



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

IMPLEMENTACIÓN DE PLATAFORMAS
AUTOMATIZADAS DE EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR EN
TIEMPO REAL EN UNA EMPRESA PRIVADA
EXPORTADORA DE LANGOSTINOS

TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA
OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA

AUTOR

HENRY HERRERA MILLA

ASESOR

DANIEL CLARK LEZA PhD

LIMA – PERÚ

2024

IMPLEMENTACIÓN DE PLATAFORMAS AUTOMATIZADAS DE EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR EN TIEMPO REAL EN UNA EMPRESA PRIVADA EXPORTADORA DE LANGOSTINOS

ORIGINALITY REPORT

6%	6%	2%	1%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	hdl.handle.net Internet Source	1%
2	archive.org Internet Source	<1%
3	idoc.pub Internet Source	<1%
4	Submitted to Georgia Institute of Technology Main Campus Student Paper	<1%
5	patents.google.com Internet Source	<1%
6	www.primoris.be Internet Source	<1%
7	Lara Sobrino Gregorio. "Avances en el esclarecimiento de la autenticidad de la miel", Universitat Politecnica de Valencia, 2020 Publication	<1%

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. Introducción.....	3
2. Problema.....	10
3. Justificación.....	11
4. Objetivo general.....	12
4.1 Objetivos específicos.....	12
5. Hipótesis general.....	13
5.1 Hipótesis específicas.....	13
6. Metodología.....	14
7. Resultados.....	18
8. Discusión.....	26
8.1 Limitaciones.....	31
9. Conclusiones.....	33
10. Recomendaciones.....	34
11. Referencias Bibliográficas.....	35
12. Anexos.....	38

Resumen

La empresa Marinasol SA tuvo la necesidad de incrementar el procesamiento de muestras de su laboratorio de biología molecular. Para ello, se realizó la implementación de plataformas automatizadas que tenían el potencial de incrementar la eficiencia de procesos de extracción de ADN y el análisis de estas muestras mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se realizó una capacitación en temas de conocimientos y procedimientos a aplicar en las nuevas plataformas automatizadas y se realizó la implementación de nuevos procesos automatizados. Como resultado de esta implementación, el laboratorio pudo aumentar significativamente la eficiencia del proceso de extracción de ADN para procesar hasta 768 muestras en 220 minutos y la eficiencia del proceso de PCR para procesar hasta 768 muestras en una sola corrida de 120 minutos mediante el uso de plataformas automatizadas. Se recomienda el uso constante de las plataformas automatizadas por aumentar la cantidad de muestras procesadas y disminuir los tiempos de procesamiento y a su vez, disminuir la probabilidad de errores rutinarios.

Palabras claves: Langostino, PCR automatizado, extracción de ADN automatizado, automatización.

Abstract

The company Marinasol SA had the need to increase the processing of samples from its molecular biology laboratory. To achieve this, automated platforms were implemented that had the potential to increase the efficiency of DNA extraction processes and the analysis of these samples using the Polymerase Chain Reaction (PCR). Training was carried out on knowledge and procedures to be applied in the new automated platforms and the implementation of new automated processes was carried out. As a result of this implementation, the laboratory was able to significantly increase the efficiency of the DNA extraction process to process up to 768 samples in 220 minutes and the efficiency of the PCR process to process up to 768 samples in a single 120 minutes run by using automated platforms. The constant use of automated platforms is recommended to increase the number of samples processed and reduce processing times and, in turn, reduce the probability of routine errors.

Key words: Prawd, automated PCR, automated DNA extraction, automated, automation.

1. Introducción

Desde 1869, año en que la primera extracción de ADN ocurrió, se ha logrado una evolución en el proceso que ha permitido un mejor uso de la información biológica (1). La necesidad de aumentar el número de muestras procesadas ha generado el requerimiento de automatización del proceso de extracción de ADN con el fin de optimizar el tiempo de trabajo, la seguridad laboral y los costos de operaciones, brindando a la vez resultados más reproducibles con mejor calidad (1).

La mayoría de los métodos clásicos de extracción de ADN utilizan compuestos fenólicos peligrosos usados en algunos tipos de muestras biológicas; este procedimiento, que busca obtener ADN genómico de gran calidad, es crítico para el uso posterior de este ADN en otras aplicaciones (2). En tal sentido, la extracción de ácidos nucleicos se ha combinado con la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) desde la década de los años 90 en la identificación de microorganismos mediante el uso de secuencias específicas (3)

Esta técnica permite la amplificación de ácidos nucleicos con gran sensibilidad y especificidad, lo cual permite su uso en varias ciencias como biomedicina, identificación forense, inspección vegetal y animal, y seguridad alimentaria como un método de diagnóstico molecular. (4)

La técnica de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR), al igual que su predecesora, la PCR simple, utiliza secuencias de cebadores y, ocasionalmente, sondas fluorogénicas para la amplificación e identificación de genes de microorganismos, obteniéndose información cuantitativa como la concentración de ADN (3). En sus inicios, el sistema de PCR en tiempo real involucró el uso de bromuro de etidio en cada ciclo de multiplicación, sistema que permitía detectar la fluorescencia emitida

después de irradiar con luz ultravioleta a las muestras a través de una cámara CCD (*charge-coupled device*) con sistema de refrigeración (5). Como consecuencia de esto, se podía registrar un aumento de fluorescencia conforme se intercalaba bromuro de etidio en los productos de doble hebra de ADN. Finalmente, se generaba un gráfico como resultado del aumento de la fluorescencia conforme aumentaban los ciclos de reacción (5).

Esta técnica fue mejorando a lo largo de los años, haciéndose muy frecuente su uso dentro del mundo científico; a la vez, logró entrar a un mercado competitivo, generándose una gama variada de equipos de PCR de diferentes compañías que llevó a un aumento notable la cantidad de publicaciones científicas enfocadas en qPCR (5).

En la actualidad existen fluoróforos de muy baja toxicidad, como el SYBR™ Green, capaces de formar complejos por intercalación con los ácidos nucleicos que resultan en un aumento considerable de fluorescencia al unirse al surco menor del ADN de doble cadena (6). Como mecanismo alternativo de cuantificación del producto amplificado, se han desarrollado sondas fluorogénicas usadas como moléculas reporteras en el qPCR como sondas de hidrólisis, las cuales funcionan transfiriendo energía de una molécula reportera a una molécula receptora (7).

La tecnología de PCR cuantitativo ha sido recomendada internacionalmente por su sensibilidad y especificidad superiores, si bien la precisión y repetibilidad dependen de la optimización del ensayo particular que se quiera aplicar (8). La falta de recomendaciones específicas para la realización de estos protocolos o sus

validaciones deja abierta la posibilidad de que la implementación de los métodos de qPCR se haga en base al criterio del personal analítico del laboratorio (8).

A continuación, se presentan algunos métodos de extracción de ADN y ARN utilizados comúnmente a la fecha, con sus ventajas y limitaciones:

Autor	Metodología	Ventajas o Principales resultados	Desventajas o limitaciones
Tan Siun Chee and Beow Chin Yiap(1)	Metodologías de extracción de ácidos nucleicos	Solventes orgánicos permiten la separación del ADN de los componentes celulares. La metodología de fase solida es más rápida a comparación de los solventes orgánicos. El método de perlas magnéticas es el más eficiente en la actualidad	El protocolo de solventes orgánicos puede ser laborioso. Las fases solidas de extracción pueden presentar especificidad reducida.
Tan Siun Chee and Beow Chin Yiap (1)	Sistemas de extracción automatizados	Equipos complejos realizan la extracción de ácidos nucleicos rápida y eficientemente. Tiempo de trabajo reducido, disminución del costo laboral, incremento en calidad y reproducibilidad de resultados. Disminuye los eventos de contaminación cruzada y la identificación de muestras por código de barras está disponible.	Los equipos actuales operan en laboratorios mas no en el campo. Estos equipos continúan reduciendo su tamaño, por lo que, la creación de versiones portables de estos equipos es una posibilidad a futuro.
Houriiyah Tegally (9)	Sistemas de extracción automatizados	Los equipos automatizados pueden funcionar continuamente y permitir buenos resultados mientras hayan sido debidamente calibrados. Estos equipos permiten procesamiento de un número elevado de muestras y están abierto a diferentes programaciones según sea la necesidad.	A pesar de utilizar sistemas complejos para el pipeteo automatizado, no se ha logrado eliminar por completo la participación humana. Las plataformas deben cumplir criterios base como capacidad, precisión volúmenes pequeños para ser considerados aptos para laboratorios de ciencias.

La especie “*Penaeus vannamei*”-es un langostino blanco de costa del Pacífico que se distribuye naturalmente desde México hasta el Perú; en su etapa adulta se reproducen en el mar abierto tropical y el estadio postlarva se dirige a las costas para pasar el resto de las etapas (juvenil, adolescente y adulta). El inicio de cultivo comercial se vio favorecido gracias a las condiciones ambientales del fenómeno del Niño (temperaturas cálidas y ambientes húmedos). (10)

Este langostino representa más del 50% de cultivos de crustáceos mundiales con un alto valor en el mercado mundial (11). Actualmente, se considera países líderes en este mercado a los que están localizados en la parte sur y sureste de Asia; sin embargo, también hay países líderes en América Latina dedicados a la industria acuícola (11).

Desde 1968 la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) ha realizado la difusión internacional de detección y control de enfermedades de animales acuáticos a través de manuales y listas que mencionan los diferentes métodos a aplicar a las enfermedades estudiadas por los laboratorios de sanidad acuática (12). Cabe mencionar que la metodología de diagnóstico de las enfermedades que afectan a las criaturas acuáticas está en constante cambio, por lo que los manuales se actualizan constantemente para difundir tanto información científica y avances tecnológicos que apoyan al diagnóstico en sanidad animal acuática (12).

La OMSA describe que las muestras como heces, suero, tejido puede tener inhibidores endógenos o exógenos que compliquen la realización de ciertas pruebas; con mayor importancia en el caso de pruebas que dependen de enzimas, como la PCR (12).

Adicionalmente, la OMSA menciona que los métodos analíticos tener la capacidad de dar un resultado positivo o negativo para un animal o población de ellos; esto es de suma importancia, dado que es obligatorio certificar la presencia o ausencia de virus y bacterias patógenas en animales utilizados para el transporte o comercio como *Hepatobacter penaei*, *Vibrio parahaemolyticus*, entre otros (12).

“*Penaeus vannamei*” es muy popular para varias empresas dedicadas al rubro de acuicultura; esto ha llevado a mejorar las condiciones de crecimiento y desarrollo de este organismo, lo que ha sido materia de estudio en granjas y laboratorios especializados en su crianza (13). Considerando este interés creciente por la especie como producto comercial, se han desarrollado protocolos para evaluar el grado de nutrición, el ambiente, el comportamiento y la salud de los langostinos (13). El indicador de salud del langostino es de gran importancia para el laboratorio del centro de producción debido a que permite evaluar lo adecuado de las condiciones de crianza en el tanque y estimar la uniformidad de los estadios y de las partes de los individuos como exoesqueleto, hepatopáncreas, músculos, grasa, etc.; (13).

Una de las aplicaciones de biología molecular en este rubro es la extracción de ácidos nucleicos, seguida del análisis por qPCR, para comprobar la sanidad de estos alimentos antes de ser exportados a otro país. Por ello, la aplicación de biotecnología en acuicultura permite crear acciones de prevención y afrontar posibles infecciones bacterianas y virales nocivas para el langostino (14); La cosecha de langostinos se ha logrado en ambientes artificiales para suplir la elevada demanda mundial generada por el consumo de estos productos marinos (15).

Esta demanda lleva a elevar el número de muestras a analizar, lo cual puede ser muy laborioso al ser realizado de forma manual y existen puntos de control

susceptibles a error humano. Este estudio busca describir cómo la implementación de tecnología automatizada ayudó a optimizar estos procesos y generar beneficios al conjunto de pasos a realizar dentro del laboratorio.

2. Problema:

¿Las tecnologías automatizadas pueden generar beneficios en diferentes escalas de procesamiento de muestras de langostino a comparación de una metodología manual?

Población	Intervención	Comparador	Resultado
Empresas exportadoras que necesitan realizar un control de calidad de sus productos	Implementación de tecnología automatizada de detección molecular	Procesamiento manual	Diferencia en el N° de muestras procesadas por unidad de tiempo Diferencia en el tiempo de procesamiento de un número fijo de muestras

Evaluación de viabilidad:

Factible	Interesante	Novedoso	Ético	Relevante
Existen varias empresas exportadoras que realizan este proceso	Automatización de procesos es muy interesante desde la perspectiva de tiempos y costos	Es muy novedoso en el medio local	Brindar resultados más cercanos a la realidad	Ganancia (monetaria, conocimientos, etc.) y calidad del producto

3. Justificación:

Las empresas productoras de alimentos realizan un control de calidad para asegurar la sanidad alimentaria de sus productos(16); sin embargo, este proceso puede ser muy demandante si se realiza de forma manual debido al algoritmo a seguir.

Las tecnologías de automatización optimizan los procesos al reducir el tiempo del análisis y conservar, o incluso mejorar, la calidad de estos (17). Actualmente existen diversas plataformas automatizadas de detección molecular disponibles que aumentan la eficiencia de los procesos en comparación a la forma de trabajo manual, permitiendo el procesamiento de muchas muestras en menor tiempo (18).

La automatización en el proceso de manipulación de líquidos es una de las más comunes en laboratorios, clínicos, industriales y regulatorios (19). En general, la implementación de sistemas automatizados en los procesos de control de calidad sanitaria adiciona garantía de calidad, dado que mejora los controles internos del algoritmo que forman parte de la política de operaciones del laboratorio de una empresa (20). Además de esta mejora en los estándares de calidad y del aumento de la capacidad de procesamiento de muestras, la relevancia de la implementación está en que puede traducirse en un ahorro de dinero para la empresa, al realizar ella misma el proceso y no tercerizar con otra empresa, además de disponer de al menos parte del personal anteriormente dedicado al análisis manual para realizar otras labores.

Las competencias profesionales que aborda la implementación de tecnologías de automatización en el control de calidad sanitaria de los alimentos se sintetizan en los puntos siguientes:

- Conocimientos de automatización: Es importante conocer los tipos de equipos automatizados en el mercado y las tecnologías de cada uno para poder saber cuál es el más adecuado a nuestro propósito.
- Principios de biología molecular: Se deben aplicar conocimientos básicos de biología molecular como el manejo de muestras, bioseguridad, técnicas de pipeteo, etc.
- Tópicos en extracción de ácidos nucleicos, PCR & qPCR: Las tecnologías automatizadas utilizan como principios los conocimientos básicos de extracción de ácidos nucleicos, reacción en cadena de la polimerasa, entre otros.

4. Objetivo general

- Comparar la eficiencia de los procesos manual de extracción y PCR con la del proceso automatizado para procesar muestras de langostinos dentro del flujo laboral de la empresa.

4.1 Objetivos específicos

- Comparar la eficiencia en términos de número de muestras procesadas por minuto de los procesos de extracción de ácidos nucleicos y PCR manual versus automatizados.
- Evaluar la eficiencia de los procesos manual y automatizado en escenarios de baja y alta carga laboral.
- Describir el proceso de capacitación para la implementación del proceso automatizado.

5. Hipótesis general

- La implementación de tecnologías automatizadas de extracción de ácidos nucleicos y PCR en tiempo real generan un impacto positivo en la eficiencia del flujo de trabajo

5.1 Hipótesis específicas

- El proceso automatizado de extracción de ácidos nucleicos y PCR en tiempo real disminuyen el tiempo de procesamiento y aumentan el número de muestras procesadas de langostino por minuto.
- La eficiencia de los procesos de extracción y PCR varía según la carga laboral de las jornadas de trabajo.
- La capacitación del personal del laboratorio de la empresa, previa a la implementación del proceso automatizado, facilita la adaptación y aprovechamiento de la nueva tecnología para los propósitos de la empresa.

6. Metodología

Actividades de capacitación dentro del laboratorio: Se realizaron una serie de capacitaciones de información teórica y práctica sobre varios tópicos sobre biología molecular previos a la implementación de los equipos automatizados:

- Principios de biología molecular y buenas prácticas de laboratorio (BPL)
- Tópicos de extracción de ácidos nucleicos, PCR convencional y tiempo real
- Conocimientos de automatización

Proceso manual: El proceso rutinario del laboratorio consistía en los siguientes pasos:

- Extracción de ácidos nucleicos: el laboratorio contaba con el equipamiento requerido para realizar este proceso a pequeña y gran escala (cabinas de bioseguridad, equipos de agitación, minicentrífugas para microtubos, termobloques, centrífugas, micropipetas, entre otros). Adicionalmente, se realizaba este proceso usando kits comerciales que usaban la química de columnas de sílica para aislamiento de ADN microbiano y viral.

Los tiempos de extracción manual de ADN fueron estimados en base a aproximaciones de trabajo diario recolectados en el laboratorio durante las semanas de implementación del nuevo proceso automatizado (Anexo 1).

- PCR convencional: el laboratorio estaba equipado con una buena cantidad de termocicladores convencionales permitiendo procesar muestras en paralelo. El laboratorio tenía implementado una variedad de protocolos de PCR para diferentes bacterias y virus de ADN y ARN. Se tomó como tiempo de procesamiento de PCR

manual el tiempo total indicado por el termociclador utilizando una corrida de PCR estándar que tenía desnaturalización inicial, ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión, y una extensión final (Anexo 1).

- Análisis de datos mediante electroforesis de ADN: Para esta actividad se tenían una gran cantidad de equipamiento (cámaras de electroforesis horizontal de gran tamaño, fuentes de poder, entre otros) y los reactivos correspondientes (soluciones tampón de corrida, agarosa grado biología molecular, reactivo intercalante de ADN, marcador de peso molecular 100bp). No se consideró el tiempo de trabajo de electroforesis dado que no fue medido durante el proceso de implementación y era un tiempo muy variable que dependía de muchos procesos (preparación y enfriamiento de agarosa, cargado de las muestras a los geles, preparación de soluciones tampón de corrida entre otros).

Proceso automatizado: El nuevo proceso implementado consistió en estos pasos:

- Extracción automatizada de ácidos nucleicos: se realizó la instalación del equipo OKTOPURE, de la marca LGC Biosearch technologies, equipo especializado en procesar hasta 768 muestras en una sola corrida usando la química de perlas magnéticas (21). Una vez insertadas las muestras en el equipo el programa de inicio indicaba el tiempo de corrida del proceso total.



Imagen referencial, disponible en: <https://www.biosearchtech.com/products/nucleic-acid-sample-preparation/dna-extraction-systems/oktopure-bead-based-automated-dna-extraction-system>

- PCR automatizado en tiempo real: se realizó la instalación del equipo INTELLIQUBE, de la marca LGC Biosearch technologies, equipo especializado en procesar hasta 768 muestras en una sola corrida con la capacidad de analizar múltiples genes de interés mediante el uso de reactivos comunes en qPCR (sybr green, sondas de hidrolisis) (22). Después de ingresar la reacción maestra al equipo, este realizaba la dispensación del reactivo, el cargo de muestras y sellado de estas de forma automatizada e indicaba el tiempo de procesamiento total para todas las muestras.



Imagen referencial, disponible en: <https://www.biosearchtech.com/products/pcr-reagents-kits-and-instruments/pcr-instruments-and-software/array-tape-ultra-high-throughput-platform/intelliqube>

Cuadro 1: Variables de este trabajo

Variable	Causalidad (Dependiente O Independiente)	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Medidas de tendencia central
Tiempo de procesamiento	Dependiente	Tiempo requerido para realizar el procesamiento de muestras. Unidad de medida: minutos	Cuantitativa continua	De razón	Media
Numero de muestras procesadas	Dependiente	Número total de muestras que son procesadas en cada procedimiento. Unidad de medida: unidad de muestra	Cuantitativa continua	De razón	Media
Eficiencia del proceso	Dependiente	Proporción de número de muestras procesadas en una unidad de tiempo determinado. Unidad de medida: número de muestras procesadas por minuto	Cuantitativa continua	De razón	Media
Tipo de proceso	Independiente	Tipo de proceso (manual o automatizado)	Cualitativa dicotómica	Nominal	-

7. Resultados:

Gráfica 1: Eficiencia del proceso de extracción

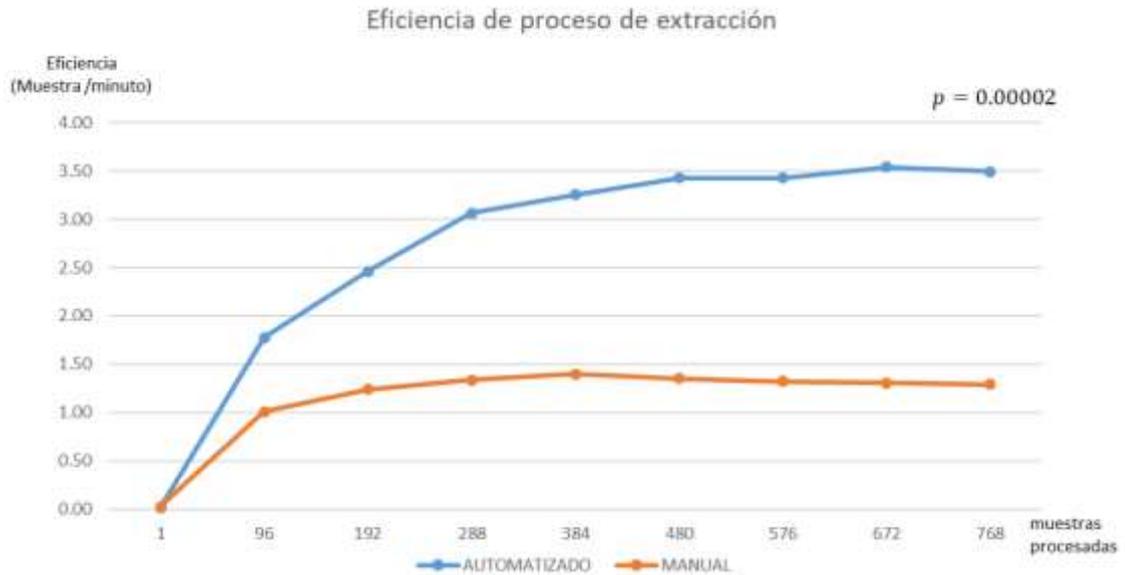


Gráfico.1: Eficiencia del proceso de extracción. La gráfica muestra en el eje X el número de muestras procesadas y el eje Y muestra las eficiencias expresadas como el número de muestras procesadas por minuto.

Una vez implementado el equipo automatizado para el proceso de extracción se realizó una comparación de su eficiencia respecto a la del proceso manual ejecutado cotidianamente dentro del laboratorio. Para esto, el laboratorio contabilizó el tiempo en minutos de ambos procesos apoyados por los apuntes del cuaderno de laboratorio y el tiempo indicado por el equipo. Se puede observar que a mayor cantidad de muestras de extracción procesadas la eficiencia del proceso automatizado supera significativamente a la eficiencia del proceso manual ($p=0.00002$). Eso indica que el equipo automatizado de extracción de ácidos nucleicos permite el procesamiento de una mayor cantidad de muestras al disminuir el tiempo de procesamiento.

Gráfica 2: Eficiencia del proceso de PCR

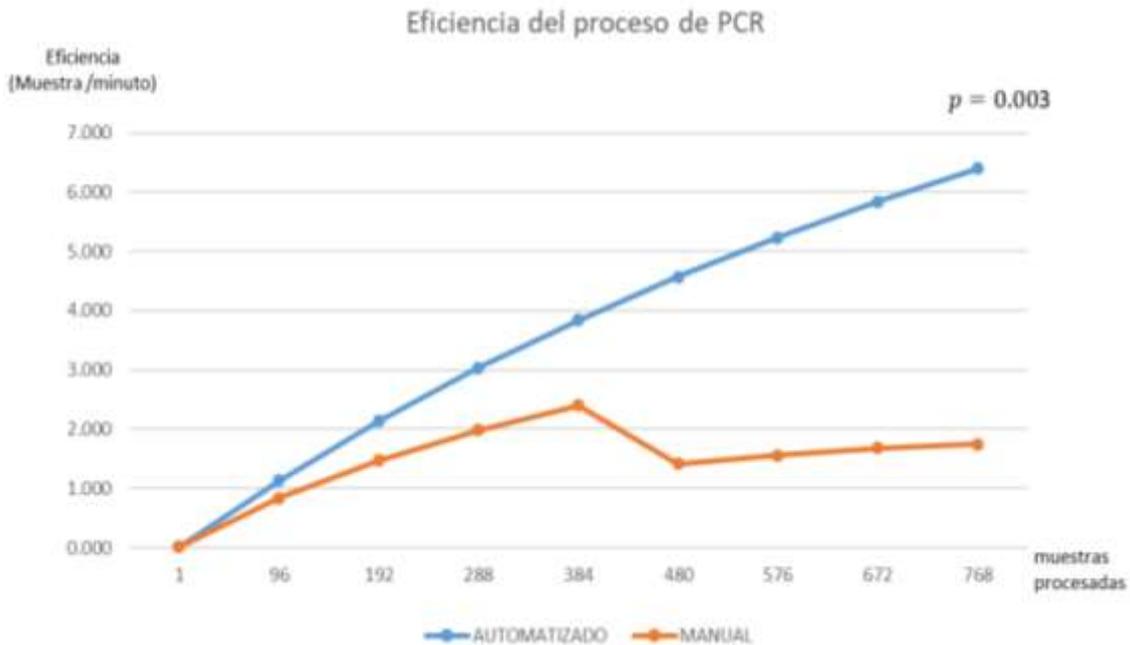


Gráfico.2: Eficiencia del proceso de PCR. La grafica muestra en el eje X el número de muestras procesadas y en el eje Y muestra las eficiencias expresadas como el número de muestras procesadas por minuto.

De igual manera, se implementó un equipo automatizado para la realización de PCR en tiempo real, el cual dispensaba la mezcla maestra, dispensaba las muestras y realizaba el termociclaje requerido. Se realizó una comparación de eficiencia del proceso de PCR automatizado respecto del PCR manual que realizaban diariamente analizando únicamente protocolos que usan ADN. Con ayuda de los datos de tiempo de procesamiento indicado en los termocicladores se puede observar que el equipo automatizado logra superar significativamente la eficiencia del procedimiento manual ($p=0.003$). Esto indica que el equipo automatizado de PCR en tiempo real permite el procesamiento de una mayor cantidad de muestras en menor tiempo.

Gráfico 3: Eficiencia del proceso de extracción en una jornada laboral de baja demanda

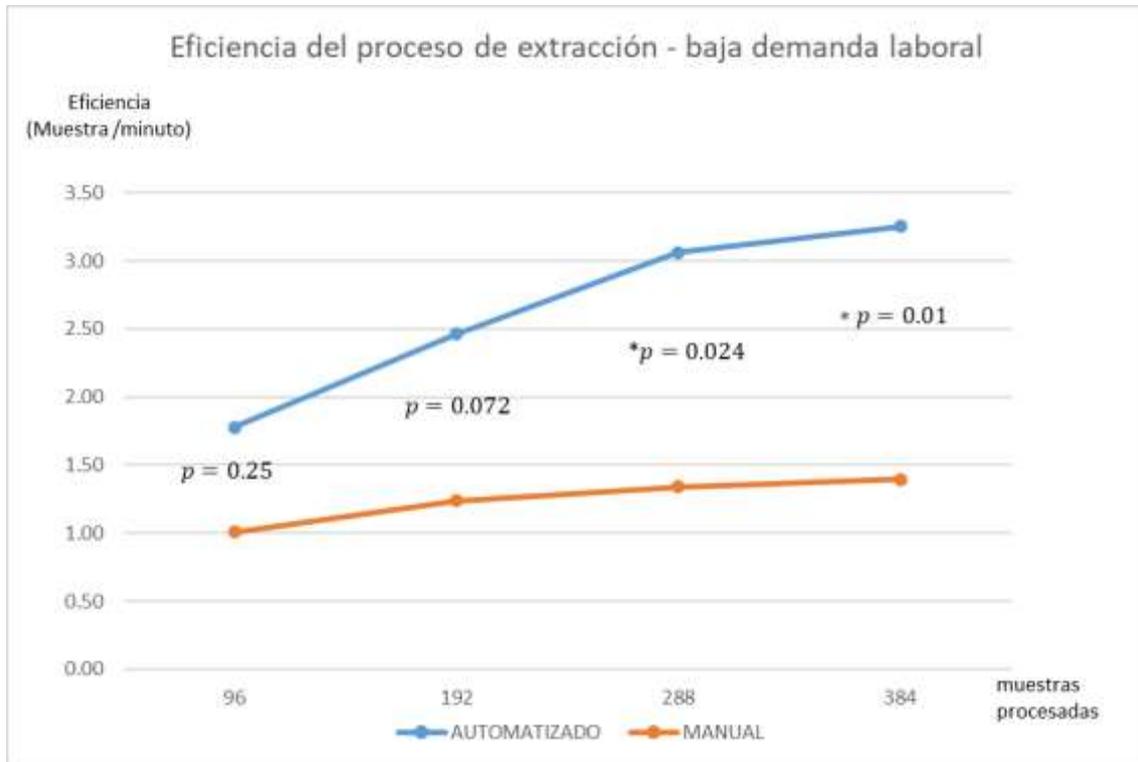


Gráfico.3: Eficiencia del proceso de extracción en una jornada laboral de baja demanda. La gráfica muestra en el eje X el número de muestras procesadas y el eje Y muestra las eficiencias expresadas como el número de muestras procesadas por minuto.

Una vez implementado el equipo automatizado de extracción, se quiso conocer el desempeño del equipo en una jornada laboral en la cual había una baja demanda de procesamiento (número de muestras por procesar < 384). Al comparar las eficiencias del proceso manual y automatizado en base a un número bajo de muestras se observó que la eficiencia del proceso automatizado superaba significativamente a la eficiencia del proceso manual a partir de 288 muestras ($p=0.024$). Valores de procesamiento inferiores a 288 muestras no muestran una variación significativa, tanto con 96 muestras ($p=0.25$) como con 192 muestras ($p=0.072$).

Gráfico 4: Eficiencia del proceso de extracción en una jornada laboral de alta

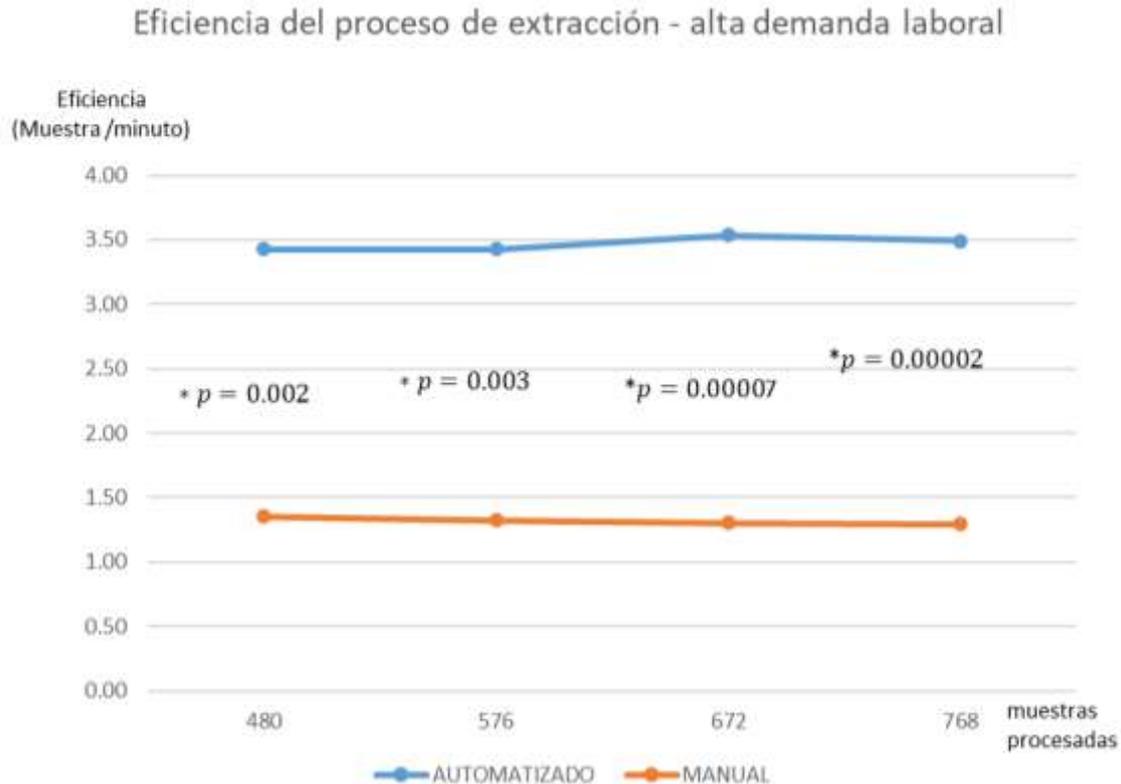


Gráfico.4: Eficiencia del proceso de extracción en una jornada laboral de alta demanda. La gráfica muestra en el eje X el número de muestras procesadas y el eje Y muestra las eficiencias expresadas como el número de muestras procesadas por minuto.

De igual manera, al realizar la comparación de las eficiencias de los procesos de extracción de forma manual y automatizada en el escenario de una jornada laboral con alta demanda (número de muestras por procesar > 384), se puede observar que la eficiencia del proceso automatizado continúa superando la eficiencia del proceso manual, con una diferencia significativamente mayor al procesar 480 muestras ($p=0.002$), 576 muestras ($p=0.003$), 672 muestras ($p=0.00007$) y 768 muestras ($p=0.00002$). Esto indica que el proceso de extracción automatizado tiene una eficiencia constantemente superior a la del procedimiento estándar durante una jornada laboral altamente demandante.

Gráfico 5: Eficiencia del proceso de PCR en una jornada laboral de baja demanda

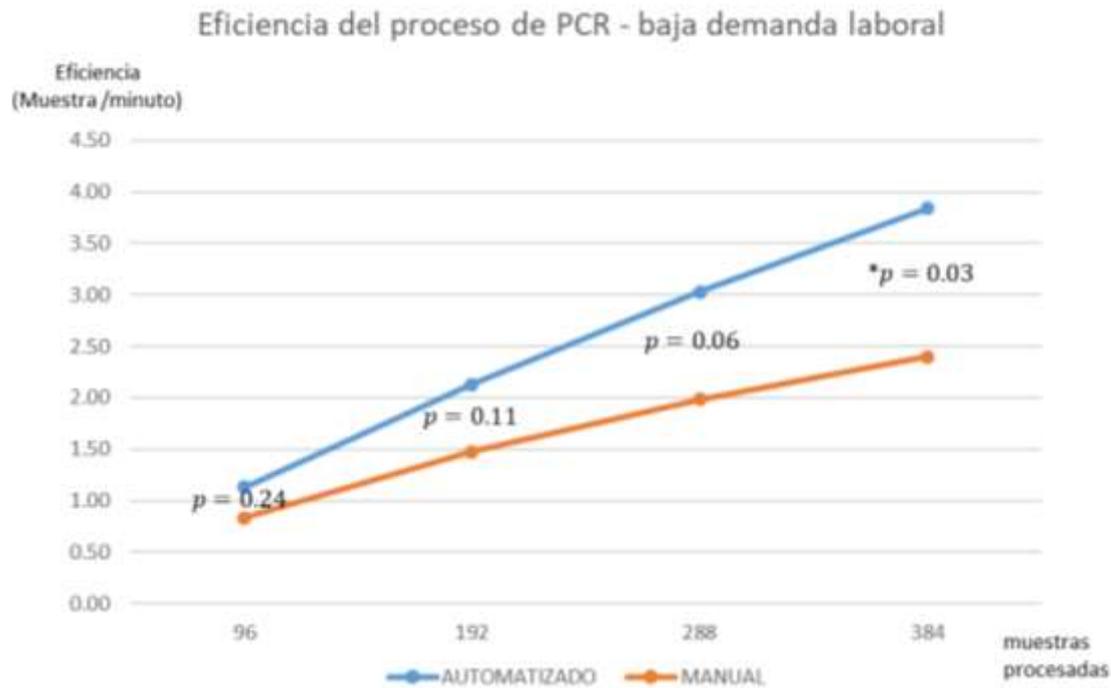


Gráfico.5: Eficiencia del proceso de PCR en una jornada laboral de baja demanda. La gráfica muestra en el eje X el número de muestras procesadas y el eje Y muestra las eficiencias expresadas como el número de muestras procesadas por minuto.

Una vez implementado el equipo automatizado de PCR en tiempo real, se comparó el desempeño del equipo en una jornada laboral de baja demanda de procesamiento (número de muestras por procesar < 384). Al comparar las eficiencias del proceso de PCR manual y automatizado en base a un número bajo de muestras no se observó diferencias significativas entre la eficiencia del proceso automatizado y la eficiencia del proceso manual al evaluar intervalos de hasta 288 muestras ($p=0.06$). Sin embargo, el proceso automatizado empieza a mostrar una diferencia significativa a partir de 384 muestras ($p=0.03$).

Gráfico 6: Eficiencia del proceso de PCR en una jornada laboral de alta demanda

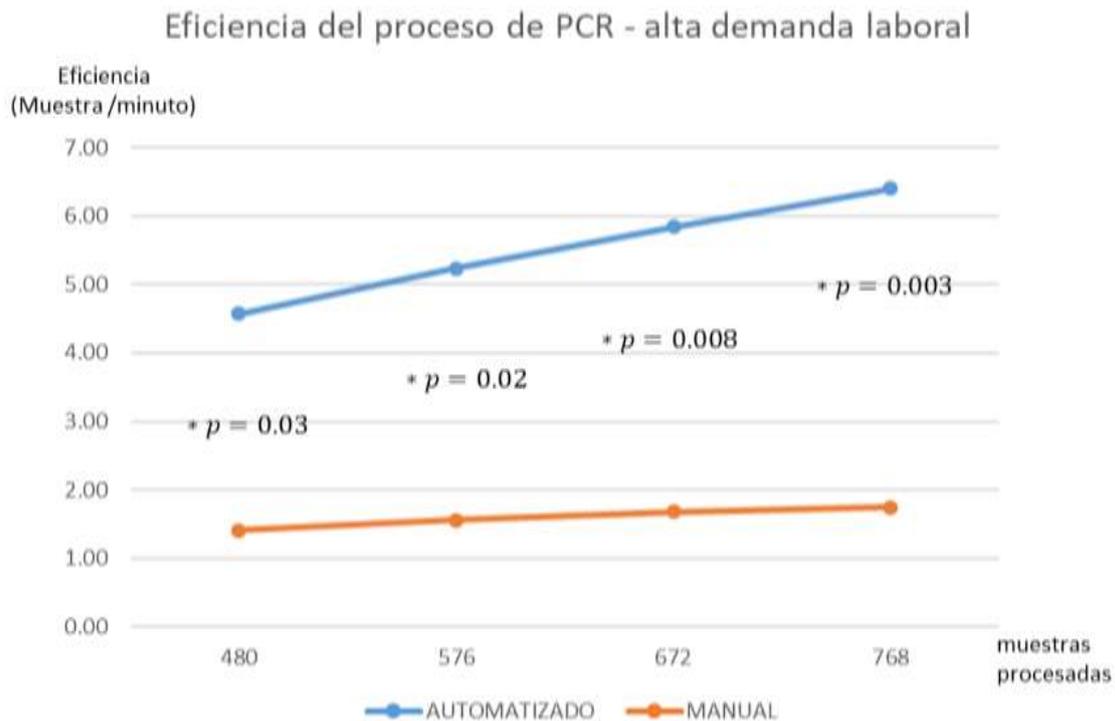


Gráfico.6: Eficiencia del proceso de PCR en una jornada laboral de alta demanda. La gráfica muestra en el eje X el número de muestras procesadas y el eje Y muestra las eficiencias expresadas como el número de muestras procesadas por minuto.

Del mismo modo, se comparó las eficiencias del proceso de PCR de forma manual y automatizada en el escenario de una jornada laboral de alta demanda (número de muestras por procesar > 400) y se encontró una diferencia significativa entre la eficiencia del proceso de PCR automatizado sobre la eficiencia del proceso manual al evaluar 480 muestras ($p=0.03$), 576 muestras ($p=0.02$), 672 muestras ($p=0.008$) y 768 muestras ($p=0.003$). Esto indica que las diferencias encontradas a mayor cantidad de muestras son significativas, e incluso con una tendencia a acentuarse a medida que aumenta el número de muestras procesadas.

Cuadro 2 – Actividades de aprendizaje realizadas al grupo de laboratorio

Tema principal	tópicos	Temas tratados
Principios de biología molecular y BPL	Aplicaciones de trabajos con ADN y ARN	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Técnicas de laboratorio aplicados a la manipulación de ADN y ARN. ◦ Técnicas de pipeteo ◦ Buenas prácticas de laboratorio.
Tópicos de extracción de ácidos nucleicos, PCR y qPCR	Extracción de ácidos nucleicos	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Químicas disponibles para la extracción. ◦ Almacenamiento de muestras
	PCR convencional	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Principios de PCR convencional ◦ Cálculo de reactivos ◦ Preparación de mezcla maestra ◦ Análisis de resultados mediante electroforesis de ADN
	PCR en tiempo real	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Principios de PCR en tiempo real ◦ Químicas disponibles (reactivo intercalante fluorescente y sondas fluorescentes) ◦ Ensayos multiplex ◦ Análisis de resultados
Conocimientos de automatización	Generalidades	◦ Introducción a automatización de ácidos nucleicos
	Equipo automatizado de extracción	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Características técnicas del equipo automatizado de extracción de ácidos nucleicos "OKTOPURE" ◦ Configuración del equipo según la demanda de muestras a procesar ◦ Cálculo de volúmenes de reactivos a utilizar
	Equipo automatizado de PCR en tiempo real	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Características técnicas del equipo automatizado de PCR en tiempo real "INTELLIQUBE" ◦ Configuración del equipo según la demanda de muestras a procesar ◦ Cálculo de volúmenes de reactivos a utilizar

Cuadro 2: Actividades de capacitación y actualización de conocimientos realizadas con el grupo de laboratorio. Lista de temas tratados con el grupo del laboratorio como parte del programa de capacitación previo a la utilización de los equipos automatizados.

Se realizó una serie de capacitaciones al personal del laboratorio durante varios días con la finalidad de asegurar una correcta transición de los procedimientos manuales a los automatizados dentro del laboratorio. Para esto se capacitó dando clases de temas específicos de biología molecular para uniformizar en lo posible el conocimiento de todos los integrantes de laboratorio como antesala a la utilización

de equipos modernos y sofisticados que basan su funcionamiento en la teoría de automatización, la extracción de ADN y qPCR. Al finalizar estas capacitaciones el personal del laboratorio mejoró su destreza y seguridad para poder utilizar los nuevos equipos de manera correcta y eficiente. Esta capacitación se realizó durante 15 días hábiles, desde las 8:00am hasta las 5:00pm y fue dirigido a 7 personas.

8. Discusión

A inicios del año 2020, la empresa Marinasol SA decidió mejorar los procesos de extracción de ADN y PCR convencional manuales existentes mediante la incorporación de equipos automatizados que realicen estos procesos con la finalidad de aumentar el rendimiento funcional del laboratorio.

La implementación del equipo Oktopure para la realización del proceso automatizado de extracción de ADN permitió mejorar positivamente la capacidad de procesamiento del laboratorio en comparación con el proceso manual implementado previamente en el laboratorio de biología molecular. El equipo Oktopure se especializa en extracción automatizada de ácidos nucleicos de alta escala dado que presenta un formato de procesamiento de 8 placas de pozo profundo de 96 pocillos cada uno, brindando una capacidad de procesamiento de hasta 768 muestras simultáneas (21). Los tiempos de procesamiento pueden ser ajustados según el tipo de muestra inicial (animal o vegetal) dado que la compañía LGC tiene una amplia selección de kits de extracción de ADN que utilizan la química de perlas magnéticas compatibles con equipos automatizados (23).

Adicionalmente, la implementación del equipo Intelliquibe permitió la actualización del proceso manual de PCR convencional hacia PCR en tiempo real, aumentando su capacidad de detección y brindando un grado de automatización excepcional. El equipo Intelliquibe es una plataforma automatizada que puede realizar múltiples pasos de forma automatizada como la dispensación de las muestras, la dispensación de la reacción maestra, el sellado de las muestras y el termociclaje (22). Además, tiene un novedoso formato de placas en el cual se dispensa hasta 768 muestras en una misma placa y a la vez utiliza un pequeño volumen de reacción de 0.8 μL de

mezcla maestra de PCR en tiempo real, permitiendo el ahorro considerable de muestras y reactivos (22).

La automatización de ambos procesos ha permitido reducir los tiempos de procesamiento y maximizar la cantidad de muestras procesables del laboratorio dentro de una jornada de trabajo. Adicionalmente, el espacio físico ocupado por ambos equipos automatizados permitió la redistribución de los ambientes de laboratorio brindando más espacio para la realización de otras actividades.

La demanda de procesamiento de muestras puede variar entre cantidades bajas y altas de muestras por jornada laboral, y el personal puede optar por alguno de los 2 métodos bajo condiciones específicas. En el escenario específico en el que se desarrolló el trabajo, se ha demostrado que la extracción automatizada de ADN tiene una mayor eficiencia respecto al procesamiento manual a medida que el número de muestras se incrementa. Esto implica que, en una jornada laboral demandante, el personal del laboratorio puede realizar otras labores requeridas dentro de las instalaciones mientras el equipo automatizado realiza la mayor parte de todo el trabajo.

Si bien los resultados mostraron que no había diferencias significativas al realizar la extracción automatizada de una carga baja de muestras (96 a 192), es aconsejable el uso de la plataforma automatizada dado que puede otorgar ventajas adicionales al tiempo de procesamiento sobre el procedimiento manual, como la reducción de los posibles errores que podrían ocurrir, entre destacan fallas en la dispensación de los reactivos en todas las muestras, pipeteo disparejo entre muestras, rotulación incorrecta de las muestras entre otros. También, la química de perlas magnéticas presente en el proceso automatizado de extracción permite evitar la centrifugación,

lo cual contribuye a reducir el equipamiento requerido y los tiempos de procesamiento, aunque esto último se manifiesta de forma significativa con un número mayor de muestras.

De igual manera, durante las jornadas laborales con alta carga de procesamiento, la extracción automatizada ha demostrado tener una ventaja significativa de procesamiento sobre el proceso manual, el cual se acentúa considerablemente mientras más muestras sean procesadas. A la mayor velocidad de procesamiento se suma el hecho de que el personal de laboratorio es más susceptible a cometer errores cuantas más horas de trabajo hayan transcurrido y cuanto mayor sea el número de muestras procesadas.

El proceso de PCR automatizado ha generado una eficiencia significativamente mayor al proceso manual. En jornadas laborales de baja demanda de procesamiento (menos de 384 muestras) no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, esto fue posible gracias a la capacidad instalada con la que contaba el laboratorio, ya que, al tener varios termocicladores convencionales, el proceso manual de un grupo considerable de muestras podía ocurrir paralelamente.

En el caso de jornadas de alta demanda de procesamiento, las diferencias entre las eficiencias de procesamiento manual y automatizado de PCR se hacen significativas desde 384 muestras en adelante. Esto refleja la capacidad de alta producción del Intelliquibe. La capacidad de procesar hasta 784 muestras simultáneamente, y la capacidad de utilizar 0.8 μL de volumen de mezcla maestra, permite una mejora, no únicamente en la eficiencia, sino también en la cantidad de reactivos de PCR requeridos para cada muestra (22).

Esta implementación de equipos automatizados es un avance importante de la empresa dado que los documentos de la OMSA describen las técnicas de biología molecular como aptas para el control de calidad en sanidad animal, y cualquier actualización o mejora en el proceso permitirá la entrega de resultados más confiables (12).

Es importante resaltar que en el mercado biotecnológico existen diversos equipos que permiten automatizar los procesos de extracción de ADN y PCR; sin embargo, la empresa debe evaluar si las características de estos equipos se ajustan a la necesidad del laboratorio. Adicionalmente, los aspectos presupuestales también juegan un rol importante dado que el sistema más eficiente no se basa únicamente en capacidad de procesamiento, sino también en una disminución de los costos de operación del laboratorio.

La comparación entre la eficiencia del sistema automatizado y la del procedimiento manual en este estudio se realizó luego de que el personal del laboratorio recibiera una capacitación en aspectos básicos de biología molecular y conceptos de automatización. El proceso de capacitación fue realizado con la intención de mejorar los conocimientos de los profesionales de laboratorio y con el convencimiento de que con ello se permitiría un mejor aprovechamiento de las nuevas herramientas. Estos profesionales tienen experiencia realizando los trabajos rutinarios solicitados por la empresa; sin embargo, cuando se realizó la automatización de los procesos se consideró necesario brindar la información requerida para asegurar el buen uso de los equipos y su funcionamiento a largo plazo.

Se brindó clases de diferentes tópicos de biología molecular, entre ellos destacamos los principios biológicos sobre los apoyan la extracción de ADN, la PCR convencional y la PCR en tiempo real, con el fin de armonizar los niveles de conocimientos del personal ante la posible existencia de una barrera académica.

Las carreras ofrecidas por la universidad local, la Universidad Nacional de Tumbes, cubren un conjunto de profesiones acorde a una variedad de oportunidades laborales generadas por las empresas locales (24). Los tópicos de biología molecular y tecnologías de automatización avanzadas son estudiados en mayor detalle durante la formación universitaria de posgrado (25). La empresa puede tener profesionales de diferentes espacios geográficos, sin embargo, no todos los departamentos del Perú tienen acceso a información y prácticas requeridas de forma local que puedan ser utilizadas en este tipo de trabajo incluso desde la formación universitaria en pregrado.

La realización de esta capacitación relacionada al conocimiento de técnicas moleculares es ventajosa para la empresa dado que el uso de herramientas moleculares brinda mayor competitividad y fortalece la capacidad del personal. El tema de formación en conocimientos y técnicas aplicadas en biología molecular permite aumentar la competitividad de profesiones para aplicar a diferentes oportunidades laborales mediante la realización de cursos de especialización de posgrado, talleres, diplomados dirigidos a biología molecular o mediante un servicio de capacitación de personal. Localmente se puede encontrar una empresa enfocada en brindar asistencia científica en las que se pueden desarrollar habilidades en biología molecular para brindar soporte científico a diferentes instituciones y empresas (26). Esto es un ejemplo de oportunidades de capacitación,

aprendizaje y especialización que puede permitir a los profesionales aprender temas de biología molecular de manera local cuyos servicios pueden ser adquiridos para que las empresas mantengas un programa interno de capacitaciones.

8.1 Limitaciones

El presente trabajo se realizó con la finalidad de estudiar cómo se genera una mayor eficiencia dentro del laboratorio de biología molecular al ampliar la capacidad de procesamiento del laboratorio y disminuir los tiempos de procesamiento aplicado a trabajos basados en ADN como material genético. Si bien el uso del equipo fue ampliado para el procesamiento y análisis de muestras de ADN y ARN. No se ha hecho un seguimiento sobre cambios en protocolos y procesos para muestras de ARN. A pesar de esto, se espera que los procesos automatizados sigan presentando un mejor desempeño que los procesos manuales.

Los datos de tiempos de extracción de ADN y PCR manual son datos estimados basados en el trabajo de rutina y no fueron rigurosamente medidos. Si bien el trabajo de rutina puede ser similar día a día, estamos considerando tiempo basados en estimaciones; por lo que consideramos estas estimaciones suficientemente confiables para hacer el análisis presentado en este trabajo.

Adicionalmente, este trabajo no enfoca la parte de gastos monetarios de operaciones por la compra de reactivos para los procesos de extracción y PCR; sin embargo, se puede asumir que la diferencia de gastos ha sido considerable dado que la tecnología sigue en avance constante. Adicionalmente, el novedoso sistema que usa el Intelliquibe que requiere únicamente 0.8 μ L de reactivo para realizar cualquier

tipo de PCR implica una disminución considerable en el uso de reactivos que podría contribuir a una mayor rentabilidad al generar un menor precio por reacción.

Este trabajo no se enfoca en el análisis de los componentes moleculares de los procesos como la cantidad de material genético recuperado en la extracción, la sensibilidad y la precisión de la reacción de PCR, los pares de cebadores y las sondas utilizadas, el equipamiento del laboratorio, entre otros. Consideramos ese tipo de información como parte de la propiedad intelectual de la empresa Marinasol SA. Por lo que el enfoque general no apunta a un análisis científico, sino al estudio de un caso de éxito en el cual los avances en automatización en biotecnología pueden ayudar a aumentar la eficiencia de procesos de un laboratorio.

9. Conclusiones

- La automatización del proceso de extracción de ácidos nucleicos y PCR ha permitido mejorar de manera positiva la eficiencia de procesamiento del laboratorio, permitiendo manejar 768 muestras en una menor cantidad de tiempo.
- Bajo las condiciones actuales de equipamiento y personal, el laboratorio puede utilizar el procesamiento de muestras de manera manual o automatizada, dependiendo de la carga laboral, para maximizar la eficiencia en tiempo y número de muestras por procesar. Se ha establecido como punto de corte 384 muestras.
- Hubo una aceptación del proceso de capacitación del personal profesional para una mejor adaptación a las nuevas tecnologías y asegurar el correcto uso de los recursos tecnológicos para el beneficio de la empresa.

10. Recomendaciones

- Se recomienda un programa de capacitación y actualización constante para asegurar el uso correcto del equipo por el personal antiguo y, sobre todo, por el personal nuevo que pueda incorporarse al laboratorio en un futuro.
- Se recomienda el procesamiento automatizado de extracción de ADN ante cualquier demanda de procesamiento; sin embargo, el procesamiento es más eficiente a partir de 288 muestras.
- Se recomienda el procesamiento automatizado de PCR ante cualquier demanda de procesamiento; sin embargo, el procesamiento es más eficiente a partir de 384 muestras.

11. Referencias Bibliográficas:

1. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2009;2009. Disponible en: [/pmc/articles/PMC2789530/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21476197/)
2. Wang TY, Wang L, Zhang JH, Dong WH. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genet Mol Res* [Internet]. 2011;10(1):519-25. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21476197/>
3. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. enero de 2009;67(1):6-20. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19120456/>
4. Miao G, Zhang L, Zhang J, Ge S, Xia N, Qian S, et al. Free convective PCR: From principal study to commercial applications—A critical review. *Anal Chim Acta*. 29 de abril de 2020; 1108:177-97.
5. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 15 de enero de 2015; 439:231-50.
6. Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, et al. SYBR Green I: Fluorescence properties and interaction with DNA. *J Fluoresc* [Internet]. 26 de julio de 2012; 22(4):1189-99. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10895-012-1059-8>
7. Mackay J, Landt O. Real-time PCR fluorescent chemistries. *Methods Mol Biol* [Internet]. 11 de enero de 2007; 353:237-61. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17332645/>
8. Ma H, Bell KN, Loker RN. qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Mol Ther Methods Clin Dev* [Internet]. 12 de marzo de 2020; 20:152-68. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33473355/>
9. Tegally H, San JE, Giandhari J, de Oliveira T. Unlocking the efficiency of genomics laboratories with robotic liquid-handling. *BMC Genomics* [Internet]. 1 de diciembre de 2020;21(1). Disponible en: [/pmc/articles/PMC7576741/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33473355/)
10. Lightner D. Programa de información de especies acuáticas *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) [Internet]. Estados Unidos. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/255194910/FAO-Fisheries-Aquaculture-Programa-de-informaci00F3n-de-especies-acuu00E1ticas-Penaeus-vannamei-Boone-1931-pdf>
11. Gainza O, Ramírez C, Ramos AS, Romero J. Intestinal Microbiota of White Shrimp *Penaeus vannamei* Under Intensive Cultivation Conditions in Ecuador. *Microb Ecol* [Internet]. 1 de abril de 2018;75(3):562-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28929202/>

12. Acceso en línea al Manual Acuático - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal [Internet]. Disponible en: <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-acuatico/>
13. Pedrazzani AS, Cozer N, Quintiliano MH, Tavares CP dos S, da Silva U de AT, Ostrensky A. Non-Invasive Methods for Assessing the Welfare of Farmed White-Leg Shrimp (*Penaeus vannamei*). *Animals (Basel)*. 1 de marzo de 2023;13(5). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36899664/>
14. Langostinera Peruana Dirección postal A, El Rocío C. Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. *Avances en Nutrición Acuicola* [Internet]. 12 de noviembre de 2019;0(0). Disponible en: <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/268>
15. Yasin A, Begum K, Eshik ME, Punom NJ, Ahmmed S, Rahman MS. Molecular identification, and antibiotic resistance patterns of diverse bacteria associated with shrimp PL nurseries of Bangladesh: suspecting *Acinetobacter venetianus* as future threat. *PeerJ* [Internet]. 21 de febrero de 2022;10. Disponible en: [/pmc/articles/PMC8868018/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36899664/)
16. Thornber K, Verner-Jeffreys D, Hinchliffe S, Rahman MM, Bass D, Tyler CR. Evaluating antimicrobial resistance in the global shrimp industry. *Rev Aquac* [Internet]. 1 de mayo de 2020;12(2):966-86. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32612676/>
17. Croxatto A, Prod'hom G, Faverjon F, Rochais Y, Greub G. Laboratory automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 1 de marzo de 2016;22(3):217-35. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26806135/>
18. Nylund L, Heilig HGJ, Salminen S, de Vos WM, Satokari R. Semi-automated extraction of microbial DNA from feces for qPCR and phylogenetic microarray analysis. *J Microbiol Methods*. noviembre de 2010;83(2):231-5.
19. Guan XL, Chang DPS, Mok ZX, Lee B. Assessing variations in manual pipetting: An under-investigated requirement of good laboratory practice. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab* [Internet]. 1 de noviembre de 2023 ;30:25. Disponible en: [/pmc/articles/PMC10569977/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/42888888/)
20. Furrows SJ, Ridgway GL. «Good laboratory practice» in diagnostic laboratories using nucleic acid amplification methods. Vol. 7, *Clinical Microbiology and Infection*. Blackwell Publishing Ltd.; 2001. p. 227-9.
21. oKtopure bead-based automated DNA extraction system | LGC Biosearch Technologies [Internet]. Disponible en: <https://www.biosearchtech.com/products/nucleic-acid-sample-preparation/dna-extraction-systems/oktopure-bead-based-automated-dna-extraction-system>
22. IntelliQube automated PCR instrument | LGC Biosearch Technologies [Internet]. . Disponible en: <https://www.biosearchtech.com/products/pcr-reagents-kits-and->

instruments/pcr-instruments-and-software/array-tape-ultra-high-throughput-platform/intelliquibe

23. sbeadex nucleic acid purification technology | LGC Biosearch Technologies [Internet]. Disponible en: <https://www.biosearchtech.com/products/nucleic-acid-sample-preparation/nucleic-acid-extraction-and-purification-reagents/nucleic-acid-purification-kits/sbeadex-kits>
24. Universidad Nacional de Tumbes | Rumbo a la Acreditación [Internet]. Disponible en: <https://www.untumbes.edu.pe/paginas/carreras.html>
25. Universidad Nacional de Tumbes - Rumbo a la acreditacion [Internet]. Disponible en: <https://www.untumbes.edu.pe/paginas/v2.0/maestria-en-biotecnologia-molecular.php>
26. Incabiotec Especialistas en Biotecnología - Investigación en Genética, Patología y Microbiología [Internet]. Disponible en: <https://www.incabiotec.com/>

12. ANEXOS

Anexo 1 – Datos

		Datos			
Extracción	AUTOMAT		MANUAL		
	#Muestras	Tiempo	#Muestras	Tiempo	
	1	54	1	35	
	96	54	96	95	
	192	78	192	155	
	288	94	288	215	
	384	118	384	275	
	480	140	480	355	
	576	168	576	435	
	672	190	672	515	
	768	220	768	595	

PCR	AUTOMAT		MANUAL	
	#Muestras	Tiempo	#Muestras	Tiempo
	1	85	1	115
	96	85	96	115
	192	90	192	130
	288	95	288	145
	384	100	384	160
	480	105	480	340
	576	110	576	370
	672	115	672	400
	768	120	768	440

EFICIENCIA		AUTOMATIZADO	MANUAL
Extracción		0.02	0.03
		1.78	1.01
		2.46	1.24
		3.06	1.34
		3.25	1.40
		3.43	1.35
		3.43	1.32
		3.54	1.30
		3.49	1.29

EFICIENCIA		AUTOMATIZADO	MANUAL
PCR		0.012	0.009
		1.13	0.83
		2.13	1.48
		3.03	1.99
		3.84	2.40
		4.57	1.41
		5.24	1.56
		5.84	1.68
		6.40	1.75

Anexo 2 – Pruebas estadísticas

Normalidad

Shapiro-Wilk Test

	<i>#Muestras</i>	<i>Tiempo</i>	<i>#Muestras</i>	<i>Tiempo</i>
W-stat	0.97208	0.94024	0.97208	0.96717
p-value	0.91188	0.58447	0.91188	0.86951
alpha	0.05	0.05	0.05	0.05
normal	yes	yes	yes	yes

Shapiro-Wilk Test

	#Muestras	Tiempo	#Muestras	Tiempo
W-stat	0.97486	0.97486	0.97486	0.83562
p-value	0.93317	0.93317	0.93317	0.06789
alpha	0.05	0.05	0.05	0.05
normal	yes	yes	yes	yes

Anexo 3 – pruebas T (extracción)

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY									
				Alpha	0.05	Hyp Mean Di		0	
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	2	0.895	1.23743687						
Group 2	2	0.52	0.69296465						
Difference	2	0.375	0.54447222	0.385	0.97402597	1	0.68874037	0.697742347	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.25418805	6.31375151			no				
Two Tail	0.50837609	12.7062047	-4.51688882	5.26688882	no				

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY									
				Alpha	0.05	Hyp Mean Di		0	
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	2	2.12	0.48899154						
Group 2	2	1.1250	0.1626						
Difference	2	0.99	0.32635698	0.23076923	4.29333333	1	3.03584511	0.97393038	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.07284178	6.31375151			no				
Two Tail	0.14568356	12.7062047	-1.94143186	3.92297032	no				

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY									
				Alpha	0.05	Hyp Mean Di		0	
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	3	2.4318	0.6474						
Group 2	3	1.20	0.16921387						
Difference	3	1.2351	0.48205847	0.27831658	4.43783381	2	2.56218454	0.95279073	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.02360463	2.91998558			yes				
Two Tail	0.04720927	4.30265273	0.03762314	2.43262236	yes				

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY									
				Alpha	0.05	Hyp Mean Di		0	
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	4	2.64	0.66973643						
Group 2	4	1.25	0.17153717						
Difference	4	1.39	0.50074539	0.2503727	5.55132972	3	2.77566486	0.95461401	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.01	2.35			yes				
Two Tail	0.01152757	3.18244631	0.59310373	2.18669904	yes				

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY		Alpha			0.05		Hyp Mean Di		0
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	5	2.80	0.67941163						
Group 2	5	1.27	0.15546704						
Difference	5	1.53	0.53189543	0.23787087	6.42212061	4	2.87205965	0.9547721	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.00151104	2.13184679			yes				
Two Tail	0.00302209	2.77644511	0.86719999	2.1880708	yes				

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY		Alpha			0.05		Hyp Mean Di		0
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	6	2.90	0.66033941						
Group 2	6	1.28	0.14066509						
Difference	6	1.62	0.53158064	0.21701689	7.48539935	5	3.05590149	0.95816214	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.00033616	2.01504837			yes				
Two Tail	0.00067232	2.57058184	1.0665984	2.18231773	yes				

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY		Alpha			0.05		Hyp Mean Di		0
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	7	2.99	0.64892777						
Group 2	7	1.28	0.12871156						
Difference	7	1.71	0.53763845	0.20320823	8.42456757	6	3.18418724	0.960234832	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	7.6274E-05	1.94318028			yes				
Two Tail	0.00015255	2.44691185	1.21470886	2.20917414	yes				

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY		Alpha			0.05		Hyp Mean Di		0
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	8	3.05	0.62615505						
Group 2	8	1.28	0.11921619						
Difference	8	1.77	0.52692284	0.18629536	9.51748058	7	3.36493753	0.96346551	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	1.4806E-05	1.89457861			yes				
Two Tail	2.9612E-05	2.36462425	1.33254393	2.21358097	yes				

Anexo 4 – pruebas T (PCR)

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY		Alpha			0.05		Hyp Mean Di		0
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	2	0.571	0.79054538						
Group 2	2	0.4195	0.58053467						
Difference	2	0.1515	0.21001071	0.1485	1.02020202	1	0.72139177	0.71414214	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.24681701	6.3137515			no				
Two Tail	0.49363401	12.706205	-1.7353714	2.0383714	no				

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY		Alpha			0.05		Hyp Mean Di		0
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	3	1.09	1.0595477						
Group 2	3	0.77	0.73715466						
Difference	3	0.32	0.3238616	0.18698158	1.69891958	2	0.98087168	0.76856663	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.11571668	2.91998558			no				
Two Tail	0.23143337	4.30265273	-0.48685014	1.12218347	no				

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY		Alpha			0.05		Hyp Mean Di		0
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	4	1.58	1.29949259						
Group 2	4	1.08	0.85588371						
Difference	4	0.50	0.44762214	0.22381107	2.22620801	3	1.113104	0.78925673	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.05619603	2.35336343			no				
Two Tail	0.11239206	3.18244631	-0.21401672	1.21051672	no				

T Test: Two Paired Samples									T Test: Two Pai
SUMMARY		Alpha			0.05		Hyp Mean Di		0
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	5	2.0284	1.51396922						
Group 2	5	1.3418	0.94833338						
Difference	5	0.6866	0.57240964	0.25598937	2.68214257	4	1.19949062	0.80166213	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.02755288	2.1318468			yes				
Two Tail	0.05510577	2.7764451	-0.02414045	1.39734045	no				

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY		Alpha			0.05		Hyp Mean Di		0
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	6	2.452	1.70596131						
Group 2	6	1.35316667	0.848672						
Difference	6	1.09883333	1.13213964	0.46219407	2.37742844	5	0.9705811	0.72843112	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.03168326	2.01504837			yes				
Two Tail	0.06336652	2.57058184	-0.08927436	2.28694102	no				

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY		Alpha			0.05		Hyp Mean Di		0
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	7	2.85028571	1.88033877						
Group 2	7	1.38271429	0.77866225						
Difference	7	1.46757143	1.42122879	0.53717399	2.73202249	6	1.03260744	0.74455721	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.01704721	1.94318028			yes				
Two Tail	0.03409442	2.44691185	0.15315402	2.78198884	yes				

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY		Alpha			0.05		Hyp Mean Di		0
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	8	3.224	2.03663364						
Group 2	8	1.419875	0.72852305						
Difference	8	1.804125	1.62403259	0.57418223	3.1420774	7	1.11089212	0.76493622	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.00816586	1.8945786			yes				
Two Tail	0.01633173	2.3646243	0.44639978	3.16185022	yes				

T Test: Two Paired Samples									
SUMMARY		Alpha			0.05		Hyp Mean Di		0
Groups	Count	Mean	Std Dev	Std Err	t	df	Cohen d	Effect r	
Group 1	9	3.57688889	2.17948781						
Group 2	9	1.45655556	0.69029833						
Difference	9	2.12033333	1.7910014	0.59700047	3.55164436	8	1.18388145	0.78225161	
T TEST									
	p-value	t-crit	lower	upper	sig				
One Tail	0.00374572	1.85954804			yes				
Two Tail	0.00749145	2.30600414	0.74364779	3.49701888	yes				