmente las muestras (180 $\mu$ l) inactivadas del tubo a una placa de pozo profundo de fondo en U de 1.3 ml.

**Paso 3:** Extracción automatizada. Colocar las muestras, reactivos y consumibles para el proceso de 96 muestras.

### Figura 1

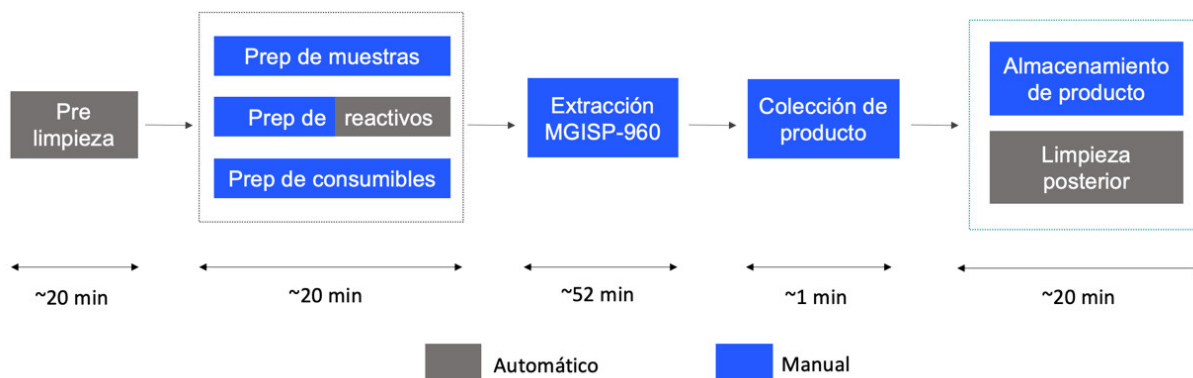
Diagrama de flujo de la detección de SARS-CoV-2 por el método RT-PCR



Nota. Fuente: MGI Tech Co. Ltd. <https://en.mgitech.cn/>

**Figura 2**

*Diagrama de flujo de la extracción en el MGISP-960*



*Nota.* Fuente: MGI Tech Co. Ltd. <https://en.mgitech.cn/>

**Tabla 1**

*Consumibles requeridos por corrida en el MGISP-960*

| Item  | Cantidad |
|---|----------|
| Rack x 96 tips con filtro de 250 $\mu$ l  | 7        |
| Placa de pozo profundo de fondo en U de 1.3 ml  | 5        |
| Placas de PCR de 96 pocillos de pared delgada y cubierta dura, cubierta blanca/pocillo transparente | 1        |

### 2.2.3. Contaminación cruzada en el sistema MGISP-960

Para evitar la contaminación cruzada, el sistema automatizado de preparación de muestras MGISP-960 tiene integrado una lámpara UV y una campana de flujo laminar de presión positiva ISO 5, que esteriliza y filtra el interior del dispositivo antes y después del proceso. Mientras tanto, las puntas de las pipetas están diseñadas con un elemento de filtro para minimizar el riesgo de contaminación por aerosoles en las pipetas. Además, el software

MGISP-960 ha integrado un paso previo/posterior a la limpieza. Durante este paso, se indica que limpie el dispositivo y permita el funcionamiento de la lámpara UV y la campana de flujo laminar. Se recomienda realizar una limpieza previa y posterior a la limpieza todos los días.

**Tabla 2**

*Componentes del Kit de extracción MGIEasy Magnetic Beads Virus DNA/RNA x 1728 determinaciones*

| <b>Componentes</b>   | <b>Temperatura de almacenamiento</b> | <b>Listo para usar</b>          |
|----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| Buffer de lavado MW1 | T° ambiente                          | Añadir 360ml de etanol absoluto |
| Buffer de lavado MW2 | T° ambiente                          | Añadir 800ml de etanol absoluto |
| Buffer MLB           | T° ambiente                          | Sí                              |
| Agua libre de Rnasas | T° ambiente                          | Sí                              |
| Perlas magnéticas    | 2-8°C                                | Sí                              |
| Proteinasa K         | 2-8°C                                | Sí                              |
| Buffer potenciador   | -20°C                                | Sí                              |

### **2.3. Proceso de amplificación mediante el RT-PCR CFX96™ Bio-Rad**

Para el análisis del ensayo se usó el Kit de amplificación Allplex™ 2019-nCoV Assay (Medical Technology Promedt Consulting, 2020), dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* diseñado para la detección cualitativa del SARS-CoV-2 por RT-PCR en tiempo real a partir de muestras de esputo, aspirado nasofaríngeo, hisopado nasofaríngeo y de garganta y lavado broncoalveolar (Medical Technology Promedt Consulting, 2020).

Una vez realizada la extracción en el sistema MGISP-960, el eluido de ARN se añade a la mezcla maestra del Kit de amplificación Allplex™ 2019-nCoV Assay de acuerdo con las instrucciones del fabricante en lotes de hasta 94 muestras, más un control positivo y un control negativo (Tabla 5).

**Tabla 3**

*Opciones de dispensado de reactivos por corrida con el software en el MGISP-960*

| <b>Solución</b>  | <b>Configuración del equipo</b>   | <b>Función</b>                   | <b>Volumen x pocillo</b> |
|--|---|----------------------------------|--------------------------|
| Separación de reactivos de extracción de ADN/ARN en el MGISP-960 | 1-MGISP-960 Virus DNA RNA Extraction<br>Reagent separation - Buffer MW1 | Separación - Buffer MW1          | 170 µl                   |
|  | 2-MGISP-960 Virus DNA RNA Extraction<br>Reagent separation - Buffer MW2 | Separación - Buffer MW2          | 340 µl                   |
|  | 3-MGISP-960 Virus DNA RNA Extraction<br>Reagent separation - Rnase      | Separación - Agua libre de Rnasa | 50 µl                    |

La amplificación se realizó utilizando el instrumento para RT-PCR CFX96™ Bio-Rad de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories Inc., 2010). El análisis de datos inicial se realizó con el software CFX96 Manager™, seguido de la exportación al software Seegene Viewer. Los resultados del análisis de las muestras para la detección del SARS-CoV-2 son categorizados automáticamente por el software Seegene Viewer (Seegene Inc., 2020) (Tabla 6).



**Tabla 4***Componentes del buffer de lisis y unión*

| <b>Buffer de lisis y unión</b> |                      |
|--------------------------------|----------------------|
| <b>Reactivos</b>               | <b>96 reacciones</b> |
| Buffer MLB                     | 15.36 ml             |
| Alcohol absoluto               | 19.20 ml             |
| Perlas magnéticas M            | 1.44 ml              |
| Solución de proteinasa K       | 1.44 ml              |
| Buffer potenciador             | 96.00 $\mu$ l        |

**Tabla 5***Componentes de la mezcla maestra para la RT-PCR*

| <b>Componentes</b>           | <b>Número de reacciones</b> |             |             |
|------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|
|                              | <b>1</b>                    | <b>96</b>   | <b>110</b>  |
| 2019-nCoV MOM                | 5 $\mu$ l                   | 480 $\mu$ l | 550 $\mu$ l |
| RNase-free Water             | 5 $\mu$ l                   | 480 $\mu$ l | 550 $\mu$ l |
| 5X Real-time One-step Buffer | 5 $\mu$ l                   | 480 $\mu$ l | 550 $\mu$ l |
| Real-time One-step Enzyme    | 5 $\mu$ l                   | 192 $\mu$ l | 550 $\mu$ l |

**Tabla 6**

*Interpretación de resultados del kit Allplex™ 2019-nCoV Assay*

|                              | Caso 1              | Caso 2                    | Caso 3 | Caso 4 | Caso 5   | Caso 6   | Caso 7   |
|------------------------------|---------------------|---------------------------|--------|--------|--|----------|----------|
| IC (HEX)                     | +/-                 | +/-                       | +/-    | +/-    | +/-  | +        | -        |
| Gen E (FAM)                  | +                   | +/-                       | -      | +/-    | +  | -        | -        |
| Gen RdRP (Cal Red 610)       | +                   | -                         | +      | +      | -  | -        | -        |
| Gen N (Quasar 670)           | +                   | +                         | +      | -      | -  | -        | -        |
| Interpretación de resultados | 2019-nCoV Detectado | Resultado No Concluyente* |        |        | 2019-nCoV NO DETECTADO, sarbecovirus DETECTADO | Negativo | Inválido |

*Nota.* Es recomendable repetir la prueba aumentando la concentración de la muestra.

El valor Ct (ciclo de threshold) del control interno del Kit Allplex™ 2019-nCoV Assay debe ser menor o igual a 40 para que el resultado sea válido, caso contrario se realizó una nueva prueba.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Tiempo del proceso de extracción mediante el sistema MGISP-960

##### 3.1.1. Proceso con el MGISP-960

El fabricante del MGISP-960 indicó que el proceso de extracción de 96 muestras/análisis se realizaría en ~52min. Sin embargo, el tiempo promedio del proceso completo de extracción fue de 1 hora 40 min. Esta diferencia radicó en que el fabricante no tomó en cuenta el tiempo del proceso previo a la ejecución de la extracción por cada lote de muestras (48min en promedio), la cual incluye el tiempo que se emplea para realizar la pre-limpieza y la preparación de muestras, reactivos y consumibles.

Para poder obtener el tiempo de proceso del flujo del laboratorio se obtuvo de la siguiente manera:

$$t_{fl} = \frac{t_f - t_i}{t_e}$$

Donde:

$t_{fl}$  : Tiempo de flujo de laboratorio

$t_i$  : Tiempo de inicio del proceso

$t_f$  : Tiempo de finalización del proceso

$t_e$  : Tiempo promedio de extracción del fabricante

##### 3.1.2. Operaciones específicas del MGISP-960 en extracción automatizada

En las operaciones específicas del MGISP-960 se menciona tres pasos: preparación de muestras, consumibles y reactivos.

**3.1.2.1. Preparación de muestras.** El fabricante recomienda, como primer paso al manejo de las muestras, que se realice la inactivación de la muestra manualmente a 56°C durante 30 min para posteriormente transferir la muestra a las placas correspondientes para el

desarrollo de la extracción. Cabe mencionar, que la referida recomendación no fue implementada, ni mencionada durante la capacitación realizada por el proveedor.

**3.1.2.2. Preparación de los consumibles.** Por cada corrida de 96 muestras se requirieron los consumibles que se detallan en la tabla 1. Sin embargo, las cantidades utilizadas de acuerdo con el flujo de trabajo establecido para el proceso son mayores, tal cual se detalla a en la tabla 7.

**Tabla 7**

*Preparación de los consumibles*

| Item  | Cantidad              |                   | Objetivo del uso  |
|---|-----------------------|-------------------|---|
|   | Estimada <sup>a</sup> | Real <sup>b</sup> |   |
| Rack x 96 tips con filtro de 250 µl   | 7                     | 8                 | 5 para el proceso de extracción<br>3 para el dispensado de reactivos <sup>c</sup>           |
| Placa de pozo profundo de fondo en U de 1.3 ml  | 5                     | 6                 | 1 para el dispensado de muestras<br>4 para el dispensado de reactivos                       |
| Placas de PCR de 96 pocillos de pared delgada y cubierta dura, cubierta blanca/pocillo transparente | 1                     | 2                 | 1 para la mezcla maestra<br>1 para el eluido de ARN<br>1 para la ampliificación de muestras |

*Nota.* <sup>a</sup> Calculada por el fabricante. <sup>b</sup> Utilizada por el personal del INS en condiciones de rutina.

<sup>c</sup> Se pueden reutilizar durante el día de trabajo.

**3.1.2.3. Preparación de los reactivos.** Se debe tener en cuenta que en el pretratamiento del kit de extracción MGIEasy Magnetic Beads Virus DNA/RNA x 1728 determinaciones (MGI Tech Co Ltd, 2020b)(Tabla 2) se debe añadir alcohol absoluto a los buffers MW1 y MW2 (360 y 800 ml, respectivamente) y para la preparación del buffer de lisis y unión por cada corrida de 96 muestras se requiere 20 ml adicionales. Para dispensar el buffer de lavado MW1, MW2 y agua libre de Rnasas, el software del equipo tiene opciones específicas, tal como se detalla en la tabla 3. Para la preparación del buffer de lisis y unión se debe realizar la mezcla de los componentes detallados en la tabla 4.

Según lo indicado en la capacitación por el proveedor se tenía una variación en los volúmenes de perlas magnéticas y la proteinasa K que se habían ajustado al proceso del dispensado con el equipo, tal cual se detalla en la tabla 8.

El fabricante indicaba que el volumen final del “buffer de lisis y unión” del kit de extracción MGIEasy Magnetic Beads Virus DNA/RNA es de 360 µl por pocillo y que se debe dispensar manualmente.

Cabe señalar, que el proveedor durante la capacitación recomendó aplicar un “artificio” con el software del equipo para optimizar el tiempo del dispensado del “buffer de lisis y unión” en las placas de procesamiento. El referido “artificio” consistió en utilizar primero la opción del dispensado del buffer MW2 (2-MGISP-960 Virus DNA RNA Extraction Reagent separation - buffer MW2) y posteriormente el dispensado del agua libre de Rnasas (3-MGISP-960 Virus DNA RNA Extraction Reagent separation – Rnase), obteniendo un volumen final de 390 µl por pocillo (340 µl por la opción del MW2 y 50 µl por la opción del agua libre de Rnasas), 30 µl por encima de lo indicado por el fabricante.

Es importante indicar, que al realizar dicho “artificio” se observó que usando la opción de dispensado del buffer MW2 se lograba una distribución homogénea del “buffer de lisis y

unión”, pero al utilizar la opción de dispensado del agua libre de Rnasas, se obtenía una distribución de volumen no uniforme en los pocillos.

**Tabla 8**

*Preparación del Buffer de lisis y unión*

| <b>Buffer de lisis y unión</b> |                |
|--------------------------------|----------------|
| Reactivos                      | 96 reacciones  |
| Buffer MLB                     | 15.36 ml       |
| Alcohol absoluto               | 19.20 ml       |
| Perlas magnéticas M            | 1.50 ml        |
| Solución de Proteinasa K       | 1.50 ml        |
| Buffer potenciador             | 96.00 $\mu$ l  |
| Control interno                | 960.00 $\mu$ l |

### ***3.1.3. Riesgos de contaminación cruzada en el sistema automatizado de preparación de muestras MGISP-960***

Para evitar la contaminación cruzada, el sistema del MGISP-960 está integrado con la lámpara UV y la campana de flujo laminar de presión positiva; además, el software MGISP-960 tiene integrado un paso previo/posterior a la limpieza.

### **3.2. Proceso de amplificación mediante el RT-PCR CFX96™ Bio-Rad**

Para el análisis del ensayo se siguió lo indicado en el inserto del ensayo Allplex™ 2019-nCoV (Tabla 6). En el inserto (Bio-Rad Laboratories Inc., 2010; Medical Technology Promedt Consulting, 2020), indica la interpretación de resultados de las muestras procesadas más no de la validación de los controles (que por defecto el programa indicaba si son válidos o no), por tal motivo se realizó una consulta a la misma página oficial del kit de ensayo Allplex™ 2019-nCoV (<http://www.seegene.com/>), pero no se tuvo respuesta hasta la fecha de realizado el trabajo.

### ***3.2.1. Recolección de datos***

Se recolectaron los datos de los dos termocicladores que se tenían para el proceso de amplificación, procesándose un total de 372 protocolos (184 del termociclador N°1 y 188 del N°2), en cada protocolo se amplificaban dos controles y 94 muestras. En la tabla 9 se detallan las observaciones de la recolección de datos.

Se revisaron un total de 372 protocolos equivalentes a 36,821 muestras teniendo las siguientes observaciones:

- 26 corridas con controles positivos inválidos (7.0%).
- 13 corridas con controles negativos inválidos (3.5%).
- 555 muestras inválidas del total de 36,821 muestras procesadas (1.51%).
- 138 muestras presuntamente positivas de 36,821 muestras procesadas (0.4%).

El criterio seguido con las muestras que presentaron controles con resultados inválidos fue repetir su proceso para poder emitir un de resultados al sistema de información Netlabv.2 (Sistema de Información de Laboratorios del Instituto Nacional de Salud).

**Tabla 9***Recolección de datos*

|                     | <b>Total</b> | <b>Inválidos</b> | <b>Presuntamente positivos<sup>a</sup></b> |
|---------------------|--------------|------------------|--|
| Muestras Procesadas | 36821        | 555 <sup>b</sup> | 138  |
| Controles Positivos | 372          | 26 <sup>c</sup>  |  |
| Control Negativo    | 372          | 13 <sup>d</sup>  |  |

*Nota.* <sup>a</sup>Muestras que solo amplificaron el Gen de diagnóstico E, <sup>b</sup>Muestras que no amplificó el control interno, <sup>c</sup>Control que no amplificaron los genes de diagnóstico E, RdRP y N, <sup>d</sup>Control que no amplificó el control interno



## IV. CONCLUSIONES

### 4.1. Tiempo del proceso de extracción mediante el sistema MGISP-960

- El sistema MGISP-960 no es un sistema de preparación automatizado de muestras tal como lo declara el fabricante, sino un sistema semiautomatizado, debido a que alrededor del 50% del proceso se realizó de manera manual y el resto con el equipo de extracción de ácidos nucleicos.
- El volumen de alcohol absoluto para el pretratamiento del kit y preparación del buffer de lisis y unión es alto, consumiendo 1.52 litros de alcohol absoluto por cada kit, el cual debe ser provisto por el proveedor como parte de los consumibles.
- El uso del “artificio” de dispensar el buffer de lisis y unión con el equipo no es adecuada para la prueba, pues no cumple con los requisitos de volumen indicados por el fabricante.

### 4.2. Rendimiento del proceso de amplificación mediante el RT-PCR CFX96™ Bio-Rad

- La mayor proporción de controles de amplificación con resultados inválidos fueron los controles positivos (7.0%), protocolos completos de muestras que tuvieron que ser reprocesadas.

## V. RECOMENDACIONES

### 5.1. Proceso de extracción mediante el sistema MGISP-960

- Para fines de la programación de corridas efectivas durante los turnos de trabajo, se debe tener en cuenta que el tiempo real de la extracción del sistema MGISP-960 es de 1 hora y 40 min en promedio.
- La recomendación por parte del fabricante de realizar la inactivación de las muestras a 56°C por 30 minutos, debe ser evaluada antes de ser implementada en los futuros procesos de muestras para el diagnóstico del SARS-CoV-2.
- El dispensado del buffer de lisis y unión se debe realizar de manera manual, tal como lo indica el fabricante para evitar errores.

### 5.2. Proceso de amplificación mediante el RT-PCR CFX96™ Bio-Rad

- Las corridas de muestras que tengan algún control inválido deben ser procesadas nuevamente por no cumplir con el criterio de validez de los controles para ser registradas en el sistema de información y gestión de laboratorio Netlabv.2.
- El proveedor debe realizar la reposición de los kits de amplificación con uno o dos controles con resultados inválidos, debido a que son fallas inherentes al producto que evidencian el no cumplimiento de los parámetros de calidad.
- Las muestras con resultados inválidos deben ser procesadas nuevamente tal como lo indica el fabricante, para asegurar los resultados dentro de los parámetros de calidad.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo Muñoz, W., Benadof Fuentes, Do., & Farfán Urzúa, M. (2021). Rol de los laboratorios públicos en el diagnóstico SARS-CoV-2 en la pandemia de COVID-19: Experiencia, desafíos y oportunidades. *Revista Chilena Infectología*, 38(2), 135-143. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000200135>
- Bio-Rad Laboratories Inc. (2010). *CFX96™ and CFX384™ Real-Time PCR Detection Systems* (N.º 10010424). <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10010424.pdf>
- Casquero-Cavero, J., Rojas-Serrano, N., Huaranga-Núñez, M., Salinas-Coronel, G., Portilla-Romero, J., Arotinco-Garayar, G., Calvay-Sánchez, K., Villar-Saavedra, S., Cabrera-Campos, B., Pari-Lope, P., Galindo-Sánchez, S., Munayco-Hernández, A., Ramírez-Mori, J., Huamán-Angeles, E., & Obregón-Boltan, G. (2021). Capacidad de Respuesta del Laboratorio de Referencia Nacional de Virus Respiratorio para el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 durante la primera ola de la pandemia de la COVID-19. *Boletín Instituto Nacional de Salud*, 27(9-10), 114-119.
- Cuadra, T. E., Guadrón Meléndez, A. A., Cruz Aguilar, R. D. J., & Vásquez Rodríguez, E. A. (2021). Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19. *Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud*, 4(1), 31-39. <https://doi.org/10.5377/alerta.v4i1.10060>
- Gralinski, L. E., & Menachery, V. D. (2020). Return of of the the Coronavirus : *Virus*, 12(2), 1-8. <https://doi.org/0.3390/v12020135>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-

19. *Nature Reviews Microbiology*, 19(December), 144-154.

<https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>

Johns Hopkins University. (2020). *Mapa COVID-19 - Centro de recursos de coronavirus de Johns Hopkins*. Johns Hopkins University. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>

Kwok, H. F. (2022). The significance of advanced COVID-19 diagnostic testing in pandemic control measures. *International Journal of Biological Sciences*, 18(12), 4610-4617.

<https://doi.org/10.7150/ijbs.72837>

Medical Technology Promedt Consulting. (2020). *Allplex™ 2019-nCoV Assay* (v3.0; Número 744300). [https://www.seegene.com/assays/allplex\\_2019\\_ncov\\_assay](https://www.seegene.com/assays/allplex_2019_ncov_assay)

MGI Tech Co Ltd. (2020a). Manual de usuario del equipo de extracción MGISP-960. En *MGI Tech Co. Ltd.* <https://en.mgitech.cn/>

MGI Tech Co Ltd. (2020b). *MGIEasy Blood Genomic DNA Extraction Prepacked Kit ( MGISP-960 ) User Manual*. [https://en.mgi-tech.com/products/reagents\\_info/44/](https://en.mgi-tech.com/products/reagents_info/44/)

Ministerio de Salud del Perú. (2020). *Plataforma digital del Estado Peruano. Presidencia del Consejo de Ministros - Coronavirus en el Perú*. Gobierno del Perú.

<https://www.gob.pe/8662-presidencia-del-consejo-de-ministros-coronavirus-en-el-peru>

National Institute of Health. (2017). *Diccionario de cáncer del NCI*. National Institute of Health. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/rt-pcr>

Organización Mundial de la Salud. (2020). *Discurso de apertura del Director General de la OMS en la rueda de prensa sobre la COVID-19 - 11 de marzo de 2020*. Organización

Mundial de la Salud. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

Organización Panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud. (2020).

*OPS/OMS Perú*. Organización Panamericana de la Salud.

[https://www.paho.org/per/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4075:tuberculosis&Itemid=0](https://www.paho.org/per/index.php?option=com_content&view=article&id=4075:tuberculosis&Itemid=0)

Organización Panamericana de la Salud. (2020). Alerta Epidemiológica Nuevo coronavirus.

En *Organización Panamericana de la Salud*. <https://www.paho.org/es/node/65119>

Park, S. E. (2020). Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome - coronavirus - 2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *Clinical and Experimental Pediatrics*, 63(4), 119-124. <https://doi.org/10.3345/cep.2020.00493>

Seegene Inc. (2020). *Seegene Viewer*. [https://www.seegene.com/software/seegene\\_viewer](https://www.seegene.com/software/seegene_viewer)

Sun, P., Lu, Xiaosheng, Chao Xu, Sun, W., & Pan, B. (2020). Understanding of COVID-19 based on current evidence. *Journal Medical Virology*, 92(6), 548-551. <https://doi.org/10.1002/jmv.25722>

Wang, C., Horby, P. W., Hayden, F. G., & Gao, G. F. (2020). A novel coronavirus outbreak of global health concern. *The Lancet*, 395(10223), 470-473. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30185-9)