



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Diseño, desarrollo y evaluación de un sistema de
RT-PCR múltiple para el diagnóstico de enfermedades
respiratorias de origen viral.

Tesis que presenta el
I.B.T. ERICK CONCHUCOS ORTIZ

para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

en la especialidad de
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de Tesis
DR. JOSÉ ISABEL TAPIA RAMÍREZ

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular, así como en el Laboratorio de Bioseguridad para el Diagnóstico e Investigación de Enfermedades Emergentes, en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. José Tapia Ramírez y con la asesoría del Dr. José Efraín Garrido Guerrero, del Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe y de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano.

Durante la realización del presente trabajo el autor contó con el apoyo de la beca con número de apoyo 368571 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

RESUMEN

Este trabajo presenta el desarrollo de un sistema de RT-PCR múltiple para la detección en muestras clínicas de 14 virus respiratorios de alta prevalencia, los cuales son: virus respiratorio sincitial A y B; metapneumovirus humano; virus de parainfluenza 1, 2, 3 y 4; rinovirus; coronavirus OC43, 229E, NL63 y HKU1; adenovirus; y bocavirus .

La primera etapa consistió en diseñar iniciadores y sondas de hidrólisis (TaqMan®) que permitieran llevar a cabo reacciones de PCR múltiples en tiempo real, empleando para ello diversas herramientas para analizar secuencias y oligonucleótidos. De este modo se obtuvieron: 12 pares de iniciadores, con sus respectivas sondas para los virus respiratorios con genoma de RNA; y 2 pares de iniciadores para los virus respiratorios con genoma de DNA.

Los 14 pares de iniciadores se agruparon en cuatro sets: 4plex-A, 4plex-B, 4plex-C y 2plex-D; los primeros tres sets compuestos por 4 pares de iniciadores para los virus de RNA cada uno; y el cuarto set compuesto de 2 pares de iniciadores para virus de DNA. Estos cuatro sets fueron empleados en reacciones de PCR múltiple en punto final para amplificar moldes sintéticos de los virus que los componen, logrando amplificar por separado cada uno de los 14 moldes sintéticos, además de amplificar simultáneamente 2 moldes sintéticos con el set 2plex-D.

Las concentraciones de los iniciadores y las sondas de los sets 4plex-A, 4plex-B y 4plex-C fueron optimizadas para obtener la máxima señal de fluorescencia en reacciones de PCR múltiple en tiempo real, con las cuales se amplificaron los cuatro moldes sintéticos de los virus que componen cada set, por separado y de manera simultánea. Se realizaron curvas de cuantificación con moldes sintéticos de cada uno de los 12 virus de RNA, estas curvas tuvieron un rango dinámico lineal para cuantificar desde 10^2 hasta 10^7 moléculas/reacción, con eficiencias de PCR entre 90 y 110 %; valores que se consideran aceptables para ensayos de cuantificación. Los moldes sintéticos del set 2plex-D se amplificaron y se analizaron las curvas de disociación, en donde se detectaron los amplicones de AdV y BoV de manera simultánea; estos amplicones se diferenciaron con base en su temperatura de disociación (~ 85 y ~ 80 °C respectivamente).

Los sets de este sistema de detección se ensayaron con muestras clínicas, y se obtuvieron resultados positivos para algunos virus respiratorios, lo que demuestra la capacidad de este sistema para la detección de virus respiratorios en muestras clínicas.

ABSTRACT

This work presents the development of a multiplex RT-PCR system for detection of 14 high-prevalence respiratory viruses in clinical samples, these viruses are: respiratory syncytial virus A and B; metapneumovirus; parainfluenzavirus 1, 2, 3 and 4; rhinovirus; coronavirus OC43, 229E, NL63 and HKU1; adenovirus; and bocavirus.

The first stage was the design of primers and hydrolysis probes (TaqMan[®]), which allow performing of multiplex real time RT-PCR assays, by using various tools for analysis of sequences and oligonucleotides. In this way were obtained: 12 pairs of primers, and their respective probes for respiratory viruses with RNA genome; and 2 pairs of primers for respiratory viruses with DNA genome.

The 14 pairs of primers were sorted in four sets: 4plex-A, 4plex-B, 4plex-C and 2plex-D; first three sets were composed of 4 pairs of primers for RNA viruses in each set, and the fourth set was composed of 2 pairs of primers for DNA viruses. These four sets were used in multiplex end-point PCR assays in order to amplify synthetic templates of those viruses that compound each set, achieving amplification of each one of the 14 synthetic templates separately, and in addition the simultaneous amplification of 2 synthetic templates with 2plex-D set.

Concentrations of primers and probes from sets 4plex-A, 4plex-B and 4plex-C, were optimized in order to reach the maximum fluorescence signal in multiplex real time PCR assays, which were used to amplify the four synthetic templates of viruses from each set separately and simultaneously. Quantification curves were produced using synthetic templates from each of 12 RNA viruses, these curves had a linear dynamic range for quantify from 10^2 to 10^7 molecules/reaction, with PCR efficiency values between 90 and 110 %; all these values are considered acceptable for quantification assays. Synthetic templates corresponding to set 2plex-D were amplified and dissociation curves were analyzed, in these curves amplicons were detected from AdV and BoV simultaneously, and these amplicons were differentiated based on their melting point (~ 85 y ~ 80 °C respectively).

The sets of this detection system were tested against clinical samples, and positive results were obtained for some respiratory viruses, these results show the system ability for detection of respiratory viruses in clinical samples.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Infecciones respiratorias agudas	4
1.2 Etiología de las infecciones respiratorias.....	5
1.3 Virus respiratorios.	6
1.3.1 Influenza	7
1.3.2 Parainfluenza	7
1.3.3 Virus Sincitial Respiratorio.....	8
1.3.4 Metapneumovirus humano.....	8
1.3.5 Rinovirus	8
1.3.6 Coronavirus	9
1.3.7 Adenovirus.....	9
1.3.8 Bocavirus	10
1.3.9 Otros Virus.....	10
1.4 Métodos convencionales para detección de virus respiratorios	11
1.4.1 Pruebas rápidas de antígenos (no-fluorescentes).....	12
1.4.2 Pruebas rápidas de antígenos basadas en inmunofluorescencia	12
1.4.3 Aislamiento viral en cultivo celular.....	13
1.4.4 Aislamiento viral en cultivo rápido (<i>Shell vial</i>).....	14
1.5 Métodos moleculares para detección de virus respiratorios.	15
1.5.1 Amplificación isotérmica mediada por bucles.....	15
1.5.2 PCR	15
1.5.3 PCR en tiempo real	16
1.5.4 PCR múltiple	18
1.5.5 Microarreglos	18
1.6 Métodos biofísicos para detección de virus.	19
1.6.1 Espectroscopía de masas.....	19
1.6.2 Inmuno-PCR asistida por nanopartículas.....	20
1.6.3 Seguimiento de RNA en células vivas	20
1.6.4 Puntos cuánticos	21
1.6.5 Microarreglos asistidos por nanopartículas	21
1.6.6 Espectroscopía Raman de superficie mejorada.....	21
1.7 Relevancia de la detección de virus respiratorios por PCR múltiple.....	24
2. ANTECEDENTES	26
3. JUSTIFICACIÓN	27
4.1 Objetivo general	28

4.1 Objetivos particulares.....	28
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1 Diseño de iniciadores y sondas para RT-PCR múltiple	31
6.2 Oligonucleótidos	33
6.3 Muestras clínicas	33
6.4 Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos	33
6.5 PCR/RT-PCR punto final	34
6.6 Electroforesis en geles de agarosa y acrilamida	35
6.7 Purificación de productos de PCR.....	35
6.8 PCR/RT-PCR múltiple en tiempo real.....	36
6.9 Cuantificación de moléculas en PCR tiempo real	37
7. RESULTADOS	38
7.1 Obtención de juegos de iniciadores y sondas.....	38
7.2 Gradientes de temperatura y síntesis de moldes de tamaño completo.....	39
7.3 Amplificación de moldes sintéticos con juegos múltiples de iniciadores	41
7.4 Detección de moldes sintéticos por PCR múltiple en tiempo real.....	42
7.5 Detección viral en muestras clínicas por RT-PCR múltiple en tiempo real	46
8. DISCUSIÓN	48
9. CONCLUSIONES	57
10. PERSPECTIVAS	58
11. BIBLIOGRAFÍA	59
12. ANEXOS.....	68
12.1 Número de acceso de las secuencias virales empleadas	68
12.2 Secuencias de moldes sintéticos.....	71
12.3 Gradientes de temperatura	72
12.4 Curvas de cuantificación	73

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones respiratorias agudas

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) constituyen un grupo complejo y heterogéneo de enfermedades ocasionadas por un gran número de agentes causales, que afectan alguna sección de las vías respiratorias. Las IRA representan la principal causa de morbilidad en el mundo y la causa más frecuente de uso de los servicios de salud en todos los países. En México constituyen un problema de salud prioritario por su continua presencia entre las diez principales causas de enfermedades transmisibles en la población en general (**figura 1**)^[1,2].

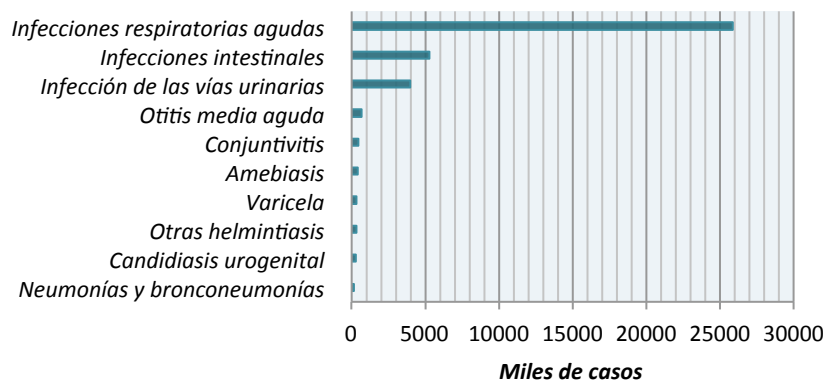


Figura 1. Diez principales causas de enfermedades transmisibles en México durante 2011.
Fuente: Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología.^[2]

Las IRA se pueden clasificar por la sección del tracto respiratorio en el que se presentan, ya sea el superior o el inferior. Las infecciones del tracto respiratorio superior (ITRS) ocasionan rinitis, faringitis y laringitis, este tipo de infecciones se encuentran entre las infecciones más comunes en niños, que se producen de tres a ocho veces al año con una incidencia que varía inversamente con la edad, siendo los niños pequeños quienes tienen la frecuencia más alta. Las ITRS pueden provocar exacerbaciones agudas de asma, otitis media aguda y pueden generar infecciones del tracto respiratorio inferior (ITRI), que dan lugar a bronquitis, bronquiolitis y neumonía^[3,4].

Las ITRI son menos frecuentes que las ITRS, pero entre el 1 y el 13 % de los pacientes con ITRI son hospitalizados, lo que conlleva una importante repercusión socio-económica. En 2002 las ITRI ocasionaron aproximadamente 4 millones de muertes en todo el mundo, cantidad que representa el 7% de los decesos ocurridos en ese año^[5,6].

1.2 Etiología de las infecciones respiratorias

Las IRA son causadas por una diversa variedad de virus y bacterias, sin embargo alrededor del 80 % de los agentes que ocasionan estas infecciones son de origen viral [7]. Una de las principales dificultades del diagnóstico clínico de las IRA es que no permite discriminar el agente causante, ya que estas infecciones se presentan con síntomas y signos similares, de modo que es sumamente difícil diferenciar la severidad de las IRA sin un diagnóstico de laboratorio [5,8].

La severidad de las IRA de origen viral se incrementa en infantes, adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos, principalmente por el estado del sistema inmune. En los individuos de edad avanzada las infecciones pueden presentarse con síntomas atípicos (por ejemplo, confusión, anorexia, mareos y caídas), de modo que los pacientes pueden carecer de fiebre y otros síntomas clásicos de la infección viral como dolor de garganta o mialgias, además de que pueden sufrir exacerbaciones de enfermedades cardiopulmonares crónicas subyacentes [9].

En cuanto a los pacientes de temprana edad la frecuencia de IRA de origen viral es la más alta, ya que pueden presentarse de 6 a 9 infecciones por año (**figura 2**) en comparación con los adultos donde las IRA se presentan de 2 a 4 veces por año [5]. Por otra parte estudios en animales indican que las infecciones virales pueden ser un importante estímulo ambiental para la lesión y remodelación de las vías respiratorias, lo que resulta en el deterioro de la función pulmonar y potencialmente en el desarrollo de asma [11]. La situación en infantes se torna más compleja debido a la frecuente tasa de coinfección por más de un agente viral, fenómeno que puede desencadenar cuadros clínicos severos. Se ha reportado que la coinfección por virus ocurre en hasta el 43% de los niños con IRA, mientras que la coinfección por virus y bacterias se produce en hasta el 66% de los niños con neumonía [12-14].

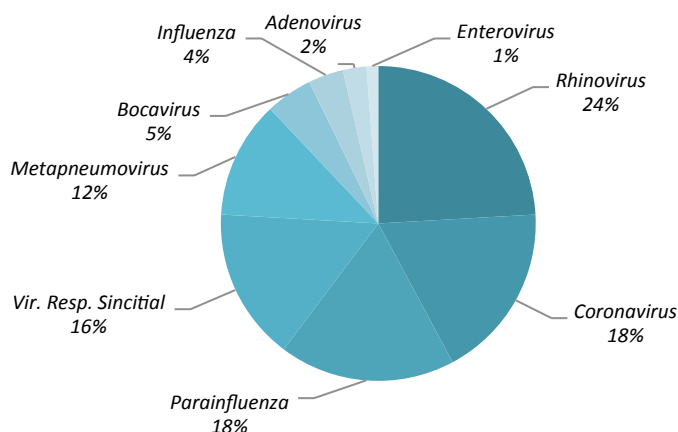


Figura 2. Etiología de infecciones respiratorias virales en lactantes. Un estudio dio seguimiento a las infecciones virales que se presentaron durante el primer año de vida de 197 neonatos, de los cuales 122 desarrollaron algún padecimiento respiratorio asociado a infecciones virales durante ese periodo en 2 hospitales maternos de la región de Berna en Suiza [10].

La transmisión de virus respiratorios se produce por contacto directo con secreciones contaminadas, las cuales al estar en forma de aerosol pueden entrar en contacto con los epitelios nasales y conjuntivales. Este modo de transmisión es un parámetro importante en el control de brotes para una gran variedad de escenarios, que van desde las estancias para los niños, casas de retiro para los ancianos, y hospitales o centros de salud ^[15].

1.3 Virus respiratorios.

Los principales agentes virales conocidos que causan causas IRA en niños y adultos son los virus de la influenza tipo A, B y C; virus de parainfluenza (PIV) tipos 1, 2 y 3; virus sincitial respiratorio (RSV); adenovirus (AdV); y rinovirus (HRV). Otros virus como el coronavirus (CoV), bocavirus (BoV), enterovirus, parainfluenza tipo 4, los poliomavirus WU / KI, parvovirus 4 y 5, y mimivirus también infectan las vías respiratorias, aunque a una frecuencia mucho más baja. Desde el año 2000 han surgido varios virus respiratorios, incluyendo nuevos virus de la gripe aviar (H5N1, H7N7 y H7N3), metapneumovirus humano (hMPV), MERS-CoV, SARS-CoV y CoV NL63 y HKU1. La importancia clínica de estos virus recién descubiertos se encuentra aún bajo investigación, así mismo los resultados de las investigaciones en los virus ya conocidos han cambiado por ejemplo la idea general de que los HRV y CoV, que hasta hace poco se creía que sólo pueden causar un resfriado común, pueden ser causa de IRA y en algunos casos pueden llegar a ser fatales ^[15,16].

Tabla 1. Prevalencia de virus respiratorios en IRA de acuerdo a distintos estudios realizados en diversos países ^[15].

Virus	Prevalencia (%)	Número de estudios	Países Incluidos
Influenza	6 – 40	7	5
PIV	15 – 30	4	4
RSV	10 – 30	4	4
AdV	2 – 4	4	4
hMPV	1 – 30	18	10
CoV COC43	5 – 30	5	4
CoV 229E	1 – 5	3	3
CoV CNL63	1 – 9	12	9
CoV HKU1	1 – 11	9	8
Bocavirus	2.1 – 11.3	14	12
Rinovirus	12 – 45	6	5
Polyomavirus WU/KI	1 – 5	3	3
Parvovirus 4/5	Desconocido	2	2

Nuestra comprensión de la epidemiología de las infecciones por virus respiratorios está cambiando con el descubrimiento de nuevos virus y la utilización de pruebas moleculares más sensibles; La **Tabla 1** resume las prevalencias de infección para los virus respiratorios más identificados, obtenidas a partir de diversos estudios realizados en todo el mundo ^[15]. En seguida se enlistan brevemente las características más importantes de los principales virus respiratorios.

1.3.1 Influenza

Los virus de influenza A, B y C son virus envueltos con genoma segmentado de RNA de cadena negativa, y pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Influenza A se divide en subtipos de acuerdo a los genes que portan de las glicoproteínas de la envoltura hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N). Hay 16 subtipos de H y 9 subtipos de N conocidos en aves, pero solo 3 H y 2 N en humanos. Los virus de la gripe humana estacional incluyen tres subtipos: H1N1, H2N2 y H3N2; los cuales han emergido durante los últimos 100 años. Los virus de influenza A y B causan epidemias anuales en los climas templados y el período de epidemia es generalmente de 3 a 8 semanas. Una nueva variante H1N1 transferida de los cerdos a los humanos fue la responsable de un brote pandémico ocurrido en México durante el año 2009 ^[17,18]

1.3.2 Parainfluenza

Los virus de parainfluenza (PIV) pertenecen a la familia *Paramyxoviridae*, que comprende virus pleomorficos de 125-250 nm, envueltos con genoma de RNA de cadena negativa. Los PIV comprenden cuatro diferentes serotipos/genotipos que presentan diferentes aspectos clínicos ^[19,20]. Por una parte, PIV1 y PIV2 son las principales causas de crup (laringotraqueobronquitis) en los niños pequeños, pero también pueden causar IRTS en diversos grupos de edad ^[20-22,]. Por otro lado PIV3 está asociado con IRTI severas en los niños, mientras que las infecciones con PIV4 (dividido en los subtipos PIV4a y PIV4b) son menos comunes y con una epidemiología en gran medida desconocida ^[19]. En la familia *Paramyxoviridae* los PIVs forman taxonómicamente dos géneros dentro de la subfamilia *Paramyxovirinae*, que son *Rubulavirus* (PIV2 y PIV4a/PIV4b) y *Respirovirus* (PIV1 y PIV3) ^[20].

1.3.3 Virus Sincitial Respiratorio

El virus sincitial respiratorio (RSV) es un virus envuelto de RNA de cadena negativa que pertenece a la subfamilia *Pneumovirinae*, dentro de la familia *Paramyxoviridae*. RSV es considerado no sólo como la causa más común de la bronquiolitis en los niños, sino también como una causa frecuente de IRTI ^[23,16]. RSV existe como dos subgrupos A y B, anteriormente se creía que el subgrupo A podía dar lugar a síntomas más severos; Sin embargo, esto no se ha confirmado como lo muestran estudios más recientes ^[24-26]. La prevalencia relativa de los subgrupos de RSV A y B cambia de un año a otro y también puede variar de manera geográfica ^[25-27].

1.3.4 Metapneumovirus humano

Metapneumovirus humano (hMPV) fue descubierto en los Países Bajos en 2001, y pertenece a la familia *Paramyxoviridae* que como se ha mencionado anteriormente está comprendida por virus envueltos de RNA de cadena negativa ^[28,29]. hMPV ocasiona tanto ITRS como ITRI, con signos y síntomas similares a los causados por RSV; que van desde rinorrea a tos severa, bronquiolitis y neumonía ^[30]. Los brotes de hMPV ocurren principalmente en los meses de invierno y primavera, aunque en climas templados a menudo se traslapan o siguen al brote de RSV en invierno ^[31-33]. El período de incubación se estima que es de 3-5 días y el período de excreción del virus no se ha determinado, pero pueden ser semanas después de la infección primaria en lactantes ^[34,35]. hMPV es a menudo el segundo o el tercer virus detectado más frecuentemente en los niños hospitalizados con IRA menores de 5 años, la prevalencia ha oscilado entre 3 y 25% (**Tabla 1**). Aunque las infecciones por hMPV son frecuentes en pacientes con exacerbaciones de asma, no está claro qué papel juega hMPV en repercusiones a largo plazo ^[36].

1.3.5 Rinovirus

La familia de virus *Picornaviridae* consta de virus pequeños sin envoltura, de forma icosaédrica y con genoma de una cadena positiva de RNA. De acuerdo con la taxonomía actual, HRV pertenece al género *Enterovirus* como tres especies: HRV A, B y C, cada uno de ellos con numerosas variantes denominado 'serotipos' o 'tipos' ^[37-39]. Los HRV son verdaderos virus respiratorios y muchos estudios sugieren que este agente es la causa más frecuente de los resfriados comunes, pero se sabe que también pueden dar lugar a ITRI así como exacerbaciones del asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica ^[40,41]. HRV es el virus respiratorio más

frecuente en los niños menores de 5 años y la principal causa de hospitalización de los niños menores de 2 años con sibilancias ^[42,43]. Estudios clínicos recientes sugieren que HRV-C se encuentra considerablemente con más frecuencia de lo previsto en los niños hospitalizados ^[44,45]. En contraste con otros virus respiratorios, HRV se encuentra frecuentemente en muestras clínicas durante todo el año en las regiones templadas, aunque con picos ocasionales ^[46].

La mayoría de los métodos moleculares aplicados a la identificación de HRV no permiten la tipificación del virus, esto se debe a que el diseño de un panel para la detección de HRV A, B y C necesitaría tomar en cuenta la enorme cantidad de variaciones en las secuencias de los diversos tipos de HRV ^[46,7].

1.3.6 Coronavirus

Los coronavirus (CoV) son virus envueltos de RNA de cadena negativa con un genoma relativamente grande (~30,000 bases) en comparación con otros virus. Existen cuatro CoV humanos que contribuyen a los brotes estacionales (además de los coronavirus del SARS y MERS que son considerados pandémicos), originalmente divididos en dos grupos de serotipos y un tercer serogrupo que no contiene virus humanos. Los dos primeros serogrupos están conformados por CoV-229E y CoV-NL63 como parte del grupo I y CoV-OC43 y CoV-HKU-1 como parte del grupo II ^[7]. Estos serogrupos se han confirmado filogenéticamente, y recientemente el Grupo de Estudio del Coronavirus del Comité Internacional de Taxonomía de Virus propuso reclasificar los grupos I, II y III de coronavirus como tres géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* y *Gammacoronavirus*, respectivamente ^[47]. Todos los CoV causan principalmente síntomas de ITRS, pero tienen la capacidad de causar ITRI tanto en niños como en adultos ^[48,49]. CoV-NL63 a diferencia de los otros tipos de CoV parece tener una capacidad para inducir el crup en los niños ^[50], así mismo un par de publicaciones muestran que la mayoría de las muestras positivas para HCoV-229E se han obtenido de pacientes inmunocomprometidos ^[51,52].

1.3.7 Adenovirus

Los adenovirus (AdV) son virus de DNA de doble cadena sin envoltura de gran tamaño que pertenecen a la familia *Adenoviridae*, donde todos los AdV humanos pertenecen al género *Mastadenovirus*. Existen más de 50 serotipos de AdV, que pertenecen a alguna de las especies de la A a la F del género *Mastadenovirus*, de los cuales al menos nueve tipos diferentes pueden

infectar el tracto respiratorio, principalmente en los niños ^[7]. Los síntomas de la infección con AdV suelen ser leves, aunque también pueden causar manifestaciones más graves como son el crup, bronquiolitis y neumonía ^[37]. En las regiones templadas la incidencia de infecciones AdV es alta durante todo el año, con un ligero descenso durante los meses de verano ^[53].

La mayoría de los sistemas de diagnóstico molecular para AdV identifican un tipo común y no distinguen entre los diferentes serotipos ^[53,54,55].

1.3.8 Bocavirus

Bocavirus humano (BoV) pertenece a la familia *Parvoviridae* y es un virus pequeño no envuelto de forma icosaédrica con un genoma de DNA de cadena sencilla ^[56]. BoV fue descubierto por Allander *et al.* ^[57] utilizando una estrategia para aislamiento de virus, con base en la reducción de DNA, amplificación de ácidos nucleicos aleatoria, secuenciación a gran escala y análisis bioinformáticos; esta estrategia se aplicó sobre extractos del tracto respiratorio ^[57]. La mayoría de la evidencia acumulada sugiere que la infección por BoV puede ocurrir sin ocasionar síntomas en muchos casos ^[56]. Sin embargo, varios estudios clínicos han reportado una asociación estadística entre la infección por BoV y síntomas respiratorios agudos (tos, sibilancias agudas, neumonía, etc.) de una manera que puede sugerir un papel causal del virus ^[58-60].

1.3.9 Otros Virus

Poliomavirus WU y KI se han descubierto recientemente en muestras provenientes del tracto respiratorio, suero y heces de niños y pacientes inmunocomprometidos. Estos virus han sido identificados por la amplificación de la región 5'-UTR o el gen *VP1* por el grupo de Payungporn *et al.*, donde emplearon primers específicos dirigidos contra la región *VP1* de WU y KI, obteniendo amplificadas de 198 y 231 pb respectivamente, los cuáles pueden ser distinguidos por análisis de curvas de disociación ^[61]. Mueller *et al.* examinaron 229 muestras de niños con infecciones de las vías respiratorias y se detectó KI y WU en una proporción de 0.9 y 0.4%, respectivamente ^[62]. Por su parte Babakir-Mina *et al.* detectaron el virus de WU y KI en las muestras de heces de 13 de un total de 31 pacientes hematológicos, de los cuales 25 habían recibido trasplantes ^[63]. Debido a las frecuentes coinfecciones de poliomavirus con citomegalovirus y adenovirus, no se ha podido establecer una clara correlación entre poliomavirus y síntomas clínicos ^[64].

Parvovirus humano 4 fue identificado por primera vez en 2005 en el plasma de un paciente con síndrome viral agudo. Parvovirus 4 junto con un virus similar, parvovirus 5, se han detectado en suero o plasma del 70% de los pacientes infectados por el VIH, en aproximadamente 4% de las reservas de plasma de fabricación y en el plasma de donantes de sangre sanos ^[65-67]. Dado que la principal vía de transmisión de otros dos parvovirus, parvovirus B19 y BoV, es el tracto respiratorio, cabe la posibilidad de que los parvovirus 4 y 5 sean también patógenos respiratorios, sin embargo esto no ha sido demostrado. Un mayor número de estudios son necesarios para determinar si el parvovirus 4 y 5 son patógenos respiratorios clínicamente importantes para el hombre. Hasta ahora el DNA de Parvovirus 4 y 5 ha sido detectado por amplificación de ácidos nucleicos convencional o anidada dirigida contra el gen *NS-1* ^[66,67].

Tabla 2. Principales virus respiratorios y algunas de sus características.

Virus	Tipo de genoma	Tamaño [bases]	Familia	Subtipos	Periodo de Infección
Influenza	ssRNA (-)	~14,000	Orthomyxoviridae	A, B	7 días
RSV	ssRNA (-)	~15,000	Paramyxoviridae	A, B	3 a 8 días, 3 a 4 semanas en infantes
hMPV	ssRNA (-)	~13,300	Paramyxoviridae	A, B	5 días
PIV	ssRNA (-)	~15,600	Paramyxoviridae	1 al 4	1 a 3 semanas
CoV	ssRNA (+)	~30,000	Coronaviridae	229E, NL63, OC43, HKU-1	10 días
AdV	DNA	~30,000	Adenoviridae	A al F	-
HRV	ssRNA (+)	~7,200	Picornaviridae	A,B,C	7 a 10 días
BoV	ssDNA	~5,200	Parvoviridae	-	-

1.4 Métodos convencionales para detección de virus respiratorios

Los métodos de diagnóstico convencionales para las infecciones por virus respiratorios van desde las pruebas rápidas de antígenos, prueba con anticuerpos inmunofluorescentes (IF), cultivo celular convencional, y cultivo celular rápido. Las muestras analizadas incluyen aspirados nasofaríngeos (Nf), lavados Nf, lavados orofaríngeos (Of) en medio de transporte viral (MTV); o pueden ser muestras líquidas como el esputo, el aspirado de traquea y lavados broncoalveolares. La sensibilidad de detección de virus para cada método puede variar significativamente y depende del tipo de muestra, el tiempo de tomado de la muestra posterior de la aparición de los síntomas, la edad del paciente, el antígeno blanco así como las propiedades del virus ^[68].

1.4.1 Pruebas rápidas de antígenos (no-fluorescentes)

Los métodos sin cultivo más comúnmente utilizados son los ensayos de inmunoadsorción acoplados a enzimas (ELISA) e inmunoensayos ópticos (OEI), así como los sistemas inmunocromatográficos de flujo lateral (ICLF). Estas técnicas proporcionan los resultados más rápidos, generalmente dentro de 15 a 30 min. Son fáciles de usar y se pueden realizar fuera del entorno de laboratorio, en los departamentos de emergencia, clínicas y consultorios médicos. Muchos de estos ensayos contienen un control interno para monitorear los reactivos y el rendimiento técnico ^[68].

Generalmente, ELISA, OIA e ICLF requieren entre 10^5 y 10^6 partículas virales para obtener un resultado positivo. Esto contrasta con el cultivo celular y los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, los cuáles sólo requieren 10 partículas de virus, o de 2 a 5 blancos de RNA o DNA respectivamente para la detección de virus ^[69]. Numerosos estudios han demostrado que la sensibilidad de los ensayos varían significativamente y van desde 44% a 95% para la influenza y 59% a 89% para RSV tomando como referencia los resultados positivos obtenidos mediante cultivo celular ^[70].

1.4.2 Pruebas rápidas de antígenos basadas en inmunofluorescencia

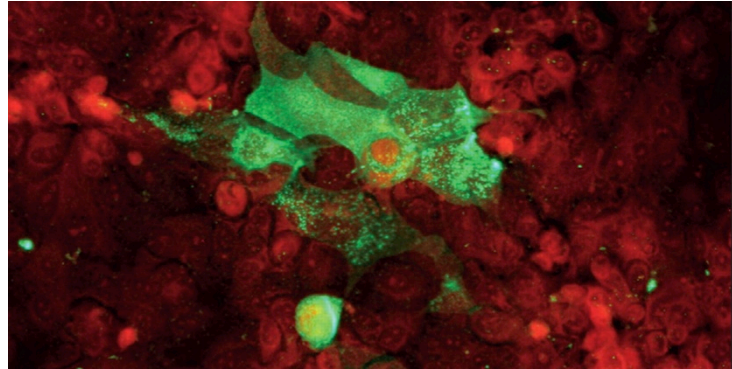
La detección de virus respiratorios por inmunofluorescencia incluye la prueba de anticuerpo fluorescente directa (DFA) y la prueba de anticuerpo inmunofluorescente (IFA). Estas fueron desarrolladas en la década de 1960 y siguen siendo un método valioso, a pesar de sus relativamente extensos requerimientos de infraestructura ^[71]. La tecnología de DFA implica la dispensión de células epiteliales del tracto respiratorio en una placa con pozos, seguida por la incubación con anticuerpos específicos conjugados con una molécula fluorescente. Después del secado y la fijación, un anticuerpo monoclonal conjugado se vierte en los pozos de la placa y se incuba, finalmente se lava antes del examen por microscopía de fluorescencia (**figura 3**). La sensibilidad y especificidad de este método se basan en la presencia de un número adecuado de células infectadas, y pueden variar según el tipo de espécimen ^[72].

La metodología IFA implica un anticuerpo monoclonal para los respectivos virus y un anticuerpo conjugado que detecta una clase de inmunoglobulina como anticuerpo secundario. IFA proporciona una mayor consistencia cuando se realiza para múltiples virus respiratorios, debido a que sólo se utiliza un único anticuerpo conjugado sin importar el número empleado de

anticuerpos monoclonales específicos de virus. IFA por lo general es más sensible que DFA, pero el último es más popular debido a su tiempo de respuesta más corto, pero ambas pruebas permite la detección simultánea de virus respiratorios ^[73].

Figura 3. Prueba directa con anticuerpos fluorescentes.

Tinción fluorescente positiva del virus de la influenza H1N1 2009 a las 24 horas después de la inoculación del virus en cultivo en *shell vial* (R-mix), utilizando el kit de reactivos *D³ Ultra H1N1 influenza A virus ID* (Diagnostic Hybrids, Athens, OH). ^[74]



1.4.3 Aislamiento viral en cultivo celular

Los cultivos de células primarias, diploides, y heteroploides se utilizan en combinación para la detección de los virus respiratorios; los métodos de cultivo convencionales usados para aislar virus respiratorios emplean líneas celulares como: MDCK (de riñón canino), LLC-MK2 (de riñón de mono Rhesus), HEp-2 (de cáncer de laringe), A549 (de carcinoma de pulmón humano), Caco-2 (de adenocarcinoma colorrectal humano), y RD (de rhabdomiosarcoma) ^[70,75].

Las células se cultivan en su mayoría en tubos, el número de estos tubos, así como los tipos de células inoculadas depende del virus o los virus sospechados. Los tubos generalmente se incuban entre 35 y 37 °C durante 7 a 14 días en soportes fijos o giratorios. Las monocapas de células deben ser examinadas diariamente durante la primera semana y cada dos días durante la segunda semana, con el fin de identificar la presencia de un efecto citopático (CPE) (**figura 4**).

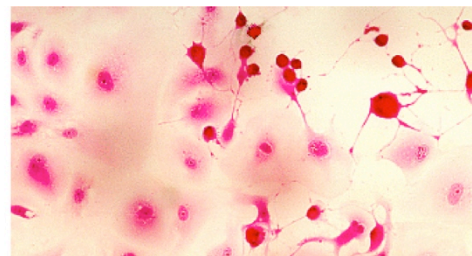
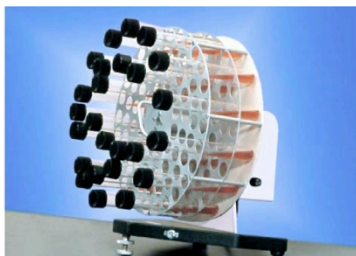


Figura 4. Cultivo celular. Los tubos contienen una monocapa de células vivas, la cuál es infectada por el virus presente en la muestra del paciente. Los tubos se incuban en un bastidor giratorio para asegurar que las células se bañen en el medio de cultivo (izquierda). La monocapa celular se observa periódicamente para detectar el daño que es consistente con la infección viral conocido como efecto citopático (derecha).

El tipo de CPE y el tipo de células en las que se detectó son indicadores de que potencial o potenciales virus se encuentran en la muestra. La identificación del virus específico se consigue con ayuda de ensayos de inmunofluorescencia. El CPE puede ser sutil o ausente en cultivo primario incluso cuando un virus respiratorio está presente, por lo tanto se puede realizar una prueba de hemadsorción (HAD) para detectar virus como influenza o parainfluenza antes de finalizar los resultados del cultivo ^[76].

1.4.4 Aislamiento viral en cultivo rápido (*Shell vial*)

El cultivo en *Shell vial* utiliza líneas celulares individuales o mixtas, y tiene la característica de mejorar la sensibilidad en un menor tiempo de detección comparado con el cultivo tradicional. La mejora de la infectividad viral de las células se logra con ayuda de un paso de centrifugación (**figura 5**). La detección de múltiples virus respiratorios se puede facilitar mediante el uso de monocapas de 2 tipos diferentes de células en un solo vial (por ejemplo, R-Mix) ^[77].

La técnica de cultivo celular rápido con R-Mix emplea monocapas de células patentadas, provenientes de pulmón de mink (Mv1Lu) y células A549 que permiten el crecimiento de los virus respiratorios comunes. Múltiples viales se inoculan, se centrifugan y se incuban a 37 °C con 5% de CO₂. Con la excepción de RSV y AdV, la mayoría de los estudios con R-Mix han demostrado una detección de virus respiratorios comunes igual o mejor comparada con métodos convencionales de cultivo ^[70]. Los principales beneficios del uso del cultivo rápido frente a los métodos de cultivo convencionales son: la mejora significativa en el tiempo de los resultados, 1.4 días frente a 5.2 días, y un rendimiento de 95% de positivos en 48 horas en comparación con 98% de positivos en 6 días para el cultivo convencional ^[78,79].

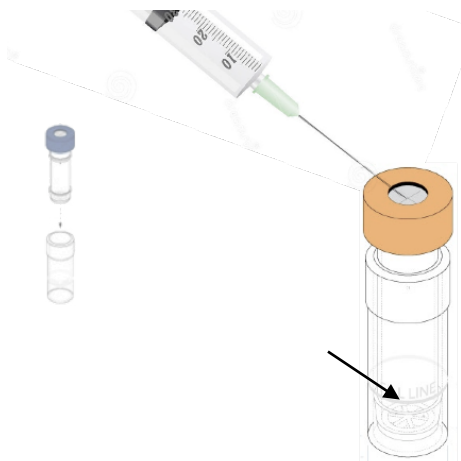


Figura 5. Cultivo celular en *Shell vial*. Es una modificación del cultivo convencional. Se utiliza un tubo pequeño con un cubreobjetos que contiene la monocapa celular. Los viales están disponibles comercialmente, e incluso contienen más de un tipo de células. Cuando se utiliza un cultivo shell vial, la capa de células se inocula primero con el espécimen. A continuación, el tubo se somete a centrifugación, seguido de un tiempo de incubación corto que puede ser 24 horas. La ventaja de este método es que los virus específicos se pueden aislar en un período mucho más corto de tiempo que con el tubo de cultivo tradicional. Una desventaja de estos viales es que generalmente sólo se identifica 1 virus por tubo.

1.5 Métodos moleculares para detección de virus respiratorios.

En la década de 1990 comenzó una nueva era para la identificación viral con el desarrollo de técnicas moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR no sólo revolucionó la sensibilidad de detección de virus conocidos, sino que también permitió el descubrimiento de nuevos virus en el tracto respiratorio. Hoy en día la PCR tiene un amplio uso en virología clínica, y está desplazando a los métodos convencionales, con la excepción de las pruebas de detección rápida de antígenos comerciales para el virus de la influenza y RSV ^[80]. Una técnica para detección de virus relacionada con la PCR es la amplificación isotérmica mediada por bucles, también existen las variantes PCR en tiempo real y PCR múltiple, así como microarreglos dentro de los métodos moleculares.

1.5.1 Amplificación isotérmica mediada por bucles

La amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) es un método de detección de ácidos nucleicos empleado para identificar patógenos bacterianos y virales. Se puede utilizar para identificar virus de RNA con una etapa adicional de síntesis de cDNA y comúnmente conocido como transcripción reversa LAMP (RT-LAMP). La LAMP consiste en pares de primers específicos para el cDNA, que se amplifican por la actividad de desplazamiento de cadena de la DNA polimerasa por autociclado, generalmente a 60 °C. El tiempo de reacción es de 1 a 1.5 horas es suficiente y puede ser controlado midiendo la turbidez en tiempo real, además el producto resultante puede ser visto por electroforesis en gel de agarosa. Aunque este método es rápido y altamente sensible, requiere de un turbidímetro, lo que lo hace ligeramente inconveniente como una técnica de detección rentable ^[81].

1.5.2 PCR

La principal ventaja de la amplificación de material genético viral por PCR es que es altamente analítica, y sensible. Los primeros ensayos de PCR fueron de punto final que permiten la detección del producto al final de la amplificación. Con los virus de RNA debe ser empleada la PCR con transcripción inversa (RT-PCR): la transcriptasa inversa convierte primero el RNA en DNA complementario (cDNA) para que la PCR pueda llevarse a cabo. La especificidad y sensibilidad del ensayo se puede aumentar mediante PCR anidada, en el que dos pares secuenciales de cebadores se utilizan en lugar de uno. El primer par o par exterior par produce un fragmento de DNA, como

en una PCR estándar; en seguida, en una PCR posterior un segundo par de cebadores, llamados cebadores anidados o interiores, se unen en una región dentro del primer producto de PCR (amplicón) para producir un fragmento de DNA más corto. De este modo la PCR anidada es más sensible, pero también más propensa a la contaminación. Los resultados de los ensayos de PCR pueden ser positivos o negativos, pero no cuantitativos ^[80].

1.5.3 PCR en tiempo real

Aunque la RT-PCR es sensible en comparación con los métodos de cultivo, sufre de una menor sensibilidad. Este problema se ha contrarrestado con el desarrollo de métodos basados en PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real es por mucho el método molecular más sensible para la detección y diagnóstico de una amplia gama de patógenos ^[82].

La PCR en tiempo real permite un abordaje cuantitativo de la PCR, en donde además de detectar DNA o RNA específico en una muestra este se puede cuantificar. El dispositivo mide la fluorescencia una vez por ciclo, es decir, los datos se obtienen en tiempo real y las señales fluorescentes emitidas en cada ciclo se correlacionan con la cantidad de producto de PCR producido (**figura 6**). Estas características hacen de la PCR en tiempo real la técnica más adecuada para el diagnóstico de virus respiratorios. ^[80].

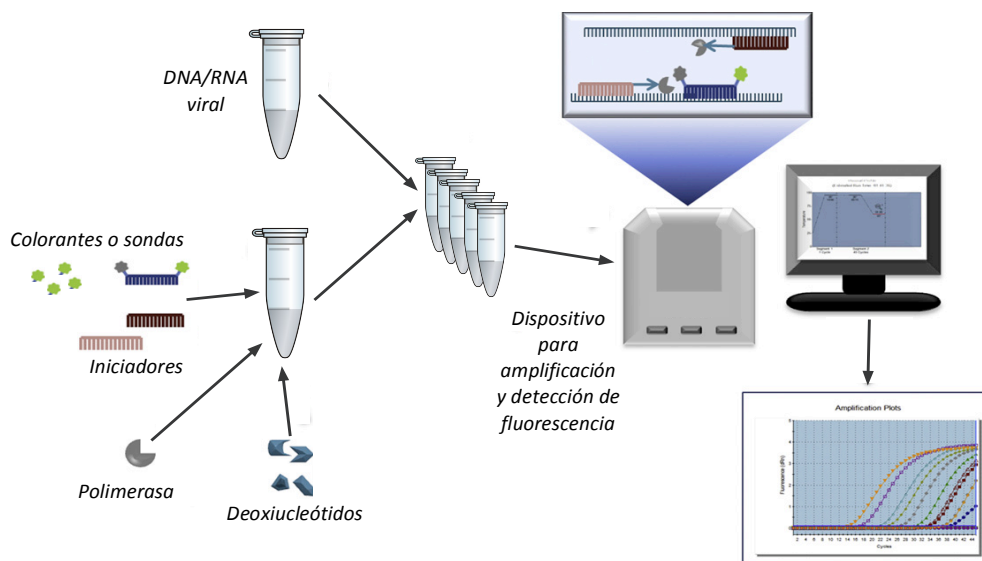


Figura 6. Esquema general del ensayo de PCR en tiempo real para la detección de virus respiratorios. El DNA o RNA proveniente de una muestra se adiciona a una mezcla que contiene los reactivos para la PCR en tiempo real (iniciadores, polimerasa, deoxinucleótidos, sondas o colorantes fluorescentes). La reacción de PCR se lleva a cabo en un equipo termociclador que detecta la fluorescencia en tiempo real. Para el caso de RNA se lleva a cabo un paso previo de RT-PCR Modificado de Jartti *et al.* ^[80].

Existen dos tipos de técnicas para detectar la amplificación de productos con aproximadamente la misma sensibilidad, ambas estrategias emplean el uso de moléculas fluorescentes, y combinan los procesos de amplificación y detección de un blanco específico, lo que permite el seguimiento de las reacciones en tiempo real (**figura 7**). El método más simple implica el uso de colorantes, como SYBR® Green I (SYBR), que emiten fluorescencia cuando se unen específicamente a moléculas de DNA de doble cadena. El segundo método se basa en la complementariedad de sondas de hidrólisis, también conocidas como sondas TaqMan® o doblemente marcadas, las cuáles son oligos marcados con moléculas fluorescentes y represores que bloquean la señal, hasta que se amplifica la secuencia complementaria a estas sondas. Ambos métodos difieren en su especificidad, sin embargo en ciclos avanzados de amplificación ambos pueden mostrar artefactos que no correlacionan con la amplificación del producto ^[83].

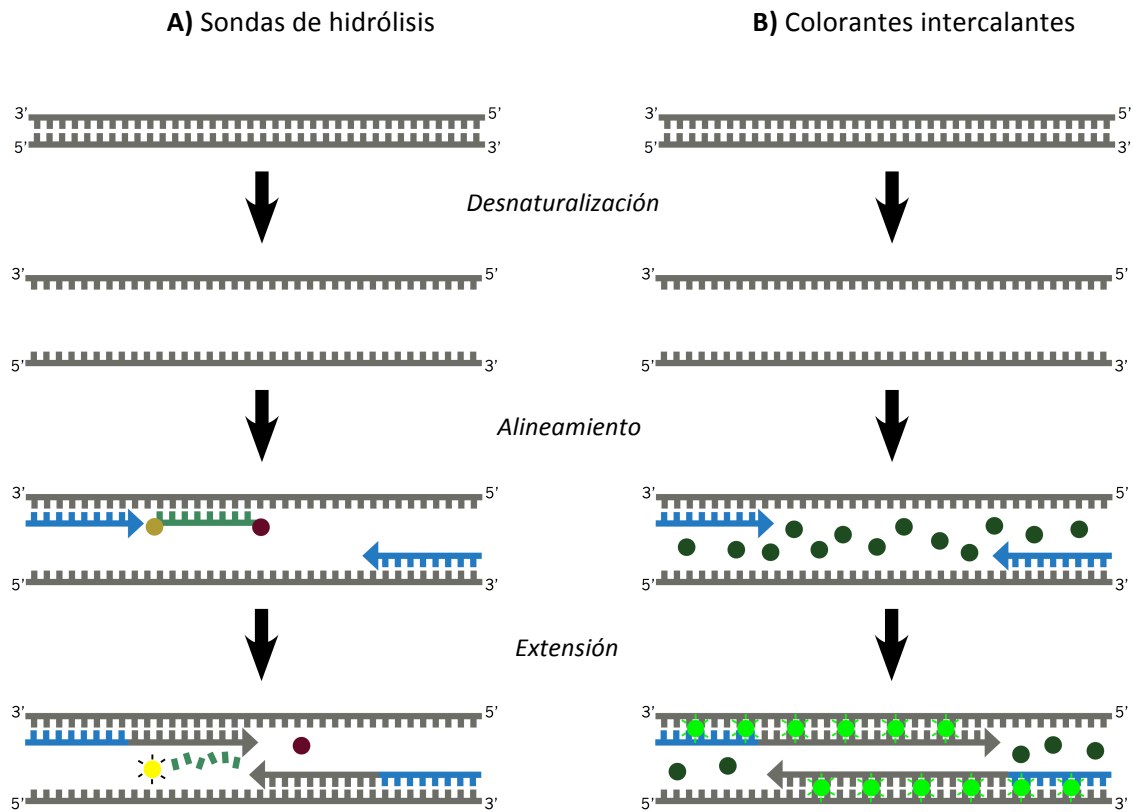


Figura 7 Mecanismo de las moléculas empleadas en PCR tiempo real A) Durante el paso de alineación tanto los iniciadores como la sonda se alinean, en este mismo paso la polimerasa desplaza e hidroliza la sonda, lo que libera al fluoróforo de su proximidad con la molécula represora, emitiendo así la señal de fluorescencia que puede ser detectada. B) Incorporación de colorantes intercalantes: durante la etapa de extensión las moléculas del colorante se unen al DNA, provocando un aumento en la fluorescencia que puede ser monitoreado en tiempo real. Durante la desnaturalización las moléculas de colorante se liberan y la señal vuelve al mínimo ^[83].

1.5.4 PCR múltiple

La PCR múltiple consiste en ejecutar más de una reacción de PCR distinta en un solo tubo. Esto se logra mediante la adición de más de un juego de iniciadores, que producen amplicones de distintos tamaños y que son específicos para diferentes secuencias virales (**figura 8**). Estos ensayos requieren un diseño profesional de iniciadores y sondas para evitar señales cruzadas de los iniciadores o su apareamiento, lo que ocasionaría falsos positivos y negativos respectivamente.^[80]

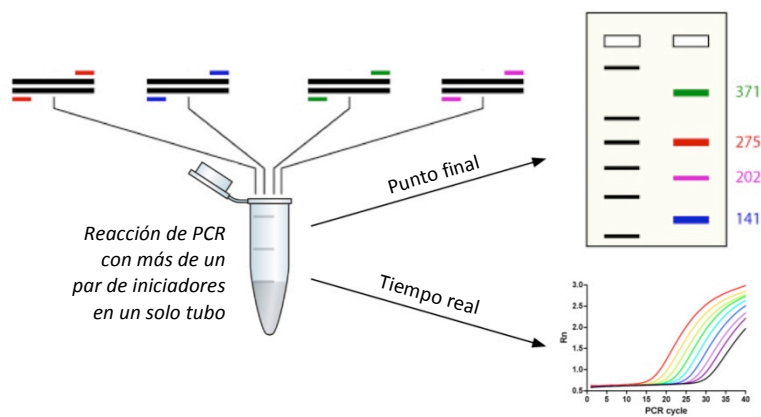


Figura 8. Esquema general de PCR múltiple. Es posible llevar a cabo múltiples reacciones de PCR en un tubo. Si los fragmentos amplificados varían en tamaño, pueden ser visualizados como distintas bandas tras realizar electroforesis al producto de PCR en punto final; o bien, pueden detectarse mediante sondas específicas en PCR en tiempo real.

Los enfoques de PCR múltiple cualitativa o cuantitativa se vuelven cada vez más populares para la detección de virus respiratorios, ya que implican un menor costo de reactivos y un menor tiempo de preparación de las reacciones, lo que favorece la relación costo-efectividad de una PCR múltiple en comparación con múltiples reacciones de PCR individuales^[84].

1.5.5 Microarreglos

Los microarreglos son plataformas de ensayo miniaturizados con una matriz de alta densidad de DNA o proteína inmovilizada. En estas plataformas se detecta la hibridación de biomoléculas presentes en la muestra con DNA o proteínas presentes en el chip, lo que permite la determinación de una variedad de analitos presentes en las muestras con un solo experimento^[85].

La utilidad de una estrategia para el diagnóstico de amplio espectro basada en microarreglos se ha demostrado con la identificación de múltiples virus en muestras clínicas [62]. Un ejemplo bien conocido es *Virochip*, un microarreglo viral diseñado para detectar simultáneamente todos los virus conocidos, el cual tiene una sensibilidad y especificidad comparable o superior a los diagnósticos convencionales [86, 87].

1.6 Métodos biofísicos para detección de virus.

1.6.1 Espectroscopía de masas

La espectroscopía de masas (MS) se ha convertido en un método de elección para la investigación molecular de patógenos, ya que su fiabilidad se refuerza con la enorme cantidad de información bien caracterizada de secuencias de ácidos nucleicos o proteínas e incluso de virus intactos [88, 89]. El uso pragmático de la MS es posible cuando se combina con varias técnicas de cromatografía y de afinidad. La combinación de técnicas de afinidad para detención viral y MS de ácidos nucleicos proporciona una solución para límites bajos de detección [90-92]. La MS tiene la ventaja de la identificación rápida de múltiples virus al mismo tiempo e incluso identificar el estado de modificación de las proteínas [88, 93]. Ahora la MS ya no se limita sólo a los análisis proteómicos, ya que los análisis genómicos basados en MS se han convertido en una práctica común. Una variante de la técnica de MS que se perfila como una aplicación práctica para la detección de patógenos es la espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS) (figura 9) [94, 95].

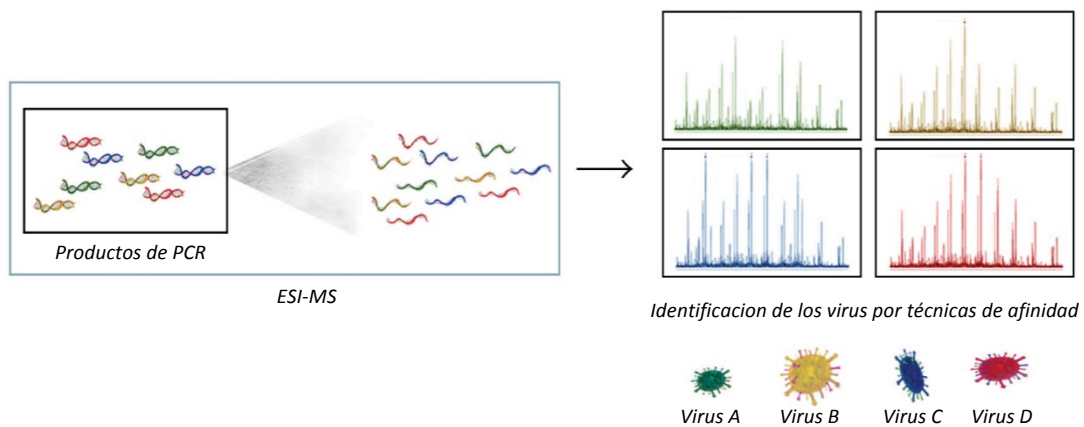


Figura 9. Espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS) de productos de PCR. Distintos productos de PCR pueden ser analizados a la vez y diferenciados incluso a nivel de cambios en una sola base [95].

1.6.2 Inmuno-PCR asistida por nanopartículas

Es una combinación de ELISA y PCR que se ha empleado ampliamente para la detección de diversos antígenos bacterianos y virales con títulos bajos, tan bajos del orden de zeptomoles ^[96]. Pérez et al. dieron a conocer una modificación de la inmuno-PCR utilizando nanopartículas de oro para la detección de RSV. La extracción de blancos en dicho trabajo se mejoró mediante el uso de micropartículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos anti-RSV. Una vez que se obtiene el complejo de micropartículas-RSV se conjunta con nanopartículas de oro funcionalizadas con dos moléculas: palivizumab (Synagis), un anticuerpo anti-proteína F de RSV, y con una secuencia de DNA parcialmente hibridada con una secuencia etiqueta de DNA (fAuNP). El complejo MMP-RSV-fAuNP se calienta a continuación para liberar la secuencia etiqueta de DNA parcialmente hibridada, que luego se cuantifica a partir del sobrenadante por PCR en tiempo real. Estas modificaciones permiten la detección de RSV incluso a 4.1 unidades formadoras de placa por mililitro. Este ensayo ofrece una mejora de 4,000 veces en el límite de detección comparado con ELISA y una mejora de 4 veces más del límite de detección para RT-PCR en tiempo real ^[97].

1.6.3 Seguimiento de RNA en células vivas

Con el advenimiento de la tecnología de faros moleculares (*molecular beacons*), ahora es posible realizar un seguimiento del RNA del hospedero y del virus. Con base en esta tecnología, surge una modificación que incluye nanopartículas de oro funcionalizadas con oligonucleótidos con estructura de horquilla. El oligonucleótido está diseñado de manera que la porción de la horquilla contiene la secuencia complementaria al RNA que será detectado, en el extremo 5' está vinculada una nanopartícula de oro mediante un grupo tiol, y el extremo 3' está acoplado a un fluoróforo. Cuando el RNA blanco hibrida con la horquilla el fluoróforo se libera del oro que reprime la emisión, y entonces se detecta la fluorescencia en células vivas (**figura 10**). ^[98,99].

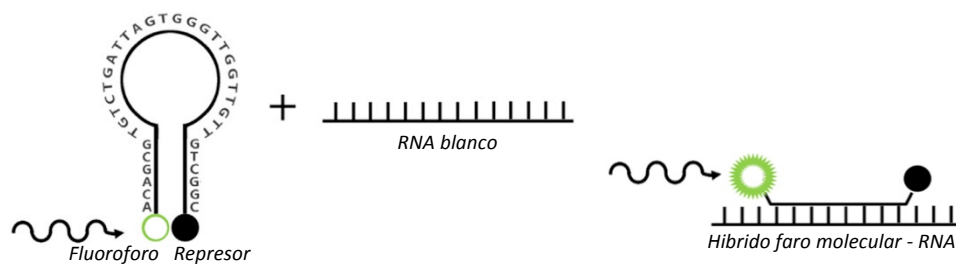


Figura 10. Mecanismo de los faros moleculares. Es posible acoplar los faros moleculares a nanopartículas de oro para dar seguimiento al híbrido fero molecular – RNA en células vivas ^[98].

1.6.4 Puntos cuánticos

Algunas inconsistencias de la técnica DFA se pueden atribuir a diversos aspectos relacionados con los colorantes, entre ellos: la atenuación de los colorantes, la correcta conjugación de anticuerpos con colorantes, una sensibilidad limitada debido a la tinción de fondo, y la excitación a dos longitudes de onda diferentes ^[82]. Para contrarrestar estas cuestiones, las nanopartículas fluorescentes, es decir, los puntos cuánticos (QDs) aparecen como candidatos prometedores para el diagnóstico clínico. Debido a su naturaleza inorgánica, son menos susceptibles a la degradación metabólica, son fotoestables, es decir, que no pierden la fluorescencia por la extensa exposición a la luz; además pueden ser excitados en la misma longitud de onda, mientras que irradian en diferentes longitudes de onda, por lo tanto puede ser utilizado para ensayos de detección múltiple ^[100].

Estas nanopartículas fluorescentes fueron utilizadas por Tripp et al. en ensayos *in vitro*, sobre células Vero, el cual se extrapoló mediante un estudio *in vivo* en ratones BALB/c, en dicho estudio llevaron un enfoque más allá de diagnóstico, ya que esta técnica se empleó para ensayos de detección de múltiples virus, para la detección de antígenos en célula huésped y para estudios de seguimiento intracelulares ^[101].

1.6.5 Microarreglos asistidos por nanopartículas

La FDA aprobó hace algunos años dos sistemas de microarreglos, el sistema semiautomatizado y el sistema totalmente automatizado para la detección de ácidos nucleicos de virus respiratorios. Ambos son ejemplos de los sistemas basados en microarreglos ^[102,103]. Estos sistemas se basan en la detección eficiente de hibridación en microarreglos asistidos por nanopartículas de oro. La hibridación entre las sondas de oligonucleótidos y DNA o RNA blanco se detecta específicamente mediante su re-hibridación con nanopartículas de oro funcionalizadas con oligonucleótidos, y la señal se genera mediante la reducción de la plata en presencia de un agente reductor, reacción que es promovida por el oro ^[104].

1.6.6 Espectroscopía Raman de superficie mejorada

Funciona con base en la dispersión inelástica de la radiación monocromática, ya sea cercana a infrarrojo (IR), visible o cercana a ultravioleta; cuando interactúa con un analito con baja frecuencia de vibración y/o energía de rotación. Por lo general la señal generada es baja y muchas

veces se mejora utilizando sustratos de plata o de oro en la matriz. Hay muchas modificaciones de la espectroscopía Raman, pero la más utilizada es la espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS) (figura 11) ^[105].

En contraste con la espectroscopía IR, los espectros Raman se puede conseguir sin la interferencia de las moléculas de agua y por lo tanto los analitos biológicos puede ser estudiados en su conformación nativa. La SERS se emplea rutinariamente para diversos fines bioanalíticos, debido a la detección rápida y no destructiva de analitos con la sensibilidad, la especificidad y precisión desde una sola molécula hasta células vivas ^[106,107].

La SERS puede ser dirigida a diferentes analitos que pueden ser DNA, RNA, proteínas, u otros compuestos orgánicos. Los ácidos nucleicos son los candidatos preferidos en las investigaciones de SERS biológicas, ya que la influencia de la composición de bases, la secuencia, la conformación (local y / o global) de los ácidos nucleicos, así como la dinámica intermolecular con las proteínas o ligandos se expresa correspondientemente como una firma espectral típica. De este modo las bacterias y los virus de diversas muestras biológicas pueden ser identificados, caracterizados, y clasificados a partir de las muestras ^[105,108,109]. La técnica de SERS puede incluso distinguir entre los virus de DNA o RNA como adenovirus, rinovirus, rotavirus y RSV ^[110,111].

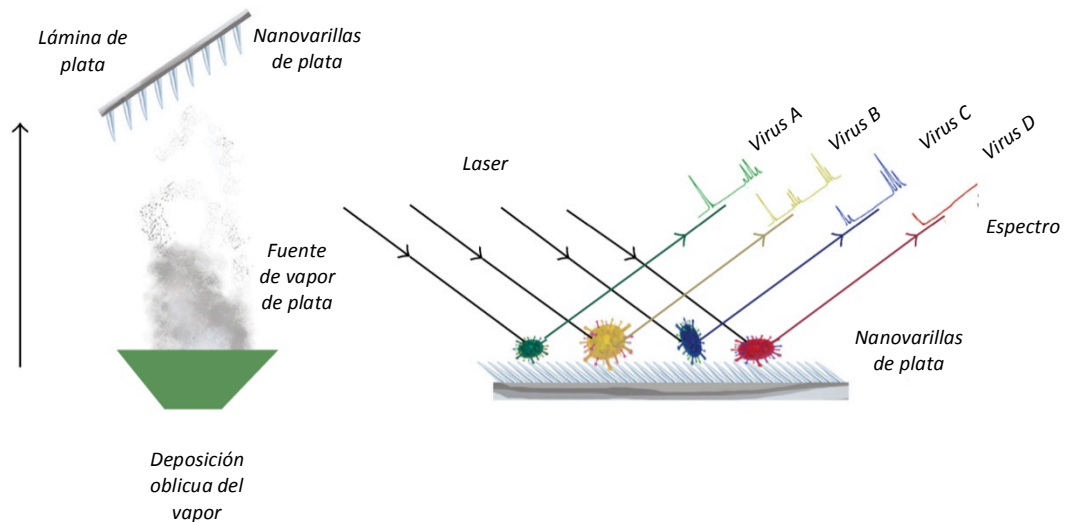


Figura 11. Espectroscopía Raman de superficie mejorada. La influencia de la composición de bases, la secuencia, la conformación (local y / o global) de los ácidos nucleicos, así como la dinámica intermolecular con la proteína o ligando se expresa correspondientemente como una firma espectral típica ^[105].

Tabla 3. Comparativo de técnicas de detección viral. [82]

	Técnica	Principio	Ventajas	Desventajas	Estado Actual
(A) Métodos basados en fluorescencia	<i>Fluorescencia Directa con Anticuerpos (DFA)</i>	Detección de proteínas virales con anticuerpos específicos conjugados con un fluoróforo.	Procedimiento fácil.	Error humano, falla de los colorantes.	Investigación, procedimientos hospitalarios, ensayos comerciales de diagnóstico.
	<i>Puntos Cuánticos (QD)</i>	Detección de señal de nanopartículas fluorescentes emitida al interactuar con el virus, por microscopía o citometría de flujo.	Fotoestable, inorgánico y resistente a la degradación metabólica.	Toxicidad, insolubilidad.	Investigación.
	<i>Seguimiento de RNA en células vivas</i>	Hibridación del mRNA viral y faros (beacons) de DNA, estructurados y acoplados a partículas de oro con un fluoróforo.	Toma de imágenes de células vivas con detección en tiempo real.	Probable silenciamiento de genes, degradación metabólica.	Investigación.
(B) Inmunoensayos	<i>Ensayo de inmunoadsorción acoplado a enzimas (ELISA)</i>	Detección de colorimetría de los complejos antígeno-anticuerpo por unión específica.	Protocolo fácil, alta especificidad y sensibilidad.	Incómodo, propenso al error humano.	Procedimientos hospitalarios, ensayos comerciales de diagnóstico.
	<i>Inmunoensayo Óptico (OEI)</i>	Detección visual de la alteración de superficies reflectoras por la presencia específica de complejos antígeno-anticuerpo.	Fácil, rápido, específico y costeable.	Requiere confirmación de muestras negativas por otros métodos.	Investigación, no comercializado.
	<i>Inmunoensayo de Flujo Lateral (ICLF)</i>	Inmunocomplejos detectados cromatográficamente.	Fácil, rápido, manejable, costeable y aprobado por la FDA.	No cuantitativo, el límite del volumen de muestra limita la detección.	Procedimientos hospitalarios, ensayos comerciales de diagnóstico.
(C) Métodos moleculares	<i>Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles (LAMP)</i>	Detección de colorimetría/turbidimetría producida por amplificación isotérmica de DNA con iniciadores específicos.	Sensibilidad y especificidad.	Semicuantitativo, requiere diseño de iniciadores compatibles.	Investigación, no comercializado.
	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	Amplificación de cDNA viral y visualización del producto en geles.	Rápido y más sensible que otros métodos.	Tiene un alto límite para detección.	Investigación, procedimientos hospitalarios.
	<i>PCR Tiempo Real</i>	Evaluación de la amplificación de productos en cada ciclo por colorimetría o pruebas que emiten fluorescencia.	Rápido (3-5 horas), alta sensibilidad y muy bajos límites para detección.	Caro.	Investigación, procedimientos hospitalarios, ensayos comerciales de diagnóstico.
	<i>PCR Múltiple</i>	PCR con uso de múltiples iniciadores o sondas.	Detección simultánea de distintas especies o cepas virales.	Menos sensible.	Investigación, procedimientos hospitalarios.
	<i>Inmuno-PCR</i>	Combinación de Inmunoensayo con PCR en tiempo real.	Muy bajos límites de detección que superan a los de ELISA y PCR por separado (4000 y 4 veces respectivamente).	Diseño experimental complejo.	Investigación, no comercializado.
	<i>Microarreglo</i>	Hibridación de moléculas presentes en la muestra a blancos inmovilizados de DNA o proteínas en un microarreglo.	Altamente sensible, identificación a gran escala de múltiples patógenos y blancos de ácidos nucleicos y proteínas.	Inefectivo en costos.	Investigación, procedimientos hospitalarios, ensayos comerciales de diagnóstico.
(D) Métodos biofísicos	<i>Espectroscopia de Masas (MS) de productos de PCR</i>	Espectroscopia de masas de amplificadores de PCR suministrados por electro dispersión.	Altamente específico y sensible incluso a nivel de cepa y detección eficiente de múltiples patógenos.	Caro	Investigación, no comercializado.
	<i>Espectroscopia Raman de Superficie Mejorada (SERS)</i>	Dispersión inelástica de radiación monocromática tras la interacción con un analito con baja frecuencia de energía vibratoria y/o rotacional.	Detección rápida y con alta sensibilidad de analitos sin destruirlos.	Preparación de la muestra.	Investigación, no comercializado.

1.7 Relevancia de la detección de virus respiratorios por PCR múltiple.

En la **tabla 3** se resumen las principales características de las distintas técnicas empleadas para la detección viral, así como algunas ventajas y desventajas. En general las plataformas para detección viral basadas en métodos biofísicos representan una valiosa alternativa cuando se trata de detectar la presencia de moléculas virales en concentraciones extraordinariamente pequeñas y además muchas de ellas pueden lograr una especificidad para resolver cambios incluso a nivel de secuencia. Sin embargo el actual panorama de los métodos biofísicos los sitúa aún en fase experimental y por lo tanto todavía no son una alternativa para el diagnóstico de rutina; antes se deben superar barreras en cuanto al costo de la tecnología para que sean accesibles ^[82].

Por otra parte el paradigma de los métodos de aislamiento viral en cultivo en conjunto con la inmunodetección como el "estándar de oro" para el diagnóstico está cambiando. Un nuevo paradigma está emergiendo a partir de las pruebas moleculares, que representan el nuevo "estándar de oro" para el diagnóstico viral. En comparación con otras técnicas de detección viral, la PCR en tiempo real es la plataforma de diagnóstico más sensible, rápida y económicamente rentable para la detección de virus respiratorios en este momento ^[112].

Como se ha mencionado antes, las infecciones respiratorias virales pueden ser ocasionadas por un gran número de agentes virales, lo cual implica que realizar el diagnóstico para diversos virus mediante PCR se vuelva demasiado laborioso, costoso, y con un requerimiento mayor en la cantidad de la muestra para llevar a cabo un análisis clínicamente significativo. Es por ello que los ensayos de amplificación para múltiples virus pueden proporcionar un ahorro de recursos, y de tiempo del resultado y con menor cantidad de muestra ^[113,114].

Comercialmente existe una amplia gama de ensayos de amplificación múltiples para la detección y cuantificación de virus respiratorios directamente de muestras clínicas (**tabla 4**). Existen estudios sobre el rendimiento relativo de diferentes ensayos comerciales, estas comparaciones continuarán conforme aparezcan ensayos múltiples mejorados ^[115-118]. Estos estudios deben tomar en cuenta no sólo los perfiles de rendimiento de los diversos ensayos comerciales, sino también sus limitaciones. Se espera que en un futuro los ensayos múltiples incorporen tecnologías como microarreglos de baja y mediana densidad, incluyendo los microarreglos de fluidos y los chips de DNA ^[112].

La PCR en tiempo real que se emplea en ensayos cuantitativos, aún no ha sido integrada en los ensayos de amplificación múltiples comerciales, de modo que esta combinación de

tecnologías se puede explotar para el desarrollo de ensayos comerciales o “caseros” (desarrollados para uso interno de laboratorios de diagnóstico), que pueden detectar y cuantificar múltiples virus respiratorios presentes en una sola muestra, para brindar un diagnóstico preciso y completo ^[119,112].

Tabla 4. Comparativo de los sistemas múltiples de amplificación y de alto rendimiento para la detección e identificación de virus respiratorios disponibles en el mercado. ^[116]

Sistema (Compañía)	Virus Detectados	Plataforma de Amplificación	Plataforma de Detección	Características
<i>FimArray, respiratory pathogen panel (Idaho Technology)</i>	AdV, bocavirus, 4 CoV, Inf-A, Inf-B, hMPV, PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4, RSV, y HRV	RT-PCR múltiple anidada	Analizador de matriz sólida	Sistema integrado y cerrado. También cubre 4 patógenos bacterianos.
<i>Infiniti, respiratory viral panel (AutoGenomics, Inc)</i>	Inf-A, Inf-B, PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4, RSV-A, RSV-B, hMPV-A, hMPV-B, RhV-A, HRV-B, EnV, CoV, y AdV	RT-PCR/PCR múltiple	Analizador <i>Infiniti</i> de matriz sólida	La etapa de detección por el analizador <i>Infiniti</i> es completamente automática.
<i>Jaguar system (HandyLab)</i>	Inf-A, Inf-B, y RSV-A/B	RT-PCR múltiple en tiempo real	Análisis de temperatura de disociación	Completamente cerrado y automatizado. Sistema universal compatible con la detección de otros patógenos.
<i>MultiCode-PLx, respiratory virus panel (EraGen Biosciences)</i>	Inf-A, Inf-B, PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4, RSV, hMPV, HRV, AdV, y CoV	RT-PCR/PCR múltiple	Matriz en suspensión <i>Luminex</i>	Soportes universales utilizados para la detección usando secuencias <i>EraCode</i> .
<i>NGEN Respiratory Virus (RVA) Analyte-specific reagent (Nanogen)</i>	Inf-A, Inf-B, PIV-1, PIV-2, PIV-3, y RSV	RT-PCR múltiple	<i>NanoChip</i> (Chip sólido)	Descontinuado en 2008. Marcado de la sonda, captura del blanco, y detección utilizando la tecnología electrónica de microarreglos.
<i>ProFLU1, ProPARAFLU1 (Prodesse, Inc)</i>	Inf-A, Inf-B, y RSV (ProFLU1); PIV-1, PIV-2, PIV-3, y PIV-4 (ProPARAFLU1)	RT-PCR múltiple en tiempo real	Análisis de temperatura de disociación	ProFLU1 aprobado por la FDA. Formatos de limitada PCR múltiple (triplex).
<i>ResPlex II (Qiagen)</i>	Inf-A, Inf-B, PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4, RSV-A, RSV-B, hMPV, HRV, EnV, y SARS-CoV	Templex RT-PCR	Matriz en suspensión <i>Luminex</i>	La Templex-PCR permite la detección de múltiples blancos en la reacción individual sin pérdida significativa en la sensibilidad.
<i>Seeplex respiratory virus detection assay (Seegene)</i>	AdV, hMPV, 2 CoV, PIV-1, PIV-2, PIV-3, Inf-A, Inf-B, RSV-A, RSV-B, y HRV	Dos sets de RT-PCR múltiple	Electroforesis	Sistema de oligonucleótido de cebado dual
<i>xTAG respiratory viral panel (RVP) (Luminex Molecular Diagnostics)</i>	Inf-A, Inf-B, PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4, RSV-A, RSV-B, hMPV, AdV, EnV, CoV, y HRV	RT-PCR/PCR múltiple	Matriz en suspensión <i>Luminex</i>	Aprobado por la FDA. Extensión del iniciador específico del blanco se utiliza en combinación con soportes de detección universales.

Los beneficios de un diagnóstico más preciso son principalmente tres: el primero, es que se beneficia al paciente en cuanto a la recepción de los medicamentos antivirales apropiados, tales como oseltamivir en el caso de la influenza, o a la reducción de tratamientos antibióticos innecesarios; segundo, ayuda a los profesionales responsables del control de infecciones en la adecuada decisión de medidas de control de infecciones, para reducir la tasa de propagación nosocomial; y tercero, proporciona información más precisa a las autoridades de salud pública respecto al panorama de los virus en circulación en la comunidad para que puedan establecer políticas de salud pública ^[112,120,114]

2. ANTECEDENTES

El Laboratorio de Bioseguridad para el Diagnóstico e Investigación de Enfermedades Emergentes que forma parte de la Coordinación General de Servicios Experimentales (CGSE) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), es un laboratorio de bioseguridad nivel 2 (LBS-2), que reúne las características necesarias en infraestructura, procedimientos y personal capacitado para la manipulación de agentes infecciosos. El CINVESTAV-IPN, en colaboración con el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT-DF) inició este proyecto en conjunto, que formó parte de la Red de Laboratorios de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológicos del Distrito Federal.

El LBS-2 se implementó con el propósito de realizar el diagnóstico y tipificación del virus de la influenza AH1N1, así como de otros agentes causantes de enfermedades infecciosas emergentes de manera oportuna, así como dar respuesta rápida en caso de contingencias y tomar decisiones con información respaldada científicamente. Actualmente el LBS-2 usa una plataforma de RT-PCR en tiempo real para realizar diagnóstico del virus de la influenza A y sus subtipos *Swine*, H1 estacional y H3 estacional, así como influenza B. Este ensayo se basa en protocolos validados a nivel internacional por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC).

De acuerdo a los datos obtenidos con la plataforma para identificación de influenza del LBS-2, durante el año 2014 se procesaron 90 muestras provenientes de exudados nasofaríngeos, de las cuales 37 resultaron positivas para algún subtipo de influenza A o influenza B; mientras que para el resto de las muestras procesadas se emitió un resultado negativo.

3. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico molecular de laboratorio es esencial para el tratamiento, control y prevención de las enfermedades respiratorias de origen viral. Actualmente el Laboratorio de Bioseguridad para el Diagnóstico e Investigación de Enfermedades Emergentes cuenta con un servicio de diagnóstico válido para subtipos de Influenza A y de Influenza B. Sin embargo es necesario contar con una prueba válida en el laboratorio que permita identificar con precisión otros virus respiratorios de mayor prevalencia para ofrecer un diagnóstico preciso. Para este fin la técnica de RT-PCR cuantitativa multiplex es actualmente la opción más rentable, debido a la sensibilidad y especificidad que se puede obtener con esta técnica en un tiempo corto y con una buena relación costo-efectividad en comparación con otras plataformas.

4.1 Objetivo general

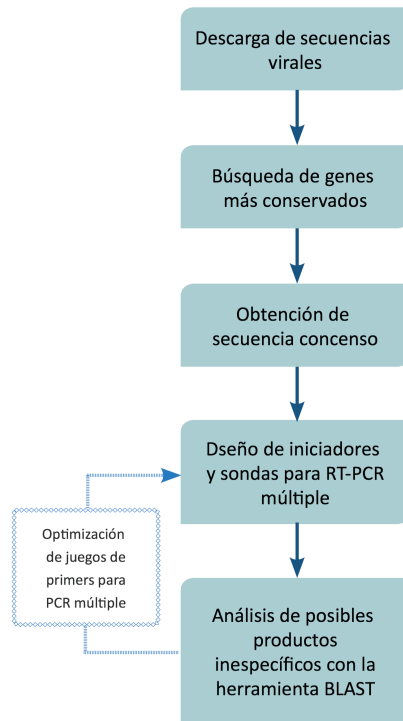
Diseñar, desarrollar y evaluar un sistema de RT-PCR múltiple en tiempo real para la identificación en muestras clínicas de 14 virus respiratorios: virus respiratorio sincitial (RSV) A y B; metapneumovirus humano (hMPV); virus de parainfluenza (PIV) 1, 2, 3 y 4; rinovirus (HRV); coronavirus (CoV) OC43, 229E, NL63 y HKU1; adenovirus (AdV); y bocavirus (BoV).

4.1 Objetivos particulares

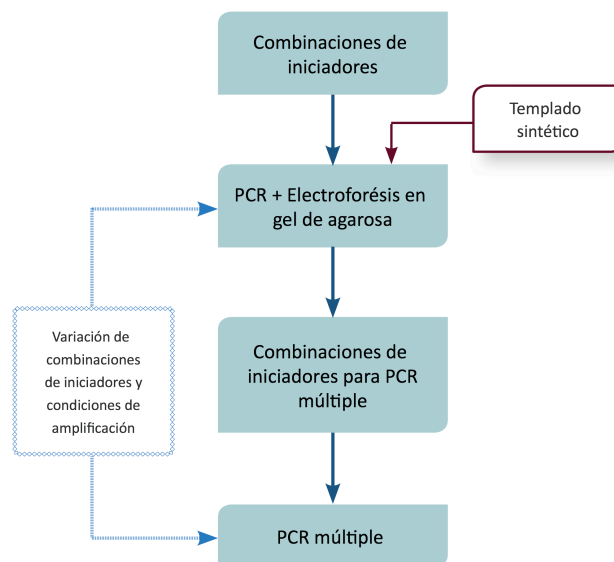
- 1) Diseñar y optimizar los juegos de iniciadores y sondas de hidrólisis para RT-PCR en tiempo real de 14 virus respiratorios: HRV, RSV-A, RSV-B, hMPV, PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4, CoV-OC43, CoV-229E, CoV-NL63, CoV-HKU1, AdV y BoV.
- 2) Determinar las condiciones y las combinaciones de iniciadores y sondas de hidrólisis adecuadas para detectar DNA sintético mediante PCR/RT-PCR múltiple en tiempo real.
- 3) Evaluar la sensibilidad y especificidad de los juegos de iniciadores y sondas de hidrólisis para PCR/RT-PCR múltiple en tiempo real con moldes sintéticos.
- 4) Probar la capacidad de los juegos de iniciadores para PCR/RT-PCR múltiple en tiempo real para la detección de virus respiratorios en muestras de DNA y RNA extraídas de exudados faríngeos de pacientes con síntomas respiratorios.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

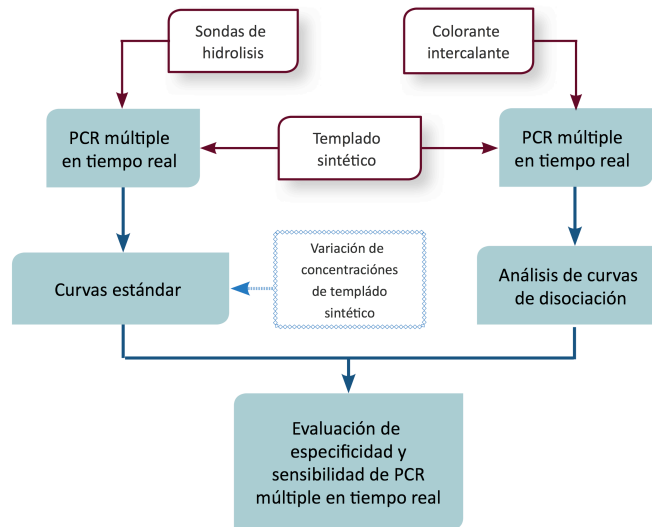
- 1) Diseñar y optimizar los juegos de iniciadores y sondas de hidrólisis para RT-PCR en tiempo real de 14 virus respiratorios.



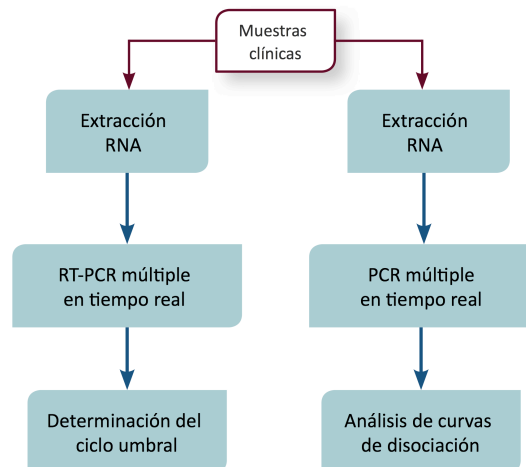
- 2) Determinar las condiciones y las combinaciones de iniciadores y sondas de hidrólisis adecuadas para detectar DNA sintético mediante PCR/RT-PCR múltiple en tiempo real.



- 3) Evaluar la sensibilidad y especificidad de los juegos de iniciadores y sondas de hidrólisis para PCR/RT-PCR múltiple en tiempo real con moldes sintéticos.



- 4) Probar la capacidad de los juegos de iniciadores para PCR/RT-PCR múltiple en tiempo real para la detección de virus respiratorios en muestras de DNA y RNA extraídas de exudados faríngeos de pacientes con síntomas respiratorios.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño de iniciadores y sondas para RT-PCR múltiple

Se obtuvieron las secuencias genómicas de los virus respiratorios: HRV, RSV-A, RSV-B, hMPV, PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4, CoV-OC43, CoV-229E, CoV-NL63, CoV-HKU1, BoV y AdV de la base de datos *Nucleotide* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), del Centro Nacional de información biotecnológica de Estados Unidos (NCBI). Se recopilaron secuencias de genomas completos de los distintos virus para ser analizadas. Así mismo, se tomaron en cuenta las secuencias disponibles de proyectos de secuenciación de genomas contenidos en la base de datos *BioProject* del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>).

Las secuencias de genomas obtenidas fueron alineadas con la herramienta *Seaview* (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>), empleando el algoritmo *Clustal Omega* (<http://www.clustal.org/omega/>). Los alineamientos de genomas se emplearon para buscar genes conservados o con menos variaciones sobre los cuales se pudiera generar un consenso para el diseño de los iniciadores y las sondas. Una vez que se determinaron los genes más conservados se obtuvieron las secuencias de los mismos a partir de genomas completos, así como de secuencias de fragmentos que contuvieran los genes de interés presentes en la base de datos *Nucleotide*. Las secuencias de cada gen viral empleadas para generar el consenso se enlistan en el **Anexo 1**.

Posteriormente para el análisis visual de las mutaciones más frecuentes dentro de los genes virales se generó una imagen Logo^[121] del archivo del alineamiento, empleando la herramienta en línea *WebLogo 3* (<http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>). La secuencia que representa el consenso del gen se generó editando manualmente alguna de las secuencias en la herramienta *Seaview* para que contuviera los cambios más frecuentes de cada gen.

Las secuencias consenso de los genes de los 12 virus de RNA se agruparon de distintas maneras en tres juegos para la búsqueda de candidatos de iniciadores y sondas de hidrolisis, también conocidas como sondas *TaqMan* para PCR múltiple en tiempo real con ayuda del software *Beacon Designer* (http://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/). Así mismo se generó un grupo de candidatos de iniciadores a partir de las secuencias consenso con el software *AmplifX* (<http://crn2m.univ-mrs.fr/AmplifX?lang=en>). Con ayuda de este último software se analizaron distintos parámetros de los iniciadores, como son la temperatura de fusión (TM), el porcentaje de guaninas y citosinas que contienen los iniciadores y sondas, y la formación de

dímeros entre iniciadores de un mismo virus y entre iniciadores de distintos virus de acuerdo a las combinaciones para reacciones múltiples.

La estrategia para generar sondas doblemente marcadas mediante el software AmplifX consistió en armar juegos de tres iniciadores, compuestos por un iniciador sentido (Fw) y un iniciador antisentido (Rv) que delimitan una región, así como un iniciador ya sea sentido o antisentido que se encuentra dentro de la región delimitada, pero separado por algunas bases de los iniciadores que delimitan esta región, de modo que los iniciadores no se traslapen. A continuación se modificó el tercer iniciador (que no delimita la región y esta entre Fw y Rv), para que cumpliera las siguientes condiciones: tener una T_M entre 8 y 10 °C por encima de la T_M de los iniciadores, no debe contener citosina en el extremo 5', y que no forme estructuras secundarias considerables cuando se encuentra a la T_M de los iniciadores Fw y Rv; para corroborar esta última condición se realizó un análisis de las probables estructuras que se forman con ayuda de la herramienta *Mfold* (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>).

Al mismo tiempo se diseñaron los iniciadores para los dos virus de DNA: AdV y BoV; de tal modo que amplificaran productos con distinto tamaño y distinta T_M , además de cumplir con los parámetros ya mencionados para llevar a cabo la reacción de estos dos virus de manera múltiple.

Finalmente se realizó una búsqueda de secuencias similares para todos los juegos de iniciadores y sondas con la herramienta *BLAST* del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), esto con el fin de descartar posibles productos inespecíficos en la reacción de PCR por el alineamiento de iniciadores y sondas con otras regiones de RNA o DNA viral y humano.

Cabe mencionar que el diseño de los iniciadores para PCR múltiple se llevó a cabo de manera reiterada hasta obtener los mejores candidatos, repitiendo en varios casos el paso de la selección de candidatos de iniciadores y sondas, las combinaciones entre estos candidatos para reacciones múltiples, y en algunos casos la selección de un nuevo gen conservado que proporcionara nuevos candidatos. Así mismo para secuencias virales que varían en gran medida o contienen diversos subtipos como es el caso de HRV y AdV, el diseño de iniciadores y sondas consistió en comparar y adaptar las regiones más conservadas, partiendo de juegos de iniciadores y sondas ya reportados^[118,122].

6.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en los ensayos de PCR/RT-PCR en punto final y tiempo real (iniciadores Fw y Rv, y moldes sintéticos del virus) fueron obtenidos por síntesis química y posteriormente desalados por medio del proveedor Sigma-Aldrich Co.

Las sondas doblemente marcadas para los ensayos de tiempo real consistieron en oligos modificados en el extremo 5' con uno de los siguientes fluoróforos: 6-FAMTM (FAM), Cal Fluor 560[®] (CF560), ROXTM (ROX) y Cyanine-5 (Cy5). Estos oligos también contenían modificaciones en el extremo 3' al cual se unieron las siguientes moléculas represoras: Black Hole Quencher 1[®] (BHQ-1) cuando en el extremo 5' se encuentran los fluoróforos FAM y CF560, Black Hole Quencher 2[®] (BHQ-2) cuando se encuentra ROX, y Black Hole Quencher 3[®] (BHQ-3) para los oligos con Cy5. La sonda doblemente marcada empleada en el ensayo de *RNAsaP* contiene el fluoróforo FAM en el extremo 5' y TAMRATM en el extremo 3' como molécula represora. Estas sondas doblemente marcadas se obtuvieron por síntesis química y purificadas por cromatografía (HPLC) mediante el proveedor Sigma-Aldrich Co

6.3 Muestras clínicas

Las muestras clínicas empleadas en el presente trabajo fueron obtenidas de pacientes de diferentes edades, hospitalizados con síntomas respiratorios graves, de los cuáles se obtuvo un exudado faríngeo tomado con un hisopo, que se sumergió en un tubo con medio de transporte viral que se hizo llegar al LBS-2 para la identificación de influenza. Las muestras empleadas en este trabajo fueron aquellas que resultaron negativas para influenza .. Adicionalmente se trabajaron muestras provenientes de pacientes hospitalizados que presentaban conjuntivitis para realizar los ensayos de detección de AdV.

6.4 Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos

Las extracciones de ácidos nucleicos se llevaron a cabo en un entorno de bioseguridad dentro del BSL-2, y todas las muestras se manipularon dentro de un gabinete de bioseguridad clase II (ESCO[®]).

Para la extracción de DNA se empleó el kit QIAamp[®] DNA Mini de QUIAGEN[®], de acuerdo a las indicaciones del mismo, empleando 140 uL de muestra, y eluyendo el DNA en un volumen

final de 60 uL. El DNA se cuantificó y se empleó en las reacciones de RT-PCR o se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Para la extracción de RNA se empleó el kit QIAamp® Viral RNA Mini de QUIAGEN®, de acuerdo a las indicaciones del mismo, empleando 140 uL de muestra, y eluyendo el RNA en un volumen final de 60 uL. El RNA se cuantificó y se empleó en las reacciones de RT-PCR o se almacenó a -70 °C hasta su uso.

La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó tomando en cuenta el cociente entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm, de una alícuota de 2 uL de las extracciones en el Espectrofotómetro Epoch™ de BioTek® y determinando la concentración con ayuda del software Gen5™ de BioTek®.

6.5 PCR/RT-PCR punto final

Las reacciones de PCR se realizaron adicionando los siguientes reactivos: 10 uL de ABI Gene Expression 2x Mix de Applied Biosystems®, 260 ó 530 nM de cada iniciador Fw y Rv, 2 uL de molde y agua Milli-Q para obtener un volumen de reacción de 15 uL. Como molde se emplearon stocks de molde sintético en concentraciones desde 500 hasta 5,000,000 copias/uL, o en su defecto DNA extraído de muestras con concentraciones entre 40 y 80 ng/uL, así como agua Milli-Q en el caso de los controles negativos. En el caso de las reacciones múltiples, se emplearon mezclas de 200 ó 400 nM de cada iniciador Fw y Rv. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti de Applied Biosystems®, con el siguiente programa: 95 °C por 2 min. para desnaturalización inicial, 40 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 15 s, alineamiento entre 50 y 62 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s; seguidos de un paso final de 72°C por 3 min; y una etapa final para mantener las reacciones a 4 °C.

Las reacciones de RT-PCR se realizaron en un solo paso con el kit Superscript® One-Step RT-PCR with Platinum® *Taq* System de Invitrogen™, cada mezcla de reacción contenía: 0.2 uL de la mezcla de enzimas, 7.5 uL de buffer 2x, 260 nM de cada iniciador Fw y Rv, 2 uL de molde y agua Milli-Q necesaria para obtener un volumen final de reacción de 15 uL. Como molde se emplearon stocks de molde sintético en concentraciones desde 500 hasta 5,000,000 copias/uL, o en su defecto RNA extraído de muestras con concentraciones entre 40 y 80 ng/uL, y agua Milli-Q en el caso de los controles negativos. Las reacciones múltiples, contenían 266 nM de cada iniciador Fw y Rv. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti, con el siguiente programa:

retrotranscripción a 50 °C por 30 min., desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min., 40 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 15 s, alineamiento entre 50 y 62 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s; seguidos de un paso final de 72°C por 3 min. para enseguida mantener las reacciones a 4 °C.

6.6 Electroforesis en geles de agarosa y acrilamida

Los productos de PCR y RT-PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa y de acrilamida. Los geles de agarosa se elaboraron al 3% en buffer TBE 1x (89 mM Tris, 89 nM ácido bórico, 2mM EDTA), con intercalante GelRed™ de Biotium Inc.™ en concentración final 0.5x. En los pozos del gel se colocaron entre 6 y 9 uL de una mezcla de producto de PCR, y buffer de carga para ácidos nucleicos 6x (30% glicerol, 0.1% SDS, 0.01% azul de bromofenol, 0.01% xilen-cianol), así mismo se utilizaron como referencia entre 3 y 5 uL de alguno de los siguientes marcadores de peso molecular: Rango Bajo ADN pBR322/Msp I de BioTecMol™, o 100+50 bp DNA Marker de Bio Basic Inc.™, en algunos casos se empleó este último marcador adicionando un volumen del marcador 100 bp DNA Ladder de Invitrogen™ por cada cinco volúmenes del primero. Los geles se sometieron a electroforesis por 50 min a 100 V en buffer TBE 1x. Al terminar la electroforesis los geles se colocaron en el transiluminador donde se visualizaron y documentaron en luz UV de longitud de onda corta y con ayuda de un filtro para luz naranja.

Por otra parte se prepararon geles de acrilamida al 10% (10% acrilamida:bisacrilamida 19:1, buffer TBE 1x), cargando en ellos entre 3 y 9 uL de una mezcla de producto de PCR, y buffer de carga para ácidos nucleicos 6x. Los geles se sometieron a electroforesis por 120 min a 100 V en buffer TBE 1x. Al terminar la electroforesis los geles de acrilamida se sumergieron en buffer TBE 1x con GelRed™ 1x durante 20 min. Inmediatamente después los geles se sumergieron en agua estéril para retirar el exceso de colorante y se colocaron en un transiluminador donde se visualizaron y documentaron bajo luz UV de longitud de onda corta y con ayuda de un filtro para luz naranja.

6.7 Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR de interés se purificaron separándose en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1% teñidos con con GelRed™ en concentración final 0.5x, colocando en los pozos entre 6 y 9 uL de una mezcla de producto de PCR, y buffer de carga para ácidos nucleicos 6x. Los geles se sometieron a electroforesis por 30 min a 100 V en buffer TBE 1X. Al terminar la

electroforesis los geles se colocaron en un transiluminador donde se visualizaron brevemente exponiéndolos a luz UV de longitud de onda larga. Durante la visualización y de la forma más rápida posible, las bandas de interés se recuperaron cortando el gel con ayuda de una navaja. Los fragmentos de gel que contenían los amplificadores de interés se fundieron a 60 °C y se diluyeron hasta 100 veces en agua Milli-Q para su cuantificación.

6.8 PCR/RT-PCR múltiple en tiempo real

Las reacciones de PCR múltiple en tiempo real se llevaron a cabo combinando en un tubo los ensayos de AdV y BoV. Para estas reacciones se preparó la mezcla que contenía: 10 uL de Green-2-Go qPCR Low ROX 2x Mastermix de Bio Basic Inc.TM, 200 ó 400 nM de cada iniciador Fw y Rv, 2 uL de molde y agua Milli-Q para obtener un volumen de reacción de 20 uL. Como molde se emplearon stocks de molde sintético en concentraciones desde 10^5 hasta 10^7 copias/uL, o en su defecto DNA extraído de muestras con concentraciones entre 40 y 80 ng/uL, así como agua Milli-Q para los controles negativos. Los ensayos se llevaron a cabo en un equipo de tiempo real ABI 7500 de Applied Biosystems®, con el siguiente programa: 95 °C por 10 min. para desnaturalización inicial y activación de la enzima, 40 ciclos de amplificación de 95°C por 15 s, 57 °C por 40 s, seguidos por una etapa de detección de temperaturas de disociación. En cada uno de los ciclos de la etapa de amplificación, durante el paso de 57 °C por 40 s, el equipo registró la fluorescencia del colorante SYBR en el canal A y tomando como colorante de referencia ROX. Al término de la reacción los datos de la fluorescencia en cada ciclo de amplificación, así como la curva de temperaturas de disociación fueron analizados con el software del equipo.

Las reacciones de RT-PCR múltiple en tiempo real para los sets 4plex-A, 4plex-B Y 4plex-C, se llevaron a cabo empleando el kit Superscript® III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System de InvitrogenTM, cada mezcla de reacción contenía: 0.4 uL de la mezcla de enzimas, 10 uL de buffer 2x, 0.25, 0.5 ó 1 uM de cada iniciador Fw y Rv, 125, 187.5 ó 250 nM de cada sonda, 2 uL de molde y agua Milli-Q necesaria para obtener un volumen final de reacción de 20 uL. Como molde se emplearon stocks de molde sintético en concentraciones desde 1 hasta 10^8 copias/uL, o en su defecto RNA extraído de muestras con concentraciones entre 40 y 80 ng/uL, así como agua Milli-Q para los controles negativos. Los ensayos se llevaron a cabo en un equipo de tiempo real ABI 7500, con el siguiente programa: 50 °C por 30 min. para la retrotranscripción, 95 °C por 2 min. de desnaturalización inicial, y 40 ciclos de 95°C por 15 s, 57 °C por 40 s. En cada uno de los ciclos

de la última etapa, durante el paso de 57 °C por 40 s, el equipo registró la fluorescencia de los fluoróforos FAM, CF560, ROX y/o Cy5 en los canales A, B, D y E respectivamente. Al término de la reacción los datos fueron analizados con el software del equipo.

6.9 Cuantificación de moléculas en PCR tiempo real

Para los ensayos con sondas doblemente marcadas se generaron curvas de amplificación, graficando la señal de fluorescencia contra el número de ciclo. La señal de fluorescencia se compone de la señal emitida por el fluoróforo reportero, menos la señal de fondo (ΔR_n).

Para cuantificar la cantidad de moléculas iniciales se establecieron valores de ΔR_n como el umbral, estos valores se encuentran por encima de la línea base de amplificación, pero dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación. El ciclo umbral (C_T) de una reacción se tomó como el ciclo fraccional en que la curva de amplificación cruza el umbral.

Las curvas estándar se obtuvieron graficando el C_T contra el logaritmo de la concentración y determinando las pendientes y la intersección con Y de estas rectas. El porcentaje de eficiencia de las reacciones de PCR con base en las curvas estándar se calculó a partir de las pendientes de estas curvas, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1 / \text{Pendiente})} - 1$$

En los ensayos de disociación las curvas se mostraron en gráficas del cambio de fluorescencia contra temperatura en °C.

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de juegos de iniciadores y sondas.

Mediante la metodología previamente descrita se obtuvieron 14 pares de iniciadores Fw y Rv para la detección de secuencias correspondientes al genoma de 14 virus respiratorios: HRV, RSV-A, RSV-B, hMPV, PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4, CoV-OC43, CoV-229E, CoV-NL63, CoV-HKU1, BoV y AdV. Todos los pares de iniciadores se diseñaron con una TM muy cercana, y cuidando que los amplicones variaran en el número de bases, con el fin poder diferenciarlos de acuerdo a su tamaño en geles de acrilamida. En la tabla 5 se enlistan las principales características de los iniciadores así como su secuencia.

Tabla 5. Principales características de los iniciadores Fw y Rv.

Virus	Gen	Tamaño Amplicón [b]	Secuencia Fw (5' – 3')	Tamaño Fw [b]	TM Fw [°C]	Secuencia Rv (5' – 3')	Tamaño Rv [b]	TM Rv [°C]
CoV-OC43	HE	150	GTTCCWACGAAAGCAATCTG	20	59.8	GGTAGTAGAATTRCGAAAATAACAG	25	59
PIV-1	HN	148	AGGACTATAAACATACAAAGTTCAG	25	60	GCATGGTGAATAGCAATRG	19	60
HRV	5'UTR	144	TTGGACAAGGTGGAAGA	18	59.9	AAAGTAGTCGGTCCCRTC	18	60.8
PIV-3	HN	141	GTCTGGTCTCCATCTTTGA	20	60.3	GAGGTGTAAGCATAAATCAGATC	23	60.2
PIV-2	HN	136	GAAGGTAGGCTCTATGTTATTG	22	60	CCCATTGAGCCTCAATGA	18	60.2
CoV-229E	N	133	AACGGGTGGATTTGTCAC	18	60.8	CCTGTAGGTTTCAGTTTAGCA	21	58.4
RSV-B	N	132	CAGGACAAGTAATGCTAAGATG	22	60	CTCCTCCCAACTTCTGTG	18	59.9
RSV-A	N	124	GCAAAGGCATATGCTGAA	18	59.1	GCTCTACATCATTATCTTTGGGA	23	59.6
CoV-NL63	N	123	CTCGTAGCAGCTTCAAGACA	19	60.1	GTGACTTCGACTGGTTATCA	20	58.7
hMPV	N	120	GGTGCTGGTCAACAATG	18	59.9	CACTAGGTCATAGACTTCTGT	21	59.4
CoV-HKU1	HE	111	AGCTCTCTGTTTGATAAATCTAA	24	59.9	GGCAATTGACATGCAACA	18	59.9
PIV-4	HN	107	GTGACCTTATTTCARAGTCGA	22	59.9	CACACAATACAGTARACATCCG	22	60.8
BoV	NP1	106	GCTCAGGGAATATGAAAGACA	21	60.9	CTCCTGCTCCTGTGATGA	18	61.3
AdV	hexon	90	GCCTCGGAGTACCTGAG	17	60.9	CCGTGGGGTTTCTAAACTT	19	60.3

*Tm predicha con el software amplifX

Para las reacciones múltiples los pares de iniciadores se agruparon en tres juegos o sets compuestos de 4 pruebas virales (set 4plex-A: RSV-A, PIV-4, CoV-OC43 y CoV-HKU1; set 4plex-B: PIV-1, RSV-B, PIV-3 y PIV-2; set 4plex-C: CoV-229E, CoV-NL63 y HRV), y un cuarto set compuesto de dos virus (set 2plex-D: AdV y BoV). Una vez establecidos estos sets se seleccionaron los fluoróforos para las sondas de hidrólisis que se usaron en los ensayos en tiempo real para los sets 4plex-A, 4plex-B y 4plex-C. Los fluoróforos se asignaron de tal modo que cada uno de los cuatro ensayos que contiene un set pudiera ser detectado, por el equipo de PCR en tiempo real ABI 7500, en canales de fluorescencia distintos. Los fluoróforos empleados en los ensayos fueron: FAM, CF560,

ROX y Cy5; los cuales se detectan en los canales del equipo A, B, D y E respectivamente. En la **tabla 6** se resume la asignación de los fluoróforos y represores para cada sonda, así como las características principales de las mismas, y su secuencia. Para los ensayos en tiempo real con el set 2plex-D se trabajó con una curva de disociación empleando el agente intercalante SYBR, es por ello que no se requirieron sondas para los ensayos de AdV y BoV.

Tabla 6. Principales características de las sondas de hidrólisis para los ensayos de qRT-PCR.

Virus	Tamaño [b]	Fluoróforo (5'-)	Secuencia (5' - 3')	Represor (3'-)	TM [°C]	Sentido*	Set
RSV-A	28	FAM	TGATAGCCTCTAGTCTCTGCTGTCAA	BHQ-1	69	Anti	4p-A
PIV-4	26	CF560	ACAGCAACCACTGARCAACTCTTTTCG	BHQ-1	69,1	Anti	4p-A
CoV-OC43	24	ROX	CAAGCAACCCCGTCATGTTATCA	BHQ-2	69	Anti	4p-A
CoV-HKU1	21	Cy5	AGGCACGCTCGTTGTCCATC	BHQ-3	69,6	Anti	4p-A
PIV-1	27	FAM	CGCATATCTGAGCCAATTCCTGTYTGA	BHQ-1	69,6	Anti	4p-B
RSV-B	27	CF560	ACTCATAGACTTCCACAACCTTGCTCCA	BHQ-1	69,8	Anti	4p-B
PIV-2	24	ROX	AGTTCTCTGGTGGTCTGCATCG	BHQ-2	70.1	Sent	4p-B
PIV-3	25	Cy5	TTCTRACACAGCCATCAACAGTCGT	BHQ-3	70.5	Anti	4p-B
CoV-229E	22	FAM	ACGACACCTTCAACACGCTCTC	BHQ-1	69	Anti	4p-C
CoV-NL63	26	CF560	TCTCGCACTCGTTCTGATTCTAACCA	BHQ-1	69,7	Sent	4p-C
HRV	19	ROX	TCCTCCGGCCCTGAATGY	BHQ-2	69,1	Sent	4p-C
hMPV	32	Cy5	ATCGCCAGGTCATCTAACAAAYATAATGTTAGG	BHQ-3	68.7	Sent	4p-C

*Sent indica que la sonda es contigua al iniciador Fw, mientras que Anti indica que es contigua al iniciador Rv

7.2 Gradientes de temperatura y síntesis de moldes de tamaño completo

Para los ensayos de PCR en punto final de los 12 virus de RNA (HRV, RSV-A, RSV-B, hMPV, PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4, CoV-OC43, CoV-229E, CoV-NL63 y CoV-HKU1), se contó con dos juegos de moldes sintéticos para cada ensayo viral: los “recortados” y los “duales” (**figura 12**), (la secuencia de todos ellos se encuentra en el **anexo 2**).

El primer juego de moldes , consistió en una cadena de DNA para cada ensayo viral que contiene las regiones de los iniciadores Fw, Rv, y de la sonda; sin embargo se omitieron algunas bases entre estas regiones para obtener moldes que no superaran las 120 bases de tamaño, esto con el fin de asegurar la correcta síntesis de las cadenas por parte del proveedor. Con estos moldes de menor tamaño se realizaron gradientes de temperatura para determinar la TM óptima, misma que se estableció para todos los ensayos en 56 °C (**figura 13**). Las imágenes de los ensayos de gradientes de temperatura se pueden encontrar en el **anexo 3**.

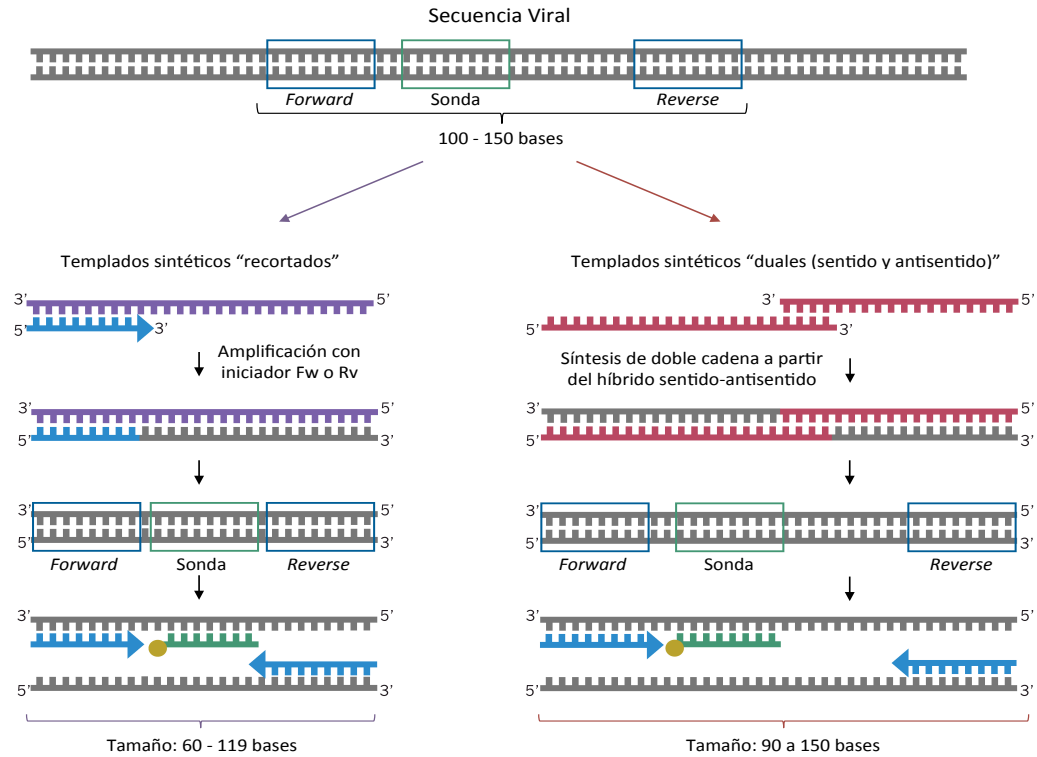


Figura 12. Moldes sintéticos. Los moldes “recortados” (izquierda) se obtuvieron editando la región blanco de la secuencia viral, eliminando nucleótidos que no afectarían las regiones de los iniciadores y la sonda. Los moldes “duales” (derecha) son dos oligos (sentido y antisentido) complementarios en los extremos 3’, los cuales al ser rellenados forman una molécula de doble cadena que contiene la región blanco del virus.

Una vez determinada la T_m óptima se llevó a cabo la síntesis de los moldes de tamaño completo a dicha temperatura. Para ello se colocaron los oligos sentido y antisentido, cada uno en concentración de 2×10^{10} moléculas/reacción, con sus respectivos iniciadores Fw y Rv en reacciones de PCR. Los productos obtenidos se purificaron separándolos en geles de agarosa de bajo punto de fusión y se re-amplificaron hasta obtener bandas únicas del tamaño esperado, los moldes se cuantificaron y se diluyeron a una concentración de 10^{10} moléculas/ μ L, y se utilizaron posteriormente como controles positivos en las reacciones (**figura 14a**).

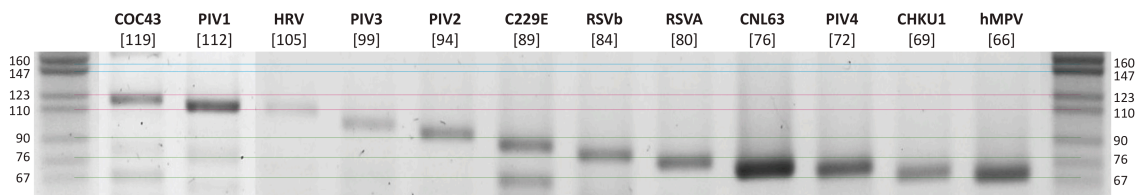


Figura 13. PCR de moldes “recortados”. Productos de PCR para 12 ensayos virales con sus respectivos iniciadores (260 nM) y moldes “recortados” (1000 copias/reacción), a una T_m de 56°C y separados en un gel de agarosa al 3%

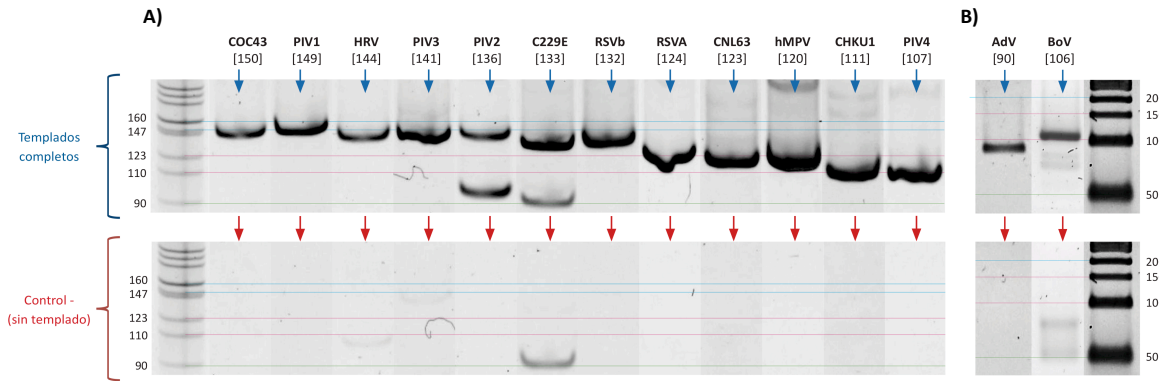


Figura 14. PCR de moldes completos. Productos de PCR de 14 ensayos virales con sus respectivos iniciadores (260 nM) y moldes (10^6 copias/reacción), con una T_m de 56 °C. **A)** Productos de los 12 ensayos de virus de RNA con moldes generados a partir de los moldes “duales”, separados en un gel de acrilamida al 10%. **B)** Productos de los 2 ensayos de los virus de DNA a partir de moldes sintéticos completos, separados en un gel de agarosa al 3%. Debajo de ambos paneles se muestran los controles negativos de las reacciones (sin moldes).

Para los ensayos con los 2 virus de DNA (AdV y BoV) no fue necesario realizar las estrategias de moldes “recortados” y “duales”, ya que se obtuvo directamente el molde completo por síntesis química, gracias a que ninguna de estas secuencias virales a amplificar rebasaba las 120 bases (90 y 106 bases). Estos moldes fueron usados como controles positivos en ensayos posteriores (**figura 14b**).

7.3 Amplificación de moldes sintéticos con juegos múltiples de iniciadores

Una vez que se obtuvieron los productos esperados en las reacciones de PCR se procedió a combinar los iniciadores Fw y Rv de los distintos ensayos virales de acuerdo a los sets establecidos: 4plex-A, 4plex-B, 4plex-C y 2plex-D. Con estas combinaciones se llevaron a cabo reacciones de PCR para amplificar cada uno de los moldes sintéticos por separado (**figura 15a**). Así mismo se ensamblaron reacciones con los sets 4plex-A, 4plex-B y 4plex-C para amplificar simultáneamente dos blancos en el mismo tubo de reacción. A pesar de que se pudieron observar los dos fragmentos esperados con las combinaciones del set 4plex-A, en las combinaciones de los sets 4plex-B y 4plex-C sólo se amplificó uno de los blancos (**figura 15b**).

Con la mezcla de iniciadores del set 2plex-D se amplificaron los moldes sintéticos de AdV y BoV por separado y simultáneamente. Así mismo se probaron mezclas con distintas concentraciones de los iniciadores, observándose bandas con intensidad similar, cuando se colocaron 530 nM de iniciadores FW y RV de AdV, con 2600 nM de FW y RV para BoV (**figura 15c**).

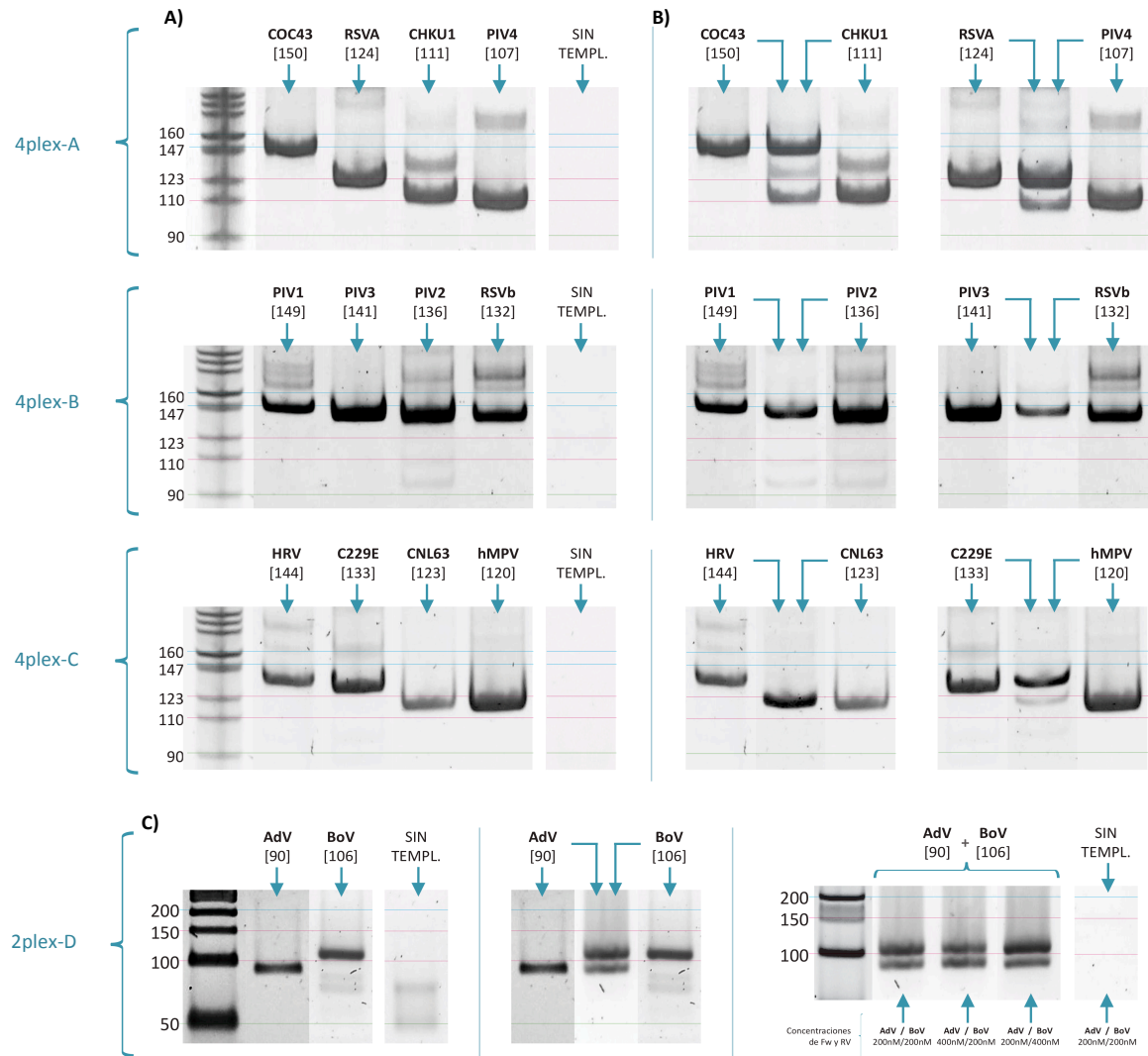


Figura 15. PCR de moldes sintéticos con mezclas de iniciadores. A) Productos de PCR utilizando mezclas de iniciadores (260 nM de cada uno) y colocando un molde sintético por cada uno de los cuatro ensayos que componen un set (10^6 copias/reacción), se empleó una T_m de 56°C . **B)** Amplificación simultánea de dos moldes sintéticos en la misma reacción utilizando las mezclas de iniciadores. **C)** Amplificación por separado y simultánea de dos moldes sintéticos de virus de DNA utilizando la mezcla de sus iniciadores, y variando las concentraciones de los mismos.

7.4 Detección de moldes sintéticos por PCR múltiple en tiempo real

Una vez obtenida la aproximación en punto final de la amplificación por separado de los moldes sintéticos para los sets 4plex-A, 4plex-B y 4plex-C lo siguiente fue trabajar con las sondas de hidrólisis. Para ello se siguió la misma estrategia con cada una de las sondas por separado. En primer lugar se llevaron a cabo reacciones de qPCR combinando distintas concentraciones de los iniciadores Fw (1000 nM, 500 nM, 250 nM, 125 nM) y Rv (1000 nM, 500 nM, 250 nM, 125 nM),

manteniendo la concentración de la sonda en 250 nM para cada uno de los ensayos virales; en este ensayo se seleccionó la combinación de concentraciones de cada iniciador que produjeron la máxima señal. Enseguida se realizaron reacciones de qPCR, empleando la concentración determinada de los iniciadores, pero esta vez variando la concentración de la sonda (250 nM, 187.5 nM, 125 nM, 62.5 nM); con este ensayo se buscó optimizar la cantidad de sonda empleada con la menor pérdida de señal. En la **tabla 7** se resumen las concentraciones seleccionadas de cada iniciador y de cada sonda.

Tabla 7. Concentraciones de iniciadores y sondas elegidas para los ensayos de qRT-PCR múltiple.

Set	Virus	Concentración Fw [nM]	Concentración Rv [nM]	Concentración Sonda [nM]
4p-A	RSV-A	250	500	125.0
4p-A	PIV-4	250	500	125.0
4p-A	CoV-OC43	500	1000	187.5
4p-A	CoV-HKU1	250	500	187.5
4p-B	PIV-1	250	500	125.0
4p-B	RSV-B	250	500	187.5
4p-B	PIV-2	500	500	125.0
4p-B	PIV-3	250	500	187.5
4p-C	CoV-229E	250	500	125.0
4p-C	CoV-NL63	500	250	187.5
4p-C	HRV	1000	1000	187.5
4p-C	hMPV	1000	500	187.5

Ya establecidas las concentraciones de los iniciadores Fw y Rv y las sondas, para realizar las reacciones de PCR en tiempo real de cada uno de los 12 ensayos de virus de RNA por separado, el siguiente paso fue combinar los cuatro ensayos que componen cada set, para emplearlos en un mismo tubo y amplificar los moldes sintéticos por separado, y simultáneamente (**figura 15**). Posteriormente se realizó un ensayo donde se emplearon por duplicado distintas concentraciones de molde sintético para cada ensayo viral (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 100 y 10 copias/reacción) y se determinó la Ct de cada concentración, obteniendo de este modo curvas de cuantificación para cada ensayo (**figura 16a**). Estas curvas se comportaron de manera lineal cuando se grafican los valores de la Ct con el logaritmo de las concentraciones, lo que permitió calcular la eficiencia de las reacciones de PCR con los valores de las pendientes de las curvas obtenidas, en este caso un valor más cercano a -3.32, indica una eficiencia de PCR óptima (**figura 16b**). Las curvas de cuantificación de cada ensayo por separado se pueden encontrar en el **Anexo 4**.

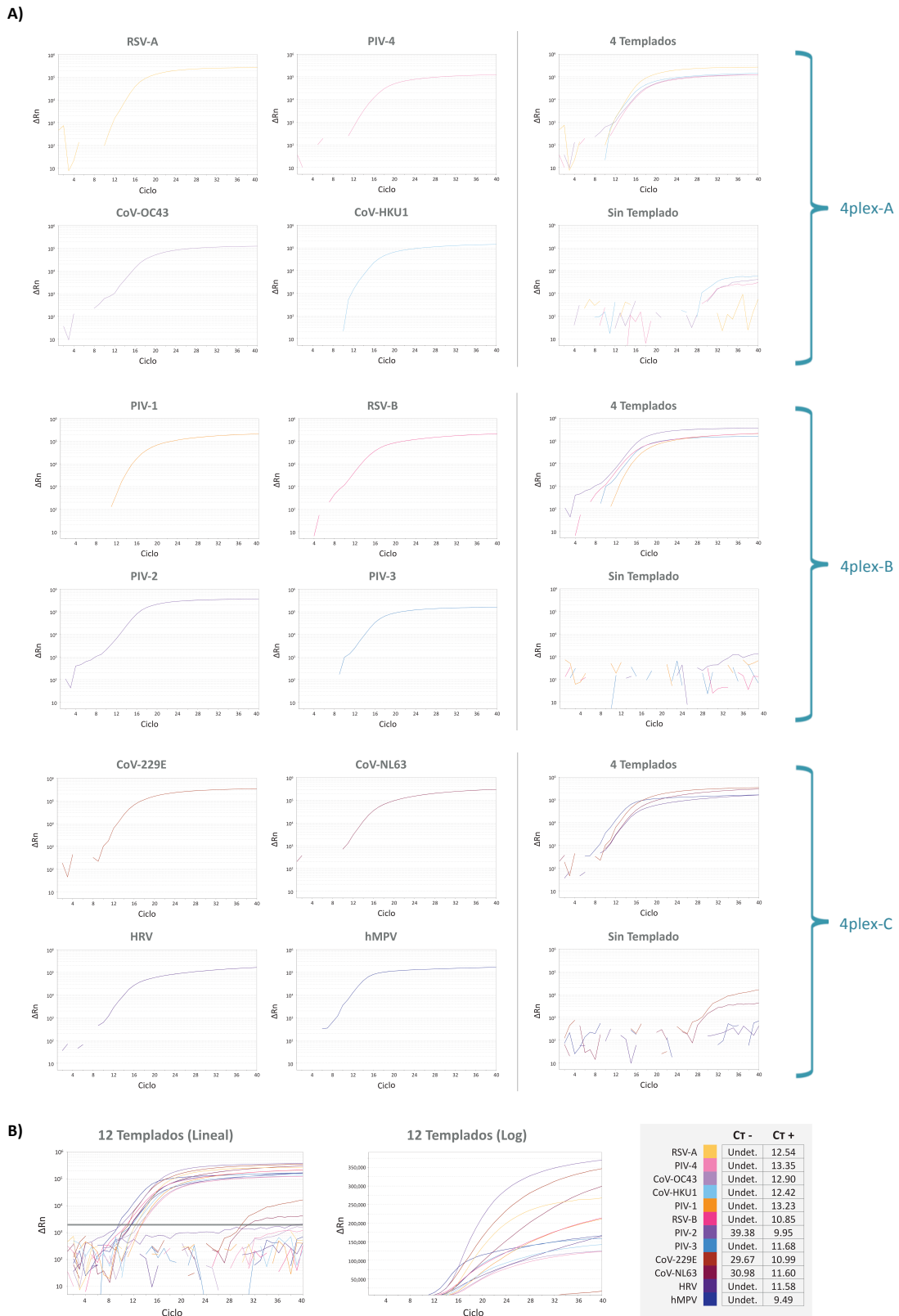


Figura 16. Amplificación de moldes sintéticos en tiempo real con mezclas de iniciadores. A) Curvas de amplificación de moldes sintéticos (10^7 copias) por separado, utilizando los sets de iniciadores 4plex-A, 4plex-B y 4plex-C. B) curvas de amplificación en escala logarítmica y lineal, los valores de Ct se obtuvieron estableciendo un umbral fijo de 2000.

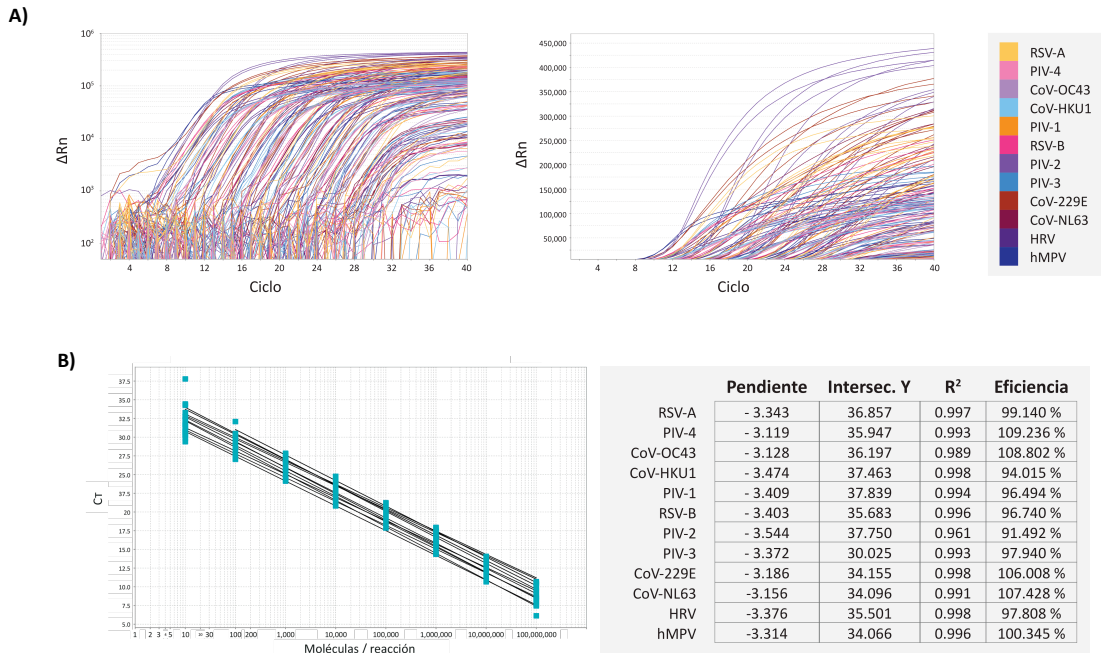


Figura 17. Ensayos de cuantificación. A) Detección de fluorescencia en escala logarítmica y lineal de 12 ensayos virales con concentraciones desde 10 hasta 10^8 copias/reacción en reacciones de qPCR. B) Curvas de regresión de la Ct obtenida con distintas concentraciones de moldes sintéticos, a la derecha se muestran los valores de las rectas para cada ensayo viral, así como la eficiencia de PCR calculada a partir de los valores de las pendientes.

Para el set 2plex-D se mezclaron los iniciadores de AdV y BoV (400 nM y 200 nM respectivamente), y se amplificaron en tiempo real los moldes sintéticos de ambos virus en concentraciones iguales (10^6 copias) por separado y de manera simultánea. Se realizaron ensayos de disociación de los productos amplificados, en los cuales se pudieran visualizar los picos producidos por los moldes sintéticos de AdV y BoV. Los picos se pudieron distinguir claramente cuando se amplifican por separado y de manera simultánea, estos picos se encuentran a temperaturas de alrededor de 80 °C en el caso de AdV y 85 °C para BoV (**figura 18**).

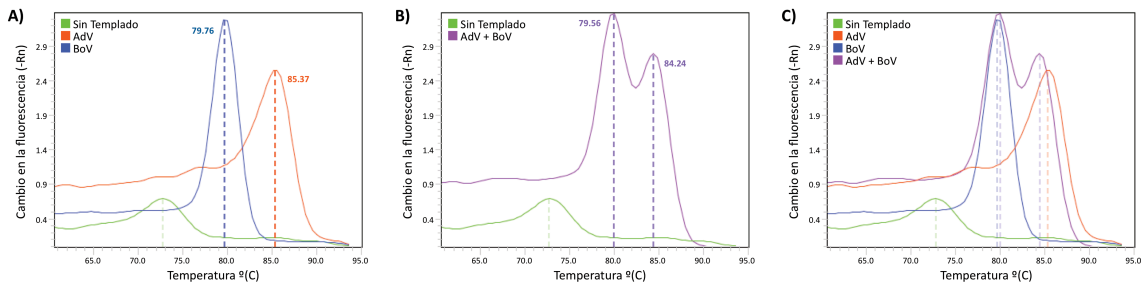


Figura 18. Productos de PCR de AdV y BoV visualizados en curvas de disociación. Picos de disociación de productos de PCR con el set 2plex-D, a partir de moldes sintéticos de de AdV y BoV (10^6 copias/reacción) en: (A) reacciones por separado y (B) en la misma reacción, las curvas de estas reacciones se pueden apreciar juntas en el panel C.

7.5 Detección viral en muestras clínicas por RT-PCR múltiple en tiempo real

Las muestras de RNA obtenido de exudados faríngeos de pacientes con síntomas respiratorios, y que además arrojaron un resultado negativo para algún subtipo de influenza se probaron con los sets 4plex-A, 4plex-B y 4plex-C. Además para corroborar la presencia y la integridad del RNA de cada muestra se realizaron a la par reacciones de RT-PCR para detectar un fragmento del gen *RNAse P* con una sonda doblemente marcada. En la **figura 19** se muestran los resultados obtenidos con las muestras, donde se pueden apreciar los perfiles de amplificación en tiempo real de los controles y de las muestras en escala lineal, los valores de Ct obtenidos para los probables virus positivos en cada caso, así como para el ensayo de *RNAse P*.

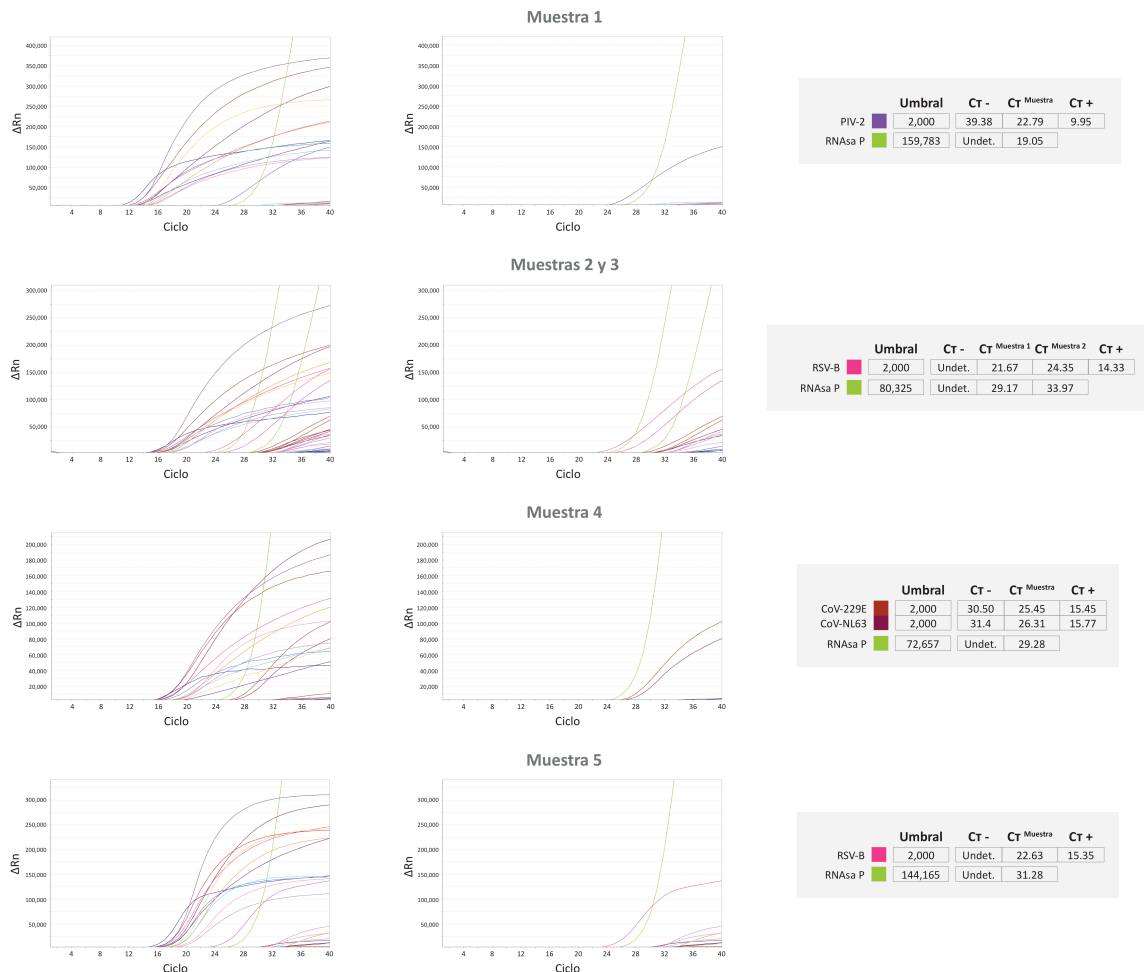


Figura 19. RT-PCR múltiple en tiempo real de muestras clínicas. 5 muestras de RNA de pacientes con síntomas respiratorios fueron probadas con los sets de 12 ensayos virales de RNA en RT-PCR. A la izquierda se pueden ver las curvas de amplificación en escala lineal de los controles y las muestras, al centro las curvas sólo de las muestras, y a la derecha los valores de Ct de los probables positivos y del ensayo de *RNAse P*.

Cuatro muestras de DNA obtenido de pacientes con conjuntivitis se probaron con el ensayo para detectar AdV por PCR punto final, y con el set 2plex-D. En la **figura 20f** se aprecia la amplificación en punto final de AdV en tres de las cuatro muestras de pacientes con conjuntivitis, resultados que coinciden con los obtenidos por el análisis de la curva de disociación de estas mismas muestras probadas posteriormente con el set 2plex-D (**figura 20 a-e**).

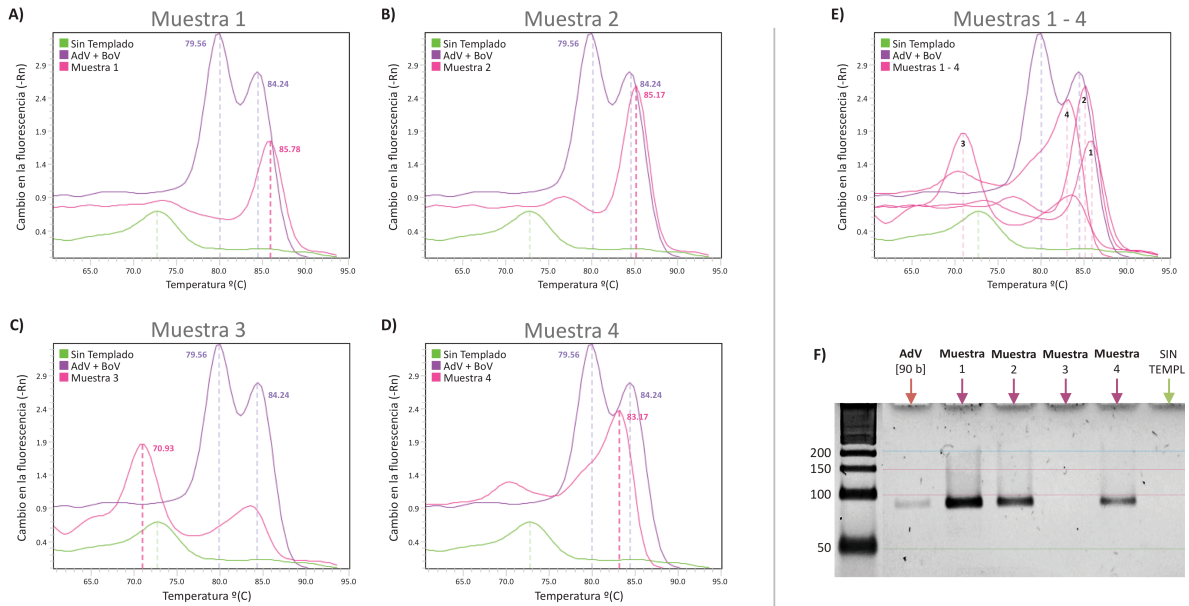


Figura 20. Curvas de disociación de productos de PCR con muestras clínicas. En los paneles A-D se muestran las curvas de disociación producidas por muestras de DNA de pacientes con conjuntivitis amplificadas con el panel 2plex-D en el panel E se muestran las 4 curvas de las muestras juntas. F Productos de PCR de las mismas muestras cuando se amplifican con los iniciadores de AdV separados en un gel de agarosa al 3%.

8. DISCUSIÓN

En este proyecto se hace uso de la técnica de PCR múltiple en tiempo real para detectar en muestras clínicas agentes virales. Uno de los aspectos más importantes cuando se llevan a cabo reacciones de PCR, y que determina en gran medida el rendimiento de las reacciones, es el diseño de los iniciadores que se emplearán para amplificar una región determinada ^[123]. Un buen juego de iniciadores debe cumplir distintos parámetros para asegurar el rendimiento de las reacciones (T_M, tamaño, porcentaje de G' y C's, y formación de dímeros entre otras) ^[83]. Cuando se quiere llevar a cabo reacciones de PCR con mas de un par de iniciadores se debe cuidar además de los parámetros ya mencionados que los pares de iniciadores a combinar no formen dímeros entre ellos y con otros pares, que tengan una T_M similar, y que juntos no amplifiquen productos inespecíficos. Así mismo para llevar a cabo PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis, es fundamental un buen diseño de las mismas, cuidando otros parámetros además de los que requieren los iniciadores (T_M entre 8 y 10 °C por arriba de la T_M de los iniciadores, no debe contener C en el extremo 5', no formar estructuras secundarias considerables a la T_M de los iniciadores) ^[83].

Actualmente se pueden diseñar iniciadores y sondas con ayuda de un gran número de herramientas en línea y de software tanto comercial como libre ^[83]. Estas herramientas nos ayudan a obtener pares de iniciadores que amplifican una determinada región basándose en una secuencia invariable; sin embargo cuando se tiene un gran número de secuencias que pertenecen a distintas cepas del mismo organismo, como en este caso los virus, se debe tener precaución con las secuencias sobre las que se diseñarán los iniciadores y sondas . Los virus respiratorios son organismos con una alta tasa de mutación en sus secuencias, por lo que es necesario buscar regiones altamente conservadas para abarcar la mayor cantidad de cepas y especies de un mismo virus, esto aunado a otras características de los virus que pueden limitar el diseño de iniciadores, como son el alto contenido de bases A's y T's en algunas secuencias virales y el tamaño relativamente pequeño del genoma de algunos virus. Estas complicaciones limitan el uso de herramientas automatizadas para obtener iniciadores y sondas, lo que hace de la búsqueda de iniciadores y sondas para llevar a cabo reacciones de PCR múltiple en tiempo real, un proceso casi artesanal ^[83,113].

Los diseños obtenidos en el presente proyecto (**Tablas 5 y 6**) fueron el resultado de un proceso reiterativo donde se analizaron distintos parámetros al mismo tiempo de los iniciadores y sondas, así como la comparación con las bases de datos de secuencias genómicas humanas y

virales. Con este proceso se buscó encontrar los mejores candidatos para llevar a cabo reacciones múltiples y asegurar en la mayor medida posible la viabilidad de los ensayos, conllevando así a la optimización de tiempo y recursos que permite una PCR múltiple, sin afectar la sensibilidad y especificidad que brinda la técnica de PCR en tiempo real ^[80,84].

Es importante mencionar que aún manejando el consenso de una región conservada de un virus, esto no asegura que las secuencias de los virus que circulan en el ambiente sean detectadas siempre, ya que estas regiones están cambiando a través del tiempo e incluso al momento del diseño de los iniciadores y sondas. Es por ello que es importante una revisión de nuevas secuencias de virus cuando estén disponibles, para poder así mantener actualizados los diseños de iniciadores y sondas, para que sigan cumpliendo con su objetivo que es abarcar la mayor cantidad de variantes de una especie de virus.

Después de obtener los iniciadores y sondas diseñadas, se debe corroborar el rendimiento de las reacciones con los mismos, para ello se planteó el uso de moldes de DNA obtenidos por síntesis química como una estrategia para establecer las condiciones de amplificación. Las ventajas de los moldes sintéticos son varias: por una parte permiten diseñar la secuencia de los moldes, así mismo se puede controlar la cantidad de moléculas empleadas en cada ensayo, permitiendo una aproximación de los resultados esperados con muestras clínicas con distintas cantidades de partículas virales. Un control positivo ideal para estos ensayos virales es aquel que proviene de un espécimen viral que además se encuentra activo en su hospedero, ya que contiene el genoma completo del virus, del hospedero, lo cual nos daría una verdadera aproximación de lo que se puede encontrar en una muestra ^[7]. Sin embargo para poder usar los especímenes virales como controles positivos, se requiere contar con reservas de cada uno de los virus a trabajar con los ensayos diseñados en este proyecto, lo cual es una limitante. Las reservas de estos virus se pueden obtener posteriormente mediante aislamiento viral gracias a la infraestructura del LBS-II, para lo cual los ensayos proporcionados en este proyecto representan una parte importante, ya que identificando el virus se puede seleccionar una línea celular adecuada para su replicación ^[75].

Una vez que se tuvieron las secuencias de los moldes sintéticos de cada ensayo, las cuales abarcaban tamaños desde 90 hasta 150 bases, se presentó una limitante en cuanto a la síntesis química de los moldes. Entre más larga es la cadena de DNA a sintetizar, es más probable obtener productos inespecíficos en la reacción de síntesis química, lo que baja el rendimiento de la síntesis

y la hace menos rentable ^[124]. De modo que para asegurar la correcta síntesis del producto deseado, el tamaño máximo de los moldes debe ser de 120 bases de acuerdo al proveedor.

Para resolver la limitante del tamaño de los moldes sintéticos se plantearon dos estrategias llamadas moldes sintéticos “recortados” y “duales” (**Figura 12**). Los primeros contienen las regiones de los iniciadores y sondas, pero les han sido deletados nucleótidos entre estas regiones para poder obtener moléculas de menor tamaño y que puedan ser sintetizadas sin problema. La ventaja de estos moldes sintéticos “recortados” es que pueden ser cuantificados y utilizados directamente en los ensayos en cantidades iguales, es por ello que se utilizaron para realizar los ensayos de gradientes de temperatura con cada uno de los iniciadores (**anexo 3**) para determinar la T_m óptima de cada uno de ellos, la cual se estableció en 56°C (**figura 13**). Los moldes “duales” una vez completados dan lugar a una molécula de doble cadena que contiene las regiones de los iniciadores y la sonda, del mismo tamaño que un amplificado a partir del genoma viral, empleando los respectivos iniciadores. Para los virus de AdV y BoV solo se contó con los moldes sintéticos completos, ya que al no ser mayores a 120 bases pudieron ser sintetizados sin problemas (**figura 14**).

En las reacciones de PCR en punto final se debe observar una banda única del tamaño esperado cuando los productos se separan por electroforesis, en el caso de los ensayos de PCR en punto final de los virus CoV-229E y PIV-2 se observa una banda de menor tamaño cuando se amplifican los moldes sintéticos; sin embargo la banda de menor tamaño que corresponde al ensayo de CoV-229E aparece aún en los controles negativos, donde se coloca agua en lugar de molde sintético. Esto puede dar indicios de que la banda inespecífica de CoV-229E puede ser un dímero de los iniciadores, lo que explicaría la prevalencia de esta banda aún en ausencia de molde. Mientras que en el ensayo de PIV-2 al no observarse la banda de menor tamaño en el control negativo, ésta podría tratarse de un dímero que se forma cuando se colocan los moldes sintéticos junto con los iniciadores.

Previo a los ensayos en tiempo real para cada par de iniciadores se probaron las combinaciones de los iniciadores en punto final, amplificando por separado los moldes sintéticos de cada virus que incluía el set o la mezcla de iniciadores. Con esto se corroboró que los iniciadores Fw y Rv además de no formar dímeros entre ellos, no formaron dímeros con otros iniciadores o moldes (**figura 15**).

Se observó que cuando se emplean los tres sets de iniciadores para amplificar cada uno de los 12 moldes sintéticos, no aparece ninguna banda inespecífica considerable cuando se separan

los productos de la PCR por electroforesis, así mismo los controles sin moldes sintéticos no muestran ningún producto, lo que indica que al menos por separado los sets de iniciadores pueden amplificar de manera específica cada uno de los virus.

Adicionalmente se llevaron a cabo ensayos adicionando dos moldes en una sola reacción, lo cual produjo las bandas esperadas para las reacciones con los sets 4plex-A y 2plex-D, en este último con los únicos dos virus que componen el set AdV y BoV; sin embargo para los sets 4plex-B y 4plex-C, sólo se obtuvo una banda cuando se adicionaron los moldes, lo que implica que alguno de los productos acapara la reacción. Una estrategia para nivelar la competencia de los iniciadores por los recursos de la reacción consiste en colocar distintas concentraciones de iniciadores de acuerdo a que tan propensos son para acaparar la reacción, colocando menor cantidad de estos iniciadores ^[125]. Otra estrategia interesante es el uso de oligonucleótidos de cebado dual (DPO's), tecnología bajo patente que permitiría amplificar hasta 6 blancos en una sola reacción de PCR de manera específica, con la cual se han generado ensayos de punto final para la detección de virus respiratorios ^[126,127]. La estrategia de variar las concentraciones de iniciadores se realizó en ensayos de PCR punto final para el set 2plex-D, lo que permitió igualar la intensidad de las bandas obtenidas cuando se usan los iniciadores en concentraciones 530 nM para AdV y 260 para BoV, tal como se muestra en la **figura 15c**. En el caso de los sets 4plex-A, 4plex-B y 4plex-C, los ensayos de PCR punto final solo se realizaron con concentraciones equimolares de los iniciadores (260 nM), estas concentraciones no se variaron para estos sets debido a la gran cantidad de recursos y tiempo que se podrían requerir para lograr obtener 4 bandas simultáneamente mediante PCR punto final.

Por otra parte los ensayos de PCR en punto final con los sets de iniciadores en concentraciones equimolares, brindan una primera aproximación de como se comportarían las reacciones con los sets de iniciadores cuando se presente alguno de los virus por separado, así como cuando no se presenta ninguno. Tal como se puede observar en la **figura 15a**, se obtuvieron los productos esperados con cada uno de los moldes sintéticos, así como ningún producto para los controles negativos, resultado suficiente para continuar con los ensayos en tiempo real y optimizar entonces la amplificación de más de dos blancos simultáneamente.

Las sondas de hidrólisis permiten el monitoreo en tiempo real de la amplificación de un blanco, con la ventaja de que son específicas para el blanco en cuestión, de modo que los productos inespecíficos en una reacción no son detectados ^[83]. Así mismo distintos fluoróforos se

pueden detectar en distintos canales, lo que permite combinar distintos blancos, en este caso hasta 4 blancos con el equipo ABI 7500, y analizarlos a la vez. Para optimizar en tiempo real la amplificación de múltiples blancos en la misma reacción de los sets 4plex-A, 4plex-B y 4plex-C; lo primero fue optimizar las concentraciones de iniciadores y sondas para obtener la máxima señal en cada ensayo por separado (**Tabla 7**).

Las combinaciones de los iniciadores y sondas se realizaron de acuerdo a estas concentraciones determinadas, y se lograron amplificar los moldes sintéticos por separado, tal como en las reacciones de punto final, aunque con esta técnica se lograron amplificar sin problema los cuatro moldes sintéticos de cada set de manera simultánea, tal como se puede apreciar en la **figura 16a**. Los controles negativos de estos ensayos múltiples mostraron en algunos casos una ligera señal de fluorescencia en los últimos ciclos de las reacciones, así que para establecer la significancia de estas amplificaciones se analizaron los valores de CT que se obtienen con un umbral común para todos los ensayos con un valor de 2000 (**figura 16b**). Para este umbral los controles positivos que consisten en 10^7 copias/reacción tienen valores de CT entre 9.49 y 13.35, mientras que en la mayoría de los controles negativos este valor no se puede determinar, ya que el ΔRn nunca sobrepasa el umbral, excepto en los ensayos de PIV-2, CoV-229E y CoV-NL63 donde se obtuvieron valores de CT de 39.38, 29.67 y 30.98 respectivamente. Los dos primeros ensayos (PIV-2, CoV-229E) corresponden con aquellos que mostraron bandas inespecíficas en los ensayos de punto final, de modo que este hecho explicaría en parte la aparición de señal en los últimos ciclos, ya que se ha reportado que los dímeros conllevan a la aparición de señal en los últimos ciclos de reacciones con sondas de hidrólisis^[128]. A pesar de esto el valor de CT del ensayo del control negativo PIV-2 no es significativo, pues se encuentra en un valor demasiado elevado, lo que concuerda con los ensayos de punto final, ya que en este ensayo desaparece la banda inespecífica cuando no se encuentra el molde.

Sin embargo los valores de CT de los controles negativos de CoV-229E y CoV-NL63 son de consideración, el primero de ellos como ya se mencionó, se puede explicar por la formación de un dímero, el cual se puede visualizar en punto final cuando no se agrega molde a la reacción individual de CoV-229E, y que desaparece en los controles negativos de las reacciones con el set 4plex-C en punto final. La explicación a este hecho puede hallarse en que los ensayos de PCR en tiempo real conllevan una mayor sensibilidad y podrían estar detectando dímeros o productos inespecíficos que no se detectan con ensayos de PCR punto final^[129]. De este modo los dímeros de CoV-229E que desaparecen al combinar los iniciadores en punto final, pudieran no estarlo

haciendo del todo, y es esta pequeña cantidad la que produce el aumento de señal en los ensayos de tiempo real; mientras que para el caso del de CoV-NL63, algún dímero o producto inespecífico que se forma al mezclar los iniciadores podría ser el que produzca la señal de este ensayo, además de que esta en una concentración tan baja que no es posible detectar este producto o dímero por ensayos de PCR punto final.

Una de las principales ventajas de la PCR en tiempo real es que permite la cuantificación del material amplificado en relación a los valores de Ct que producen distintas cantidades de copias iniciales en la reacción. De acuerdo a la teoría el logaritmo del número de copias iniciales guarda una relación inversamente proporcional a los valores de Ct que producen^[130]. De este modo cuándo se conoce el número de moléculas que se colocan en una reacción se puede generar una curva estándar llevando a cabo reacciones con distinto número de moléculas iniciales (**figura 17a**). Se recomienda que para generar una curva estándar las distintas concentraciones en las reacciones abarquen al menos 5 órdenes de magnitud, y que las reacciones de una concentración se encuentren al menos por duplicado^[83]. Estas curvas son un método de cuantificación directa, ya que se puede estimar la concentración de moléculas iniciales en una muestra, interpolando el valor de la Ct en la curva, siempre y cuando se encuentre dentro del rango dinámico, el cual es el intervalo de moléculas iniciales donde la curva estándar tiene un comportamiento lineal^[128]. Un valor importante que se puede obtener a partir de una curva de cuantificación, es la eficiencia de la reacción de PCR, que nos refleja la capacidad de un ensayo para duplicar en cada ciclo el número de moléculas; teóricamente cada 3.32 ciclos se obtienen 10 copias a partir de una, por lo que al graficar el logaritmo de la concentración de moléculas contra la Ct, un valor cercano a -3.32 indica una eficiencia del 100 %^[128]. En las curvas de cuantificación realizadas se observó un rango dinámico entre 10^7 y en algunos casos hasta 10 copias/reacción, manteniendo una desviación estándar por encima de 0.99, y con valores de eficiencia entre 90 y 110 % (**figura 17b**), parámetros aceptables para ensayos con buena especificidad y sensibilidad^[131,132].

Como alternativa al uso de sondas para detectar la amplificación de productos están los colorantes intercalantes, con la desventaja de que son inespecíficos, pues se unen indiscriminadamente a moléculas de DNA de doble cadena y entonces emiten fluorescencia. Por otra parte es precisamente esta propiedad la que nos permite realizar análisis de disociación, en donde podemos detectar los distintos productos de una reacción de acuerdo a la temperatura a la que estos pasan de doble cadena a cadena sencilla, gracias a los cambios de fluorescencia que se presentan^[133]. En teoría se pueden distinguir en una curva de disociación productos de doble

cadena con T_m distinta, así que se aprovechó esta propiedad para detectar la presencia de los virus que componen el set 2plex-D, amplificándolos en presencia del intercalante SYBR, y posteriormente analizando sus productos en una curva de disociación ^[61]. Teóricamente la T_m de los amplicones esperados de AdV fue de 79.1 °C y para los amplicones de BoV de 82.3 °C; valores calculados con el algoritmo básico de la herramienta en línea OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html#helpMW>). Una vez que se realizaron los ensayos de disociación de estos virus, empleando el set de iniciadores 2plex-D que amplifica ambos, se encontró que los amplicones de AdV generan un pico de disociación a 85.37 °C cuando se amplifica el molde sintético de este virus, mientras que los amplicones del molde de BoV muestran un pico a 79.76 °C (**Figura 18a**). Cuando se amplifican los moldes sintéticos de ambos virus simultáneamente se generan dos picos en la curva a 79.56 y 84.24 °C, que corresponden a los picos generados por estos virus cuando se amplifican por separado (**Figura 18b**). Estos resultados muestran que con este ensayo los amplificados de los dos virus que componen el set 2plex-D pueden ser distinguidos en una curva de disociación de acuerdo a la temperatura a la que se presentan, incluso cuando los dos productos están presentes.

Las muestras de RNA proveniente de pacientes con síntomas respiratorios se probaron con los sets 4plex-A, 4plex-B y 4plex-C, en la **figura 19** se muestran las curvas de amplificación en escala lineal, así como los valores de C_T obtenidos para los probables positivos. Usando estos valores de C_T , junto con los valores de la pendiente y la intersección en Y de las curvas de cuantificación, se puede estimar la concentración aproximada de los virus al inicio de la fase de amplificación mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Moléculas} = 10^{(C_T^{\text{Muestra}} - \text{Intersec. Y} / \text{Pendiente})}$$

Empleando los valores de C_T junto con los valores de las intersecciones en Y y las pendientes mostradas en la **figura 17b** de cada virus que resultó positivo en la anterior ecuación, se encontró que las muestras contenían aproximadamente el siguiente número de moléculas al iniciar la fase de amplificación: Muestra 1, 16,643 moléculas blanco de PIV-2; Muestras 2 y 3, 13,117 y 2,139 moléculas respectivamente de blanco de RSV-B; Muestra 4, 540 moléculas blanco de CoV-229E y 293 moléculas blanco de CoV-NL63; Muestra 5, 6,851 moléculas blanco de RSV-B.

Este número de moléculas es el que se encuentra antes de la fase de amplificación, y por lo tanto al término del paso de retrotranscripción, lo cual muestra la importancia crucial de este paso para el rendimiento total de los ensayos. En la muestra 4 se detecta la presencia de dos virus (**figura 19**), lo que en aspectos clínicos puede significar la presencia de dos agentes virales, aunque no necesariamente una coinfección. En este caso el virus que se detecta en menor cantidad puede corresponder a un virus que ha infectado en una fase anterior a la que representa los síntomas en el paciente, el cual va en decremento; o en su defecto corresponder a un agente oportunista que empieza a proliferar gracias a la presencia del primer agente. Aunque debe darse importancia al agente que se encuentra en mayor cantidad, debe reportarse la detección significativa de los agentes encontrados, así como la cantidad estimada de los mismos para que se pueda dar la interpretación clínica más adecuada.

El ensayo 2plex-D fue probado con DNA extraído de pacientes con conjuntivitis, esto con el fin de aumentar la posibilidad de detectar AdV, ya que se sabe que es uno de los principales agentes etiológicos de este padecimiento, siendo incluso un agente de carácter nosocomial^[134]. En total 4 muestras fueron amplificadas con el set 2plex-D, y los productos amplificados fueron analizados en curvas de disociación, junto con los controles de AdV y BoV. Las muestras 1, 2 y 4 mostraron picos de disociación a 85.78, 85.17 y 83.17 °C respectivamente; estas temperaturas se aproximan a los 84.24 °C que corresponden a la temperatura de disociación del control de AdV (**figura 20a, b y d**). Así mismo la muestra 3 generó un pico a la temperatura de 70.93 °C que no concuerda con ninguno de los picos de referencia (**figura 20c**). A partir de estos resultados se puede concluir que en las muestras 1, 2 y 4 se encuentra presente AdV o parte de su genoma, por lo que es un posible agente causal de conjuntivitis en los pacientes de los cuales provienen las muestras; mientras que en la muestra 3 no se encuentra el fragmento esperado, por lo que es poco probable que el virus este presente (**figura 20e**). En un ensayo previo realizado con los iniciadores de AdV en puto final se probaron estas mismas muestras, generando fragmentos del tamaño esperado para AdV (90 pb) en las muestras 1, 2 y 4; mientras que en la muestra 3 no se observó ninguna banda (**figura 20f**). Estos ensayos muestran que los amplicones de AdV a partir de las muestras clínicas que se visualizan por electroforesis, en efecto generan picos de disociación con una temperatura cercana a los 84.24 ° del control de AdV.

La técnica de PCR múltiple en tiempo real tiene una alta sensibilidad en comparación con otras técnicas, por lo que puede detectar más virus en distintas etapas de infección ya sean agudas o incipientes e incluso infecciones pasadas. Aunque el riesgo de falsos positivos incrementa con el

número de pruebas manejadas, el manejo de un control interno disminuye este riesgo, y ayuda a elucidar casos donde se inhibe la reacción ^[116]. A pesar de la sensibilidad de esta técnica, es muy baja la probabilidad de que un resultado positivo se deba a remanentes de ácidos nucleicos de virus de anteriores infecciones, por lo general los virus que sean detectados estarán presentes, aunque la relevancia clínica de los mismos puede depender de la fase de infección en la que se encuentren, si están presentes de manera individual o en coinfección con otros agentes ^[80].

Este panel de detección de virus respiratorios por RT-PCR múltiple en tiempo real tiene por una parte la finalidad de ayudar a rastrear el panorama de las infecciones respiratorias, su periodicidad y su prevalencia con base en muestras clínicas que puedan ser obtenidas de manera rápida y sometiéndose a la detección de virus con este panel de manera rutinaria. Se espera que con base en los resultados de esta detección se obtenga información de los virus en circulación, así como posibles periodos estacionales.

A diferencia del virus de la influenza, los virus que se trabajaron en el presente proyecto no tienen tratamiento o vacuna, sin embargo la importancia práctica de la detección de agentes virales es: la contención de posibles epidemias en unidades de cuidados intensivos para prevenir la propagación del agente causal ^[135], la disminución del uso excesivo e innecesario de tratamientos con antibióticos ^[120], y la prevención de las complicaciones de por vida como el asma que pueden dejar infecciones agudas con algunos agentes como el HRV en niños ^[11,80].

9. CONCLUSIONES

A partir de las secuencias virales fue posible diseñar un sistema de RT-PCR múltiple viable, con ayuda de diversas herramientas para el diseño y análisis de iniciadores y sondas. La obtención de iniciadores y sondas viables fue un proceso reiterado que implicó el análisis de distintos parámetros para aumentar la viabilidad de los experimentos, sin embargo un diseño que cumple todos los parámetros no necesariamente implica que no se presenten contratiempos en la parte experimental.

Los ensayos múltiples en punto final permitieron detectar por electroforesis los amplificadores de los moldes sintéticos por separado, sin embargo los ensayos múltiples en tiempo real permitieron además detectar los moldes sintéticos de manera simultánea, y dar un estimado de la cantidad de moléculas que se detectaron.

Para los sets de RT-PCR múltiple con sondas de hidrólisis para la detección de 12 virus respiratorios de RNA (HRV, RSV-A, RSV-B, hMPV, PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4, CoV-OC43, CoV-229E, CoV-NL63, CoV-HKU1) el rango dinámico para la cuantificación abarca 6 logaritmos, desde 10^2 hasta 10^7 copias iniciales en el paso de amplificación, y logrando eficiencias de PCR entre 90 y 110 % que se consideran aceptables para ensayos de cuantificación. Los análisis de las curvas de disociación del set de PCR-múltiple para detectar 2 virus respiratorios de DNA (AdV y BoV) permitieron diferenciar los productos de los dos moldes sintéticos de estos virus de manera simultánea.

Los sets que componen este sistema fueron probados con muestras clínicas y arrojaron resultados positivos, que demuestran la capacidad de este sistema de RT-PCR múltiple en tiempo real para la detección de virus respiratorios.

10. PERSPECTIVAS

El presente proyecto proporciona un sistema de detección múltiple de virus respiratorios que permitirá completar el diagnóstico de enfermedades respiratorias. Se espera que este sistema contribuya a la comprensión de la epidemiología de las infecciones respiratorias virales y proporcione una gran cantidad de nueva información sobre la estacionalidad, la distribución geográfica y los grupos de riesgo.

Para complementar la capacidad de este sistema de detección pueden considerarse los virus pandémicos como son: CoV-SARS, CoV-MERS e Influenza aviar; ya sea con ensayos ya reportados o diseñando ensayos para la detección de estos virus pandémicos.

Finalmente se espera que el presente proyecto sea la base para incorporar nuevas tecnologías, que proporcionen alternativas rentables para el diagnóstico viral y extender la aplicación a otros tipos de patógenos con tecnología generada en nuestro país.

11. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología. Influenza, documento técnico (monografía en internet). Febrero 2014.
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/lineamientos/influenza/documento_tecnico_influenza.pdf
- [2]. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología. Información Epidemiológica de Morbilidad Anuario 2011 (anuario). Septiembre 2012.
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/ver_ejecutiva_2011.pdf
- [3] Bloom, B., Jones, L. I. & Freeman, G. Summary health statistics for U.S. children: National Health Interview Survey, 2012. *Vital Health Stat.* 10. 1–81 (2013).
- [4] Shay, D. K. et al. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA* 282, 1440–6 (1999).
- [5] Templeton, K. E. Why diagnose respiratory viral infection? *J. Clin. Virol.* 40 Suppl 1, S2–S4 (2007).
- [6] Pozzetto, B., Grattard, F. & Pillet, S. Multiplex PCR theranostics of severe respiratory infections. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 8, 251–253 (2010).
- [7] Mahony, J. B. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 716–747 (2008).
- [8] Mahony, J. B. The clinical need for the RVP test. *Respir. viral diagnostics - Pathog. challenges Solut. Introd. xTAGTM Respir. viral panel.* 40, S36–S38 (2007).
- [9] Talbot, H. K. & Falsey, A. R. The Diagnosis of Viral Respiratory Disease in Older Adults. *Clin. Infect. Dis.* 2, 747–751 (2010).
- [10] 1. Regamey, N. et al. Viral Aetiology of Acute Respiratory Infections With Cough in Infancy. *Pediatr. Infect. Dis. J. PAP*, 60–64 (2008).
- [11] Jartti, T. et al. Serial viral infections in infants with recurrent respiratory illnesses. *Eur. Respir. J.* 32, 314–320 (2008).
- [12] Debiaggi, M., Canducci, F., Ceresola, E. R. & Clementi, M. The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children. *Virol. J.* 9, 247 (2012).
- [13] Cavallin, F., Zanardo, V., Doglioni, N. & Trevisanuto, D. Infection with multiple viruses is not associated with increased disease severity in children with bronchiolitis. *Pediatr. Pulmonol.* 48, 624 (2013).
- [14] Honkinen, M., Lahti, E., Österback, R., Ruuskanen, O. & Waris, M. Viruses and bacteria in sputum samples of children with community-acquired pneumonia. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 300–7 (2012).
- [15] Mahony, J. B. Nucleic acid amplification-based diagnosis of respiratory virus infections. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 8, 1273–92 (2010).

- [16] Carman, W. F. & Mahony, J. B. The pathogens. *Respir. viral diagnostics - Pathog. challenges Solut. Introd. xTAGTM Respir. viral panel.* 40, S5–S10 (2007).
- [17] Patel, M., Dennis, A., Flutter, C. & Khan, Z. Pandemic (H1N1) 2009 influenza. *Br. J. Anaesth.* 104, 128–142 (2010).
- [18] Atmar RL. Influenza viruses. In: *Manual of Clinical Microbiology (9th Edition)*. Murray PR, El Baron J, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (Eds). ASM Press, Washington, DC, USA, 1340–1351 (2007).
- [19] Beck, E. T. & Henrickson, K. J. Molecular diagnosis of respiratory viruses. *Future Microbiol.* 5, 901–916 (2010).
- [20] Henrickson, K. J. Parainfluenza viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 242–64 (2003).
- [21] Denny, F. W., Murphy, T. F., Clyde, W. A., Collier, A. M. & Henderson, F. W. Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics* 71, 871–6 (1983).
- [22] Gravenstein, S. et al. Surveillance for respiratory illness in long-term care settings: detection of illness using a prospective research technique. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* 1, 122–8 (2000).
- [23] Hall, C. B. et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N. Engl. J. Med.* 360, 588–98 (2009).
- [24] Hall, C. B. et al. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J. Infect. Dis.* 162, 1283–90 (1990).
- [25] Martinello, R. A., Chen, M. D., Weibel, C. & Kahn, J. S. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J. Infect. Dis.* 186, 839–42 (2002).
- [26] Sato, M. et al. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J. Clin. Microbiol.* 43, 36–40 (2005).
- [27] Ostlund, M. R. et al. Molecular epidemiology and genetic variability of respiratory syncytial virus (RSV) in Stockholm, 2002–2003. *J. Med. Virol.* 80, 159–67 (2008).
- [28] van den Hoogen, B. G., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. A. M. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* 295, 119–32 (2002).
- [29] van den Hoogen, B. G. et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* 7, 719–24 (2001).
- [30] van den Hoogen, B. G. et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J. Infect. Dis.* 188, 1571–7 (2003).
- [31] Kaida, A. et al. Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City, Japan. *J. Clin. Virol.* 35, 394–9 (2006).
- [32] Boivin, G. et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J. Infect. Dis.* 186, 1330–4 (2002).

- [33] Peret, T. C. T. et al. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J. Infect. Dis.* 185, 1660–3 (2002).
- [34] Tang YW, Crowe JE Jr. Respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller A (Eds). ASM Press, Washington, DC, USA, 1361–1377 (2007).
- [35] von Linstow, M.-L. et al. Excretion patterns of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus among young children. *Eur. J. Med. Res.* 11, 329–35 (2006).
- [36] Mullins, J. A. et al. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 700–5 (2004).
- [37] Arden, K. E. & Mackay, I. M. Newly identified human rhinoviruses: molecular methods heat up the cold viruses. *Rev. Med. Virol.* 20, 156–76 (2010).
- [38] Lukashev, A. N. Recombination among picornaviruses. *Rev. Med. Virol.* 20, 327–337 (2010).
- [39] Linsuwanon, P. et al. Complete coding sequence characterization and comparative analysis of the putative novel human rhinovirus (HRV) species C and B. *Virol. J.* 8, 5 (2011).
- [40] Gerna, G. et al. Correlation of rhinovirus load in the respiratory tract and clinical symptoms in hospitalized immunocompetent and immunocompromised patients. *J. Med. Virol.* 81, 1498–507 (2009).
- [41] Peltola, V. et al. Rhinovirus transmission within families with children: incidence of symptomatic and asymptomatic infections. *J. Infect. Dis.* 197, 382–9 (2008).
- [42] Kling, S. et al. Persistence of rhinovirus RNA after asthma exacerbation in children. *Clin. Exp. Allergy* 35, 672–8 (2005).
- [43] Nokso-Koivisto, J. et al. Presence of specific viruses in the middle ear fluids and respiratory secretions of young children with acute otitis media. *J. Med. Virol.* 72, 241–8 (2004).
- [44] Lau, S. K. P. et al. Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3655–64 (2007).
- [45] McErlean, P. et al. Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, human rhinovirus C (HRV C). *PLoS One* 3, e1847 (2008).
- [46] Weigl, J. A. I. et al. Ten years' experience with year-round active surveillance of up to 19 respiratory pathogens in children. *Eur. J. Pediatr.* 166, 957–66 (2007).
- [47] Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Huang, Y. & Yuen, K.-Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 234, 1117–27 (2009).
- [48] Esper, F., Weibel, C., Ferguson, D., Landry, M. L. & Kahn, J. S. Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *J. Infect. Dis.* 191, 492–8 (2005).
- [49] Wenzel, R. P., Hendley, J. O., Davies, J. A. & Gwaltney, J. M. Coronavirus infections in military recruits. Three-year study with coronavirus strains OC43 and 229E. *Am. Rev. Respir. Dis.* 109, 621–4 (1974).

- [50] van der Hoek, L. et al. Human coronavirus NL63 infection is associated with croup. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581, 485–91 (2006).
- [51] Gaunt, E. R., Hardie, A., Claas, E. C. J., Simmonds, P. & Templeton, K. E. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2940–7 (2010).
- [52] Gerna, G. et al. Genetic variability of human coronavirus OC43-, 229E-, and NL63-like strains and their association with lower respiratory tract infections of hospitalized infants and immunocompromised patients. *J. Med. Virol.* 78, 938–49 (2006).
- [53] Rafiefard, F., Yun, Z. & Orvell, C. Epidemiologic characteristics and seasonal distribution of human metapneumovirus infections in five epidemic seasons in Stockholm, Sweden, 2002-2006. *J. Med. Virol.* 80, 1631–8 (2008).
- [54] Fox, J. D. Respiratory virus surveillance and outbreak investigation. *J. Clin. Virol.* 40 Suppl 1, S24–30 (2007).
- [55] Wong, S., Pabbaraju, K., Pang, X. L., Lee, B. E. & Fox, J. D. Detection of a broad range of human adenoviruses in respiratory tract samples using a sensitive multiplex real-time PCR assay. *J. Med. Virol.* 80, 856–65 (2008).
- [56] Schildgen, O. et al. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 291–304, table of contents (2008).
- [57] Allander, T. et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12891–6 (2005).
- [58] 1. Allander, T. et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin. Infect. Dis.* 44, 904–10 (2007).
- [59] Fry, A. M. et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J. Infect. Dis.* 195, 1038–45 (2007).
- [60] Kesebir, D. et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J. Infect. Dis.* 194, 1276–82 (2006).
- [61] Payungporn, S. et al. Detection and discrimination of WU/KI polyomaviruses by real-time PCR with melting curve analysis. *J. Virol. Methods* 153, 70–3 (2008).
- [62] Mueller, A. et al. Polyomaviruses KI and WU in children with respiratory tract infection. *Arch. Virol.* 154, 1605–8 (2009).
- [63] Babakir-Mina, M. et al. Excretion of the novel polyomaviruses KI and WU in the stool of patients with hematological disorders. *J. Med. Virol.* 81, 1668–73 (2009).
- [64] Lindau, C., Tiveljung-Lindell, A., Goh, S., Ramqvist, T. & Allander, T. A single-tube, real-time PCR assay for detection of the two newly characterized human KI and WU polyomaviruses. *J. Clin. Virol.* 44, 24–6 (2009).
- [65] Fryer, J. F. et al. Frequent detection of the parvoviruses, PARV4 and PARV5, in plasma from blood donors and symptomatic individuals. *Transfusion* 47, 1054–61 (2007).

- [66] Jones, M. S. et al. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J. Virol.* 79, 8230–6 (2005).
- [67] Manning, A., Willey, S. J., Bell, J. E. & Simmonds, P. Comparison of tissue distribution, persistence, and molecular epidemiology of parvovirus B19 and novel human parvoviruses PARV4 and human bocavirus. *J. Infect. Dis.* 195, 1345–52 (2007).
- [68] Ginocchio, C. C. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. *J. Clin. Virol.* 40 Suppl 1, S11–4 (2007).
- [69] St George, K. et al. Rapid and sensitive detection of respiratory virus infections for directed antiviral treatment using R-Mix cultures. *J. Clin. Virol.* 24, 107–15 (2002).
- [70] Leland, D. S. & Ginocchio, C. C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 49–78 (2007).
- [71] Spada, B., Biehler, K., Chegas, P., Kaye, J. & Riepenhoff-Talty, M. Comparison of rapid immunofluorescence assay to cell culture isolation for the detection of influenza A and B viruses in nasopharyngeal secretions from infants and children. *J. Virol. Methods* 33, 305–10 (1991).
- [72] Petric, M., Comanor, L. & Petti, C. a. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J. Infect. Dis.* 194 Suppl, S98–S110 (2006).
- [73] Landry, M. L. & Ferguson, D. SimulFluor respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimens by immunofluorescence staining. *J. Clin. Microbiol.* 38, 708–11 (2000).
- [74] Leonardi, G. P. Rapid identification of 2009 H1N1 influenza A virus using fluorescent antibody methods. *Am. J. Clin. Pathol.* 134, 910–4 (2010).
- [75] Chan, K. H. et al. Use of the human colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cell line for isolating respiratory viruses from nasopharyngeal aspirates. *J. Med. Virol.* 85, 874–879 (2013).
- [76] Minnich, L. L. & Ray, C. G. Early testing of cell cultures for detection of hemadsorbing viruses. *J. Clin. Microbiol.* 25, 421–2 (1987).
- [77] Dunn, J. J., Woolstenhulme, R. D., Langer, J. & Carroll, K. C. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J. Clin. Microbiol.* 42, 79–82 (2004).
- [78] Barenfanger, J. et al. R-Mix cells are faster, at least as sensitive and marginally more costly than conventional cell lines for the detection of respiratory viruses. *J. Clin. Virol.* 22, 101–10 (2001).
- [79] Fong, C. K., Lee, M. K. & Griffith, B. P. Evaluation of R-Mix FreshCells in shell vials for detection of respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4660–2 (2000).
- [80] Jartti, T., Söderlund-Venermo, M., Hedman, K., Ruuskanen, O. & Mäkelä, M. J. New molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract infections in children. *Paediatr. Respir. Rev.* 14, 38–45 (2013).
- [81] Mahony, J. et al. Development of a sensitive loop-mediated isothermal amplification assay that provides specimen-to-result diagnosis of respiratory syncytial virus infection in 30 minutes. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2696–701 (2013).

- [82] Bawage, S. S., Tiwari, P. M., Pillai, S., Dennis, V. & Singh, S. R. Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. *Adv. Virol.* 2013, 1–26 (2013).
- [83] Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–93 (2000).
- [84] Mahony, J. B. et al. Cost analysis of multiplex PCR testing for diagnosing respiratory virus infections. *J Clin Microbiol* 47, 2812–2817 (2009).
- [85] Heller, M. J. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4, 129–53 (2002).
- [86] Chiu, C. Y. et al. Utility of DNA microarrays for detection of viruses in acute respiratory tract infections in children. *J. Pediatr.* 153, 76–83 (2008).
- [87] Greninger, A. L. et al. A metagenomic analysis of pandemic influenza A (2009 H1N1) infection in patients from North America. *PLoS One* 5, e13381 (2010).
- [88] Siuzdak, G. Probing viruses with mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 33, 203–11 (1998).
- [89] Bothner, B. & Siuzdak, G. Electrospray ionization of a whole virus: analyzing mass, structure, and viability. *Chembiochem* 5, 258–60 (2004).
- [90] Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207 (2003).
- [91] Ho, Y.-P. & Reddy, P. M. Identification of pathogens by mass spectrometry. *Clin. Chem.* 56, 525–36 (2010).
- [92] Chou, T.-C., Hsu, W., Wang, C.-H., Chen, Y.-J. & Fang, J.-M. Rapid and specific influenza virus detection by functionalized magnetic nanoparticles and mass spectrometry. *J. Nanobiotechnology* 9, 52 (2011).
- [93] Yao, Z.-P., Demirev, P. A. & Fenselau, C. Mass spectrometry-based proteolytic mapping for rapid virus identification. *Anal. Chem.* 74, 2529–34 (2002).
- [94] Sampath, R. et al. Comprehensive biothreat cluster identification by PCR/electrospray-ionization mass spectrometry. *PLoS One* 7, e36528 (2012).
- [95] Sampath, R. et al. Rapid identification of emerging infectious agents using PCR and electrospray ionization mass spectrometry. *Biol. Emerg. Viruses Sars, Avian Hum. Infl. Metapneumovirus, Nipah, West Nile, Ross River Virus* 1102, 109–120 (2007).
- [96] Niemeyer, C. M., Adler, M. & Wacker, R. Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *Trends Biotechnol.* 23, 208–16 (2005).
- [97] Perez, J. W., Vargis, E. A., Russ, P. K., Haselton, F. R. & Wright, D. W. Detection of respiratory syncytial virus using nanoparticle amplified immuno-polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 410, 141–8 (2011).
- [98] Santangelo, P. J., Nix, B., Tsourkas, A. & Bao, G. Dual FRET molecular beacons for mRNA detection in living cells. *Nucleic Acids Res.* 32, e57 (2004).
- [99] Jayagopal, A., Halfpenny, K. C., Perez, J. W. & Wright, D. W. Hairpin DNA-functionalized gold colloids for the imaging of mRNA in live cells. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 9789–96 (2010).

- [100] Chattopadhyay, P. K. et al. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. *Nat. Med.* 12, 972–7 (2006).
- [101] Tripp, R. A. et al. Bioconjugated nanoparticle detection of respiratory syncytial virus infection. *Int. J. Nanomedicine* 2, 117–24 (2007).
- [102] Alby, K., Popowitch, E. B. & Miller, M. B. Comparative evaluation of the Nanosphere Verigene RV+ assay and the Simplexa Flu A/B & RSV kit for detection of influenza and respiratory syncytial viruses. *J. Clin. Microbiol.* 51, 352–3 (2013).
- [103] Jannetto, P. J. et al. Real-time detection of influenza a, influenza B, and respiratory syncytial virus a and B in respiratory specimens by use of nanoparticle probes. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3997–4002 (2010).
- [104] Thaxton, C. S., Georganopoulou, D. G. & Mirkin, C. A. Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. *Clin. Chim. Acta.* 363, 120–6 (2006).
- [105] Demirel, M. C. et al. Bio-organism sensing via surface enhanced Raman spectroscopy on controlled metal/polymer nanostructured substrates. *Biointerphases* 4, 35–41 (2009).
- [106] Hudson, S. D. & Chumanov, G. Bioanalytical applications of SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy). *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 679–86 (2009).
- [107] Liu, H. et al. Single molecule detection from a large-scale SERS-active Au₇₉Ag₂₁ substrate. *Sci. Rep.* 1, 112 (2011).
- [108] Benevides, J. M., Overman, S. A. & Thomas, G. J. Raman, polarized Raman and ultraviolet resonance Raman spectroscopy of nucleic acids and their complexes. *J. Raman Spectrosc.* 36, 279–299 (2005).
- [109] Hennigan, S. L. et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated and true clinical throat swab specimens by nanorod array-surface-enhanced Raman spectroscopy. *PLoS One* 5, e13633 (2010).
- [110] Driskell, J. D. et al. Rapid and sensitive detection of rotavirus molecular signatures using surface enhanced Raman spectroscopy. *PLoS One* 5, e10222 (2010).
- [111] Shanmukh, S. et al. Identification and classification of respiratory syncytial virus (RSV) strains by surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate statistical techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1551–5 (2008).
- [112] Mahony, J. B., Petrich, A. & Smieja, M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 48, 217–249 (2011).
- [113] Gunson, R. N., Bennett, S., Maclean, A. & Carman, W. F. Using multiplex real time PCR in order to streamline a routine diagnostic service. *J. Clin. Virol.* 43, 372–5 (2008).
- [114] Woo, P. C., Chiu, S. S., Seto, W. H. & Peiris, M. Cost-effectiveness of rapid diagnosis of viral respiratory tract infections in pediatric patients. *J Clin Microbiol* 35, 1579–1581 (1997).
- [115] Gharabaghi, F., Hawan, a., Drews, S. J. & Richardson, S. E. Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1900–1906 (2011).
- [116] Wu, W. & Tang, Y.-W. Emerging molecular assays for detection and characterization of respiratory viruses. *Clin. Lab. Med.* 29, 673–93 (2009).

- [117] Caliendo, A. M. Multiplex PCR and Emerging Technologies for the Detection of Respiratory Pathogens. *Clin. Infect. Dis.* 52, S326–S330 (2011).
- [118] Dabisch-Ruthe, M., Vollmer, T., Adams, O., Knabbe, C. & Dreier, J. Comparison of three multiplex PCR assays for the detection of respiratory viral infections: evaluation of xTAG respiratory virus panel fast assay, RespiFinder 19 assay and RespiFinder SMART 22 assay. *BMC Infect. Dis.* 12, 163 (2012).
- [119] Olofsson, S., Brittain-Long, R., Andersson, L. M., Westin, J. & Lindh, M. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 9, 615–26 (2011).
- [120] Brittain-Long, R., Westin, J., Olofsson, S., Lindh, M. & Andersson, L.-M. Access to a polymerase chain reaction assay method targeting 13 respiratory viruses can reduce antibiotics: a randomised, controlled trial. *BMC Med.* 9, 44 (2011).
- [121] Crooks, G. E. WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190 (2004).
- [122] Jothikumar, N. et al. Quantitative Real-Time PCR Assays for Detection of Human Adenoviruses and Identification of Serotypes 40 and 41 Quantitative Real-Time PCR Assays for Detection of Human Adenoviruses and Identification of Serotypes 40 and 41. *Appl. Environ. Microbiol.* 6, 3131–6 (2005).
- [123] Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J. & Klapper, P. E. Multiplex PCR : Optimization and Application in Diagnostic Virology Multiplex PCR : Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 559–570 (2000).
- [124] Gilar, M. & Bouvier ESP. Purification of crude DNA oligonucleotides by solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 890, 167–177 (2000).
- [125] Markoulatos, P., Siafakas, N. & Moncany, M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.* 16, 47–51 (2002).
- [126] Kim, S. R., Ki, C.-S. & Lee, N. Y. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *J. Virol. Methods* 156, 111–6 (2009).
- [127] Choudhary, M. L. et al. Development of a multiplex one step RT-PCR that detects eighteen respiratory viruses in clinical specimens and comparison with real time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 189, 15–19 (2013).
- [128] Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. a. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 1, 1559–82 (2006).
- [129] Wong, M. L. & Medrano, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39, 75–85 (2005).
- [130] Kontanis, E. J. & Reed, F. A. Evaluation of Real-Time PCR Amplification Efficiencies to Detect PCR Inhibitors. *J. Forensic Sci.* 51, 795–804 (2006).
- [131] Suslov, O. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic Acids Res.* 33, e181–e181 (2005).
- [132] Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M. & Nguyen, M. A practical approach to RT-qPCR— Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50, S1–S5 (2010).
- [133] Ririe, K. M., Rasmussen, R. P. & Wittwer, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245, 154–60 (1997).

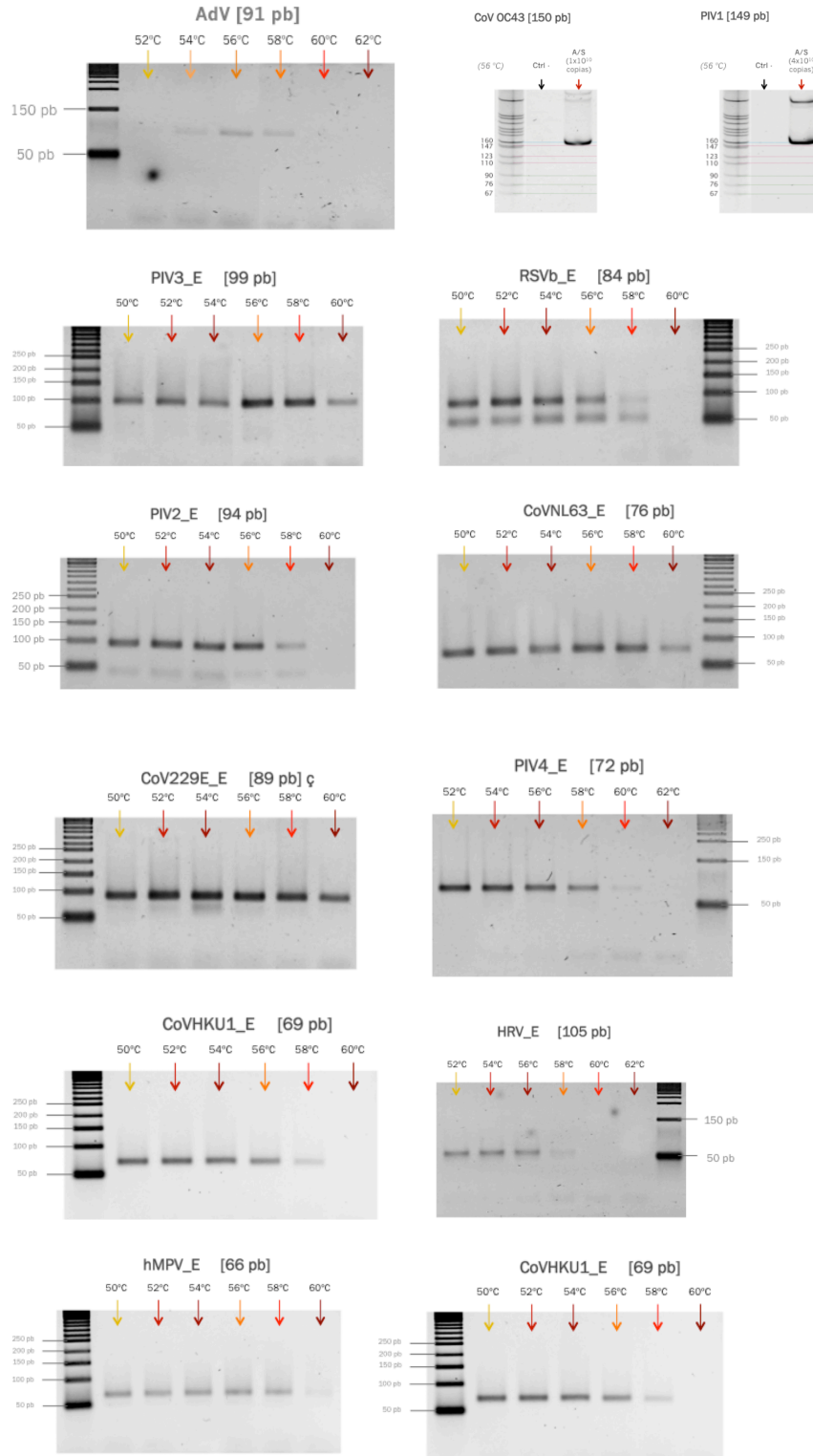
[134] González-López, J. J., Morcillo-Laiz, R. & Muñoz-Negrete, F. J. Adenoviral keratoconjunctivitis: an update. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 88, 108–115 (2013).

[135] Bouvet, D. *et al.* Diagnosis of community-acquired acute respiratory illness: From conventional microbiological methods to molecular detection (multiplex). *Pathol. Biol. (Paris)*. 63, 69–73 (2014).

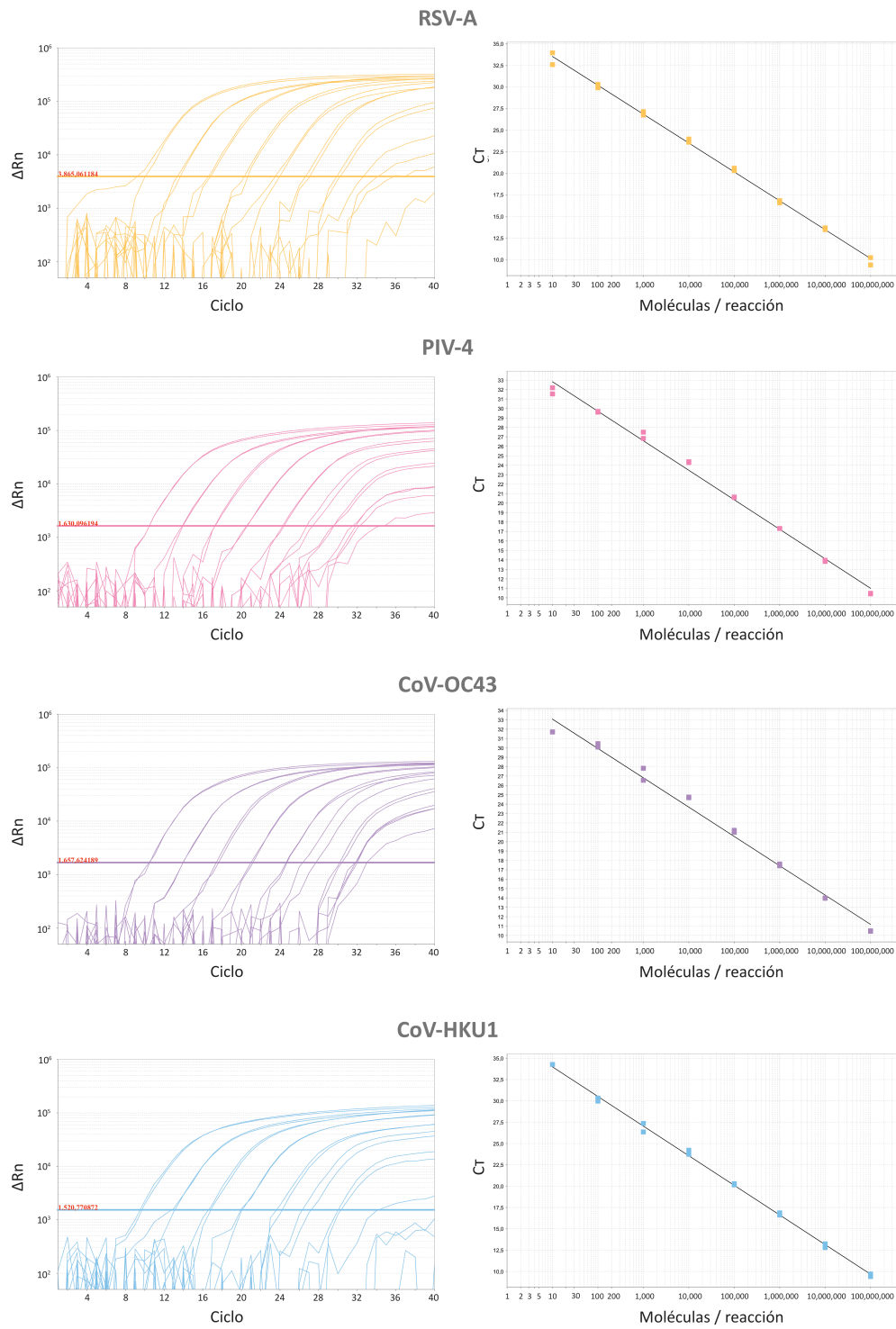
12.2 Secuencias de moldes sintéticos

Coronavirus OC43, Tamaño completo: 150b		Tamaño
Sentido	GTTCTACGAAAGCAATCTGTCTTAATAAGCGTAAGGATTTACGCGTGTACAGGTTGTTGATTCGGGTGGAACA	76
Antisentido	GGTAGTAGAATACGAAAATAACAGTACGGAGTTGACAAGCAACCGCCGTCATGTTATCAGACTGCCTGGCATTGTTCCACCGGCAATC	90
Recortado	GTCTCTACGAAAGCAATCTGTCTTAATAAGCGTAAGGATTTACGGGTGGAACAATGCCAGGCACTGTATAACATGACGGCGGTTGCTTGACACTGTTATTTTCGTAATCTACTACC	119
Parainfluenza virus 1, Tamaño completo: 149b		
Sentido	AGGACTATAAACATACAAAGTTCAGTACAAAGCGGGATCCCAACTACTGTTAAACAAGCAAAGCAGAGATCTCACACAATTAATAG	85
Antisentido	GCATGGTAAATGCAATGGTGTTCGCATATCTGAGCCAATTCCTGCTGTTCATGACTTCTCTATTAATTGTGTGAGATCTCTGC	88
Recortado	AGGACTATAAACATACAAAGTTCAGTACAAAGCGGGAACAATTAATAGAGAAGTCTGCAACAGACAGAAATGGCTCAGATATGCCAACACCATTGCTATTCACCATGC	112
Rhinovirus, Tamaño completo: 144b		
Sentido	TTGGACAAGGTGTGAAGAGCCCGTGTCTATCTTGTAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGTAACTAACCCACAGCCATTG	84
Antisentido	AAAGTAGTCGGTCCATCCCAATTGCTGTTACGACATACACTACTGGATTGTGAGCAATGGCTGTGGGGT	76
Recortado	TTGGACAAGGTGTGAAGAGCCCGTGTCTTGTAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGTAACTAACCCACAGCCATAGCAATTTGGGATGGGACCGACTACTT	105
Parainfluenza virus 3, Tamaño completo: 141b		
Sentido	GTCTGGTCTCCATCTTTGATGAAAACCTCAAAAATAAGATTAATGCCGGACAGGATTATTAGCTATGCC	72
Antisentido	GAGGTGTAAAGCATAAATCAGATCATTTTACTAAGGACGGGGTCTGACACAGCCATCAACAGCTGGTGGCATAAGCTAATAATCCTGGT	90
Recortado	GTCTGGTCTCCATCTTTGATGAAAAGATTATTAGCTATGCCAAGGACTGTTGATGGCTGTGAGAACATAAATGATCTGATTTATGCTTACACCTC	99
Parainfluenza virus 2, Tamaño completo: 136b		
Sentido	GAAGTAGGCTCTATGTTATTGACAATAATTTGATTTATTAACAAGTCTCTCTGGTGGTGCATCGCTTTTTACAGGATCAATACAGA	95
Antisentido	CCCATTGAGCCCTCAATGATAGGAGGAATTCCTTTAGAAAAATCTGATTGATCTGTAAAAAAGC	65
Recortado	GAAGTAGGCTCTATGTTATTGACAATAATCAACGATGTTCTTTGGTGGTGCATCGCTTGAATTCCTCTATCATTGAGGCTCAATGGG	94
Coronavirus 229E, Tamaño completo: 133b		
Sentido	AACGGGTGGATTTGTACCCCAAGCTGCATTTTATTTCTTGGCACAGGACCCCAATAAGATGCAA	66
Antisentido	CCTGTAGGTCAGTTTTAGCACCATCAACAGCAACCCAGACACCTTCAACAGCTCTCTAAATTTGTCATCTTTATGGGGTCC	86
Recortado	AACGGGTGGATTTGTACCCCAAGCTGCATTTTCAAAATTTAGAGAGCGTGTGAAGGTGCTGTGTGGTGTAAAACCTGAACCTACAGG	89
Virus Respiratorio Sincitial B, Tamaño completo: 132b		
Sentido	CAGGACAAGTAATGCTAAGATGGGAGTTTTAGCCAAATCTGAAAAAATCATGCTAGGACATGCTAGTGTCCA	76
Antisentido	CTCTCCCACTTCTGTGCATACTCATAGACTTCCACAACCTGCTCATTTCTGCTTGGACACATGATGTCTC	74
Recortado	CAGGACAAGTAATGCTAAGATGGGAGTTAGCAGAAATGGAGCAAGTTGTGGAAGTCTATGAGTAGCACAGAAGTTGGAGGAG	84
Virus Respiratorio Sincitial A, Tamaño completo: 124b		
Sentido	GCAAAGGCATATGCTGAACAACCTCAAGAAAATGGTGTGATTAACACTACAGTGATT	56
Antisentido	GCTCTACATCATTATCTTTGGATTAAAGCTGATGTTGATAGCCTCTAGTCTTCTGCTGTCAAGTCTAATACACTGATTAATCACACCA	92
Recortado	GCAAAGGCATATGCTGAACAACCTCACTTGCAGCAGAAGAACTAGAGGCTATCAACATCCAAAAGATAATGATGTAGAGC	80
Coronavirus NL63, Tamaño completo: 123b		
Sentido	CTCGTAGCACTTCAAGACAACAGTCTCGCACTCGTTCTGATTCTAACCACTCTTCCAGATCTTGTGGTCTGCT	74
Antisentido	GTGACTTCGACTGGTTATCAAAAACCTAAGTTCTTTAAAGCCAAAGTAACAGCAGCAACAAGATCTGAA	68
Recortado	CTCGTAGCACTTCAAGACAAGTCTCGCACTCGTTCTGATTCTAACCACTCTTCTTTGATAACCACTGGAAGTCA	76
Metapneumovirus, Tamaño completo: 120b		
Sentido	GGTGTGGTCAAACAATGCTGAGGTGGGAGTCACTCGCCAGGTCATCAACAACATAATGTTAGGACATGTATCTGTCCAAAGCTGAG	87
Antisentido	CACTAGGTCATAGACTTCTGTGACTTGTTTAACTCAGCTTGGACAGATACAT	53
Recortado	GGTGTGGTCAAACAATGAGTCTATCGCCAGGTCATCAACAATCACAGAAGTCTATGACCTAGTG	66
Coronavirus HKU1, Tamaño completo: 111b		
Sentido	AGCTCTGTTTTGATAAATCTAAACAATTTGTACCTGTACAGGTTGTTGATCTAGATGG	61
Antisentido	GGCAATGACATGCAACAGATAAAGAAATCTGAGGCAGCTCGTTGTTCCATAGAACTCAACAACCTGTA	73
Recortado	AGCTCTGTTTTGATAAATCTAAACATAGATGGAACAACGAGCGCTGCTTGTTCATGTCAATGGC	69
Parainfluenza virus 4, Tamaño completo: 107b		
Sentido	GATGCTTATTTCAGGTCGAGTATAGTCAATTTAAATGATGGGAAGAA	52
Antisentido	CACACAATACAGTAAACATCCGTCAAGAACAGCAACCACTGAGCAACTCTTTCGATTCTCCCATCATTAAATAGTACT	81
Recortado	GATGCTTATTTCAGGTCGATCGAAGAGTTGCTCAGTGGTGTGACGGATTTACTGATTTGTG	72
Bocavirus, Tamaño completo: 106b		
Completo	GCTCAGGGAATATGAAAGACAAGCATCGCTCTACAAAAGAAAAGGGAGTCCAGAAGAGGGGAGGAAGAGACACTGGCAGACAACCTCATCAGAGCAGGAG	106
Adenovirus 5, Tamaño completo: 91b		
Completo	GCCTCGGAGTACTGAGCCCGGCTGGTGCAGTTTGCCCGGCCACCGAGACGTACTCAGCCTGAATAACAAGTTTAGAAAACCCACGG	91

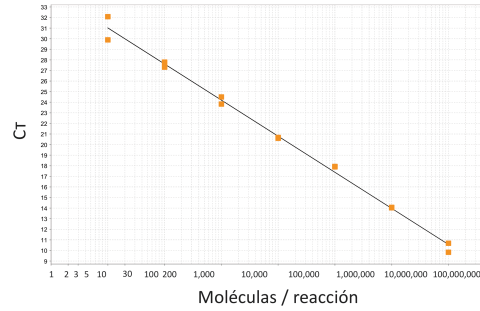
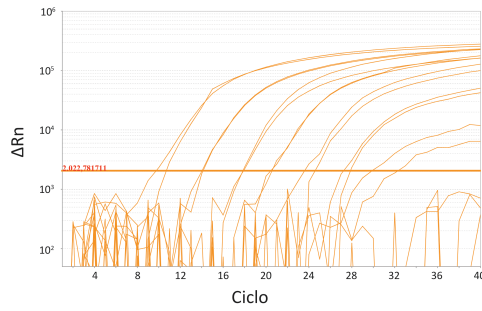
12.3 Gradientes de temperatura



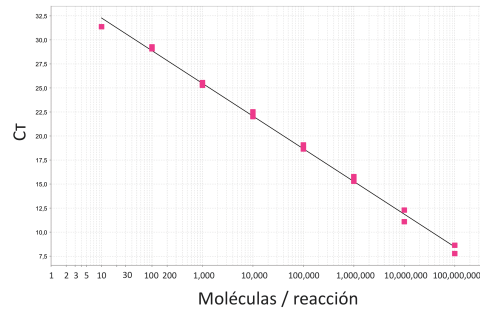
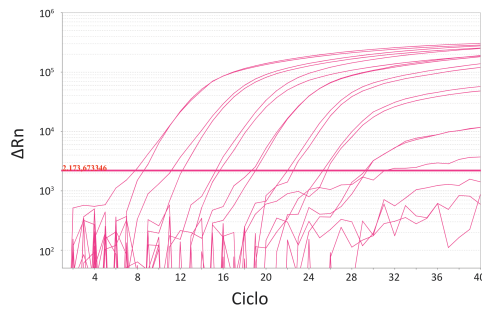
12.4 Curvas de cuantificación



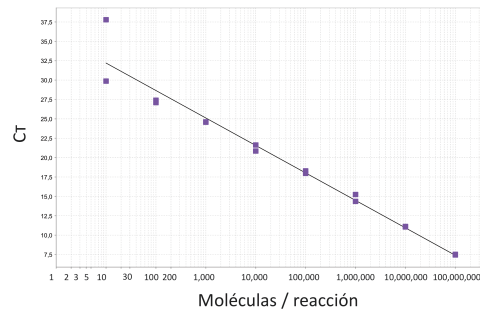
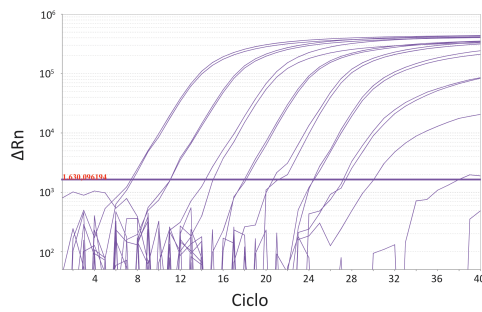
PIV-1



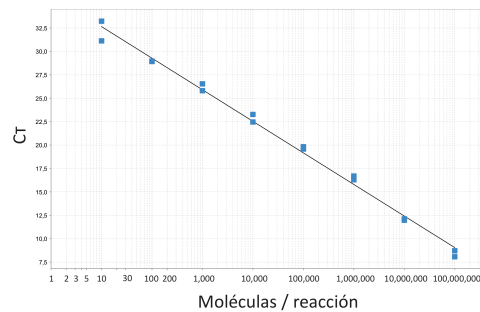
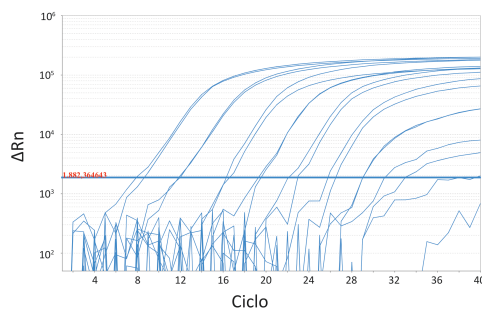
RSV-B



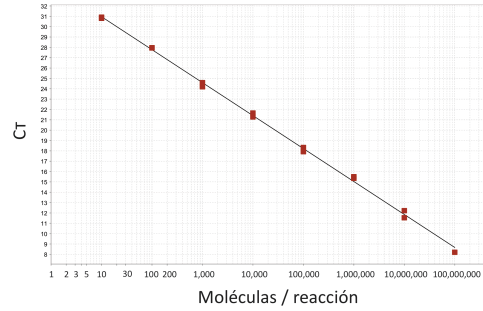
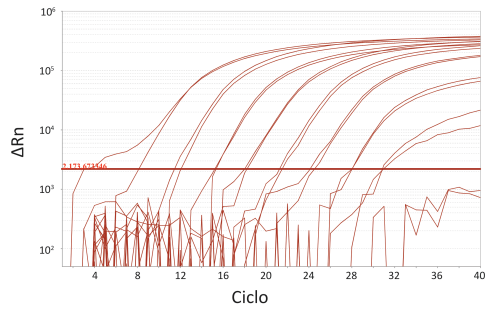
PIV-2



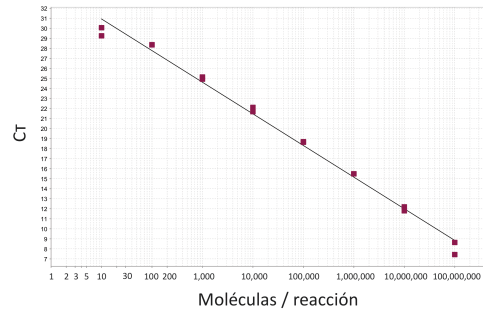
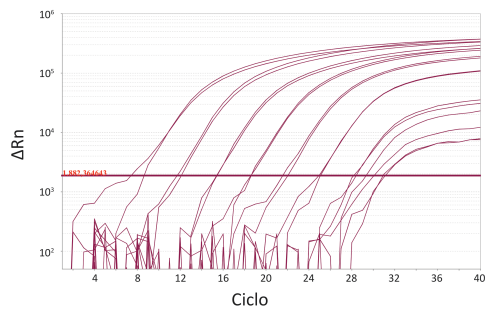
PIV-3



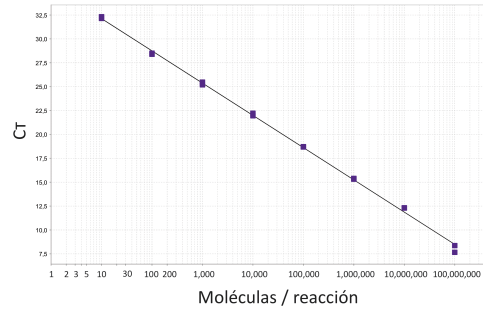
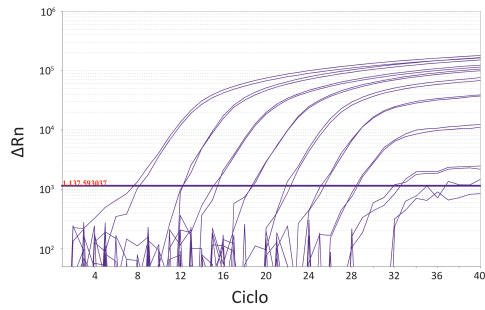
CoV-229E



CoV-NL63



HRV



hMPV

