



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DEL TEMA ESCRITO

Detección e identificación de virus de influenza estacional, A/H1N1 pandémica, así como de diferentes virus respiratorios mediante amplificación múltiple en tiempo real empleando la tecnología de arreglos dinámicos de nanofluidos

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA (N)

Carmen Olivia Orozco Sánchez



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Luz Del Carmen Castellanos Román**

VOCAL: **Profesor: Roció Gabriela Tirado Mendoza**

SECRETARIO: **Profesor: Joel Armando Vázquez Pérez**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Santiago Ávila Ríos**

2° SUPLENTE: **Profesor: Gibran Pérez Montesinos**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (INER), CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS (CIENI).

ASESOR DEL TEMA:

JOEL ARMANDO VÁZQUEZ PÉREZ

SUSTENTANTE (S):

CARMEN OLIVIA OROZCO SÁNCHEZ

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico a Dios por darme la oportunidad de vivir y crecer en una familia maravillosa rodeada de amor.

Con mucho cariño a mi madre que ha estado conmigo en todo momento, siempre dándole lo mejor a sus hijas, creyendo en mí, brindándome todo su amor y apoyo, contribuyendo incondicionalmente para que logre todas mis metas y objetivos. Con este trabajo solo te pago una muy pequeña cantidad de todo lo que me has dado, eres un gran ejemplo para mí por ser tan fuerte, luchadora, inteligente, única y entregada. Espero llegar a ser una mujer como tú.

A mi padre, Raúl Orozco Moreno por impulsarme siempre a ser una mejor persona, exigiéndome siempre a dar lo mejor de mí.

A mi abuelita, Alicia Sánchez Rojero por enseñarme el gran amor a la vida, el valor de la familia y el seguir luchando a pesar de las adversidades.

A mi hermana, Karla Lizette Orozco Sánchez por darme la oportunidad de ser tía y por ser una gran madre, hija y hermana.

Le dedico esta tesis a mi sobrino Carlos, por ser un niño que tiene mucha curiosidad de aprender cosas diferentes todos los días, dándole gracias a Dios por dejarme compartir mi vida a lado de este niño maravilloso.

A mis tíos: Gerardo, Irma, Sergio, Pepe, Licha, Bere y Ricardo por siempre contar con su apoyo, su amor y su ejemplo siendo unas personas fundamentales en mi educación y formación personal. Fui bendecida con 7 tíos que siempre me consintieron, creyeron en mí como lo haría cualquier otro padre y enseñándome lo más bonito de la vida. Espero algún día poderles pagar todo lo que me han dado.

A mis primos: Jessi, Mariana, Lalo, Pao, Karen, Ale, Diego, Yaretzi e Iván que son otros hermanos para mí.

A mis amigos: Belém, Uriel, Luis Antonio y Anita por compartir tantas experiencias y crecer juntos, enriqueciendo mi vida.

A mis amigos de la facultad: Mary, Dany y José por ser un apoyo en este camino.

Al Doctor Joel Vázquez Pérez por darme la oportunidad de lograr mi meta, con sus enseñanzas. Gracias por creer en mí y compartir conmigo sus conocimientos.

A Damaris por sus enseñanzas en el laboratorio, por su tiempo, su paciencia y amistad que me ha brindado.

Al Doctor Gustavo Reyes-Terán por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente en un lugar donde lo más importante es el ser humano.

A Víctor, Loana y a todo el equipo del CIENI por contar siempre con su apoyo.

El presente trabajo de tesis fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), clave de proyecto 141849.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1

2. ANTECEDENTES 4

2.1. Infecciones Respiratorias Agudas. 4

2.1.1. Bronquiolitis. 4

2.1.2. Asma 4

2.1.3. Neumonía 5

2.2. Virus Respiratorios 5

2.2.1. Paramyxoviridae 5

2.2.1.1. Clasificación

2.2.1.2. Características generales

2.2.1.3. Genoma

2.2.1.4. Características clínicas

2.2.1.5. Tendencias Estadísticas

2.2.2. Adenovirus 10

2.2.2.1. Clasificación

2.2.2.2. Características Generales

2.2.2.3. Genoma

2.2.2.4. Características clínicas

2.2.2.5. Tendencias estadísticas

2.2.3. Picornavirus 12

2.2.3.1. Clasificación

2.2.3.2. Características

2.2.3.3. Genoma

2.2.3.4. Características clínicas

2.2.4. Coronavirus	14
2.2.4.1. Clasificación	
2.2.4.2. Características	
2.2.4.3. Genoma	
2.2.4.4. Características clínicas	
2.2.5. Bocavirus	16
2.2.5.1. Clasificación	
2.2.5.2. Características	
2.2.5.3. Genoma	
2.2.5.4. Características clínicas	
2.2.6. Influenza	18
2.2.6.1. Clasificación	
2.2.6.2. Características	
2.2.6.3. Genoma	
2.2.6.4. Características clínicas	
2.2.6.5. Tendencias Estadísticas	
2.2.7. Hantavirus	22
2.2.7.1. Clasificación	
2.2.7.2. Características	
2.2.7.3. Genoma	
2.2.7.4. Características clínicas	
2.3. Tratamientos	24
2.4. Replicación de Virus Respiratorios	25
2.4.1. Adhesión	25
2.4.2. Penetración	26

2.4.2.1.	<i>Ingreso de los virus envueltos</i>	
2.4.2.2.	<i>Ingreso de virus desnudos</i>	
2.4.3.	<i>Desnudamiento</i>	27
2.4.4.	<i>Replicación viral</i>	27
2.4.4.1.	<i>Virus de DNA de Doble cadena (dsDNA)</i>	
2.4.4.2.	<i>Virus de DNA de una sola cadena (ssDNA)</i>	
2.4.4.3.	<i>Virus de RNA</i>	
2.4.4.4.	<i>Virus de RNA de doble cadena (dsRNA)</i>	
2.4.4.5.	<i>Virus de RNA de una sola cadena en sentido positivo (ssRNA+)</i>	
2.4.4.6.	<i>Virus de RNA de una cadena en sentido negativo (ssRNA-)</i>	
2.4.5.	<i>Ensamblaje</i>	32
2.4.6.	<i>Maduración</i>	33
2.4.7.	<i>Liberación</i>	33
2.5.	<i>Diagnóstico de enfermedades Infecciosas Respiratorias Agudas.</i>	33
2.5.1.	<i>Pruebas de diagnóstico de virus respiratorios no moleculares</i>	34
2.5.2.	<i>Pruebas de diagnóstico de virus respiratorios moleculares</i>	35
2.5.2.1.	<i>Diagnóstico de virus respiratorios mediante Luminex xTAG (TmBioscience, Toronto Canada).</i>	
2.5.2.2.	<i>Anuplex™ II (Seegene).</i>	
2.5.2.3.	<i>Nanofluidos</i>	
3.	<i>JUSTIFICACIÓN</i>	41
4.	<i>OBJETIVOS</i>	42

4.1.	<i>Objetivo General</i>	42
4.2.	<i>Objetivos Particulares</i>	42
5.	HIPÓTESIS	43
6.	MATERIALES Y METODOLOGÍA	44
6.1.	<i>Diseño de iniciadores</i>	44
6.2.	<i>Muestras clínicas</i>	44
6.3.	<i>Extracción de ácidos nucleicos</i>	45
6.3.1.	<i>Extracción de ácidos nucleicos de forma manual con el kit de QIAGEN QIAmp® MinElute® Virus Spin.</i>	45
6.3.2.	<i>Extracción de ácidos nucleicos de forma automatizada por Magna Pure LC® Total Nucleic Acid Isolation (Hoffmann-La Roche).</i>	45
6.4.	<i>Estandarización de condiciones de amplificación.</i>	46
6.4.1.	<i>Preparación de iniciadores</i>	46
6.4.2.	<i>Controles</i>	46
6.4.3.	<i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	47
6.5.	<i>Estandarización de condiciones para la amplificación múltiples en el equipo de nanofluidos fluidigm (Biomark, USA).</i>	47
6.5.1.	<i>Pre-amplificación de las muestras clínicas con el kit One Step RT-PCR (QIAGEN, USA).</i>	47
6.6.	<i>Estandarización de iniciadores con la mezcla de reacción TaqMan Gene Expression Master Mix (AppliedBiosystems, USA) y EvaGreen.</i>	48
6.7.	<i>Estandarización en el equipo Fluidigm Biomark™ (San, Francisco, USA).</i>	49
6.7.1.	<i>Detección de virus respiratorios utilizando la mezcla de reacción 2X TaqMan Gene Expression Master Mix.</i>	49
6.7.1.1.	<i>Preparación de muestras.</i>	
6.7.1.2.	<i>Preparación de ensayos.</i>	

6.7.1.3.	<i>Inyectar el fluido control (control line fluid).</i>	
6.7.1.4.	<i>Colocar las muestras y los ensayos en el chip.</i>	
6.7.2.	<i>Amplificación de virus respiratorios utilizando la mezcla de reacción SSoFast™ EvaGreen Supermix with Low Rox (BioRad) y con tratamiento de Exonucleasa.</i>	53
6.7.2.1.	<i>Preparación de muestras</i>	
6.7.2.2.	<i>Preparación de ensayos</i>	
6.7.3.	<i>Amplificación de virus respiratorios utilizando la mezcla de reacción SSoFast™ EvaGreen Supermix with Low Rox (BioRad) y sin tratamiento de Exonucleasa.</i>	54
6.7.3.1.	<i>Preparación de las muestras.</i>	
6.7.3.2.	<i>Preparación de ensayos.</i>	
6.8.	<i>Pruebas de sensibilidad del equipo Fluidigm Biomark.</i>	56
6.9.	<i>Prueba de especificidad del equipo Fluidigm Biomark.</i>	56
6.10.	<i>Secuenciación.</i>	57
6.10.1.	<i>Condiciones de secuenciación con la mezcla de reacción Big Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems).</i>	
6.10.2.	<i>Purificación de la reacción de secuencia.</i>	
6.10.3.	<i>Obtención y análisis de secuencias.</i>	
6.11.	<i>Diagnóstico de 16 virus respiratorios por Anyplex™ II (Seegene).</i>	58
7.	RESULTADOS	60
7.1.	<i>Estudios Bioinformáticos.</i>	61
7.2.	<i>Estandarización y asignación de la mejor combinación de iniciadores para cada subtipo y tipo de los diferentes virus respiratorios empleando RT-PCR en tiempo real.</i>	63
7.2.1.	<i>Estandarización de iniciadores con el kit de RT-PCR One Step QIAGEN®.</i>	63

7.2.2.	<i>Estandarización de las condiciones de amplificación con la mezcla de reacción TaqMan® gene Expression Master Mix (Applied Biosystems).</i>	65
7.3.	<i>Estandarización y asignación de las mejores condiciones de amplificación de los diferentes virus respiratorios empleando RT-PCR en tiempo real con el equipo Fluidigm (Biomark).</i>	67
7.3.1.	<i>Amplificación de virus respiratorios utilizando la mezcla de reacción TaqMan® gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) en el equipo Biomark (Fluidigm).</i>	68
7.3.2.	<i>Amplificación de virus respiratorios utilizando la mezcla de reacción SSoFast™ EvaGreen® Supermix with Low Rox (BioRad) y con tratamiento de Exonuclesa I.</i>	69
7.3.3.	<i>Amplificación de virus respiratorios utilizando la mezcla de reacción SSoFast™ EvaGreen® Supermix with Low Rox (BioRad) sin tratamiento de Exonuclesa I.</i>	71
7.4.	<i>Determinación de especificidad de los iniciadores en el equipo Biomark (Fluidigm).</i>	73
7.5.	<i>Prueba de sensibilidad del equipo Fluidigm.</i>	77
7.6.	<i>Validación de los resultados obtenidos por el equipo Biomark (Fluidigm).</i>	79
7.7.	<i>Evaluación de los resultados para virus respiratorios en un corte de pacientes.</i>	83
7.8.	<i>Comparación y caracterización de muestras positivas por medio de secuenciación.</i>	86
8.	<i>DISCUSIÓN.</i>	89
9.	<i>CONCLUSIONES.</i>	93
10.	<i>BIBLIOGRAFÍA.</i>	94

GLOSARIO

AdV	Adenovirus
BoV	Bocavirus
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
CoV	Coronavirus
DFA	Prueba Directa con anticuerpo fluorescente
dNTP's	Desoxirribonucleotidos trifosfatados
dsDNA	DNA de doble cadena
dsRNA	RNA de doble cadena
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
FHSR	Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal
HN	Hemaglutinina-Neuramidasa
HA	Hemaglutinina
HEV68	Enterovirus 68
HRM	Disociación de DNA de alta resolución
InDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
IRA's	Infecciones Respiratorias Agudas
MGP	Perlas magnéticas
MpV	Metapneumovirus
NA	Neuraminidasa
NAC	Neumonía Adquirida en la comunidad
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnología
nm	nanómetros
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína no estructural uno
nt	Nucleótidos
NTR	Regiones no traducidas de longitud variable
ORF	Marcos de lectura abierto
PCR	Reacción en cadena de las polimerasa

PIV	Parainfluenza
RADTs	prueba directa rápida de antígeno
RNAm	RNA mensajero
RT	Retrotranscripción
RV	Rinovirus
SH	Proteína Hidrofóbica pequeña
SPH	Síndrome Pulmonar por Hantavirus
ssDNA	DNA de una sola cadena
ssRNA	RNA de cadena sencilla
Tm	Temperatura de desnaturalización
TSPE	Extendido con Iniciadores Específicos
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VSR	Virus Sincicial Respiratorio
VR	Virus Respiratorios
PVR	Panel de Virus Respiratorio

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA's) son una importante causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, esto incluye todas las infecciones del tracto respiratorio, tanto bacterianas como virales. Las IRA's causan aproximadamente del 20% de las muertes en niños preescolares. Los factores de riesgo incluyen desde desnutrición, bajo peso al nacer, ser fumadores pasivos, un nivel socioeconómico bajo, inmunodeficiencias como infección por VIH. En el 2005 en Estados Unidos de Norteamérica, aproximadamente un cuarto del total de las hospitalizaciones de niños menores de 15 años fueron por enfermedades respiratorias. De este porcentaje el 31% se diagnosticaron con neumonía, el 25% con asma y el 25 % con bronquiolitis y bronquitis y el 19% fueron otras enfermedades respiratorias. (CDC)

En nuestro país en el año 2009 surgió un nuevo subtipo de influenza, dando lugar a una pandemia y en ese momento no se contaba con las herramientas necesarias, para dar un diagnóstico rápido. Esta pandemia fue causada por una nueva variante de influenza, pero muchos otros virus son también los causantes de las infecciones respiratorias agudas; entre ellos se encuentran aproximadamente 200 virus, que pertenecen a las familias *Paramyxoviridae*, *Adenoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Picornaviridae* y *Parvoviridae*. Manifestándose con cuadros clínicos desde un catarro común, tos, hasta neumonías, bronquiolitis y exacerba las crisis asmáticas. De tal manera que es fundamental encontrar el agente etiológico de la enfermedad para un mejor manejo del paciente. Así el médico podrá tomar la mejor decisión terapéutica y tener control sobre los brotes epidémicos anuales oportunamente. Los virus respiratorios tanto estacionales como pandémicos representan un problema de salud a nivel mundial.

En la actualidad existen muchas técnicas para el diagnóstico de virus como por ejemplo: el aislamiento en cultivo celular que resulta ser demasiado tardío; la detección de antígenos, que por tratarse de cuadros clínicos muy agudos resultan inadecuadas además presentan baja sensibilidad y especificidad. Las metodologías más recientes en la detección de microorganismos son mediante la amplificación de ácidos nucleicos, mejor conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cuando se trata de virus que su genoma está compuesto por RNA, se tiene que integrar un paso previo de transcripción reversa (RT-PCR), como por ejemplo en los virus de influenza y rinovirus, entre otros. Se cuenta con dos variantes de la RT-PCR: en punto final y en tiempo real. Esta última no solo es cualitativa sino cuantitativa, utilizando agentes intercalantes como el Evagreen o sondas marcadas fluorogénicamente (Taqman), reduciendo el tiempo requerido para dar un resultado y aumentando la sensibilidad y especificidad.

También se han implementado ensayos múltiples; esto es que en solo tubo se encuentre varios blancos para detectar; pero la principal limitante en estas técnicas es el número de canales de detección en el aparato analizador. Otra metodología para la detección de varios virus respiratorios, es empleando la citometría de flujo, utilizando tecnología denominada xMAPs, que consiste en una PCR multiplex que origina productos de amplificación marcados con biotina que posteriormente son detectados mediante microesferas marcadas con estreptavidina.

Una de los principales limitantes de todas estas metodologías, es la alta tasa de mutación, que presentan los virus, por tener genomas de RNA y que en co-infección generan nuevos subtipos de virus; como en caso del virus de influenza. Esto es debido a la naturaleza segmentada de su genoma, que puedan dar lugar a combinaciones de segmentos de dos o más virus que infectan la célula del mismo hospedero, estos cambios suceden entre segmentos de RNA homólogos de diferentes cepas virales.

De acuerdo a estos antecedentes en nuestro país es necesario implementar una técnica, donde se puedan diagnosticar virus respiratorios de manera eficaz y certera; por lo que en este trabajo se trata de implementar una nueva metodología que permita la identificación de 48 blancos diferentes con un costo y tiempo reducido, empleando la tecnología de nanofluidos, para su posterior caracterización genómica, por medio de la secuenciación convencional.

1. ANTECEDENTES

2.1. Infecciones Respiratorias Agudas

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son un conjunto de enfermedades, que incluyen desde un simple resfriado, hasta bronquiolitis, otitis aguda, sinusitis, tos, neumonía adquirida de la comunidad, enfermedades pulmonares crónico obstructiva. Muchas de estas enfermedades son causadas por virus.

2.1.1. Bronquiolitis

Es una enfermedad que se presenta en niños menores de 2 años que es caracterizada por una inflamación aguda, edema y necrosis de células epiteliales, incremento de la producción de mucosas, broncoespasmos, sibilancias, hiperexpansión de pulmones e hipoxia. La bronquiolitis causa alrededor de 120,000 hospitalizaciones en infantes menores de un año de edad anualmente. El virus Sincicial Respiratorio es el principal agente etiológico.^{5,6}

2.1.2. Asma

El asma afecta alrededor del 10% en adultos y el 30% en niños a nivel mundial. Se define como un desorden crónico inflamatorio en vías respiratorias. El asma se caracteriza por la obstrucción de las vías respiratorias, que varía considerablemente de manera espontánea y con el tratamiento. En los pacientes asmáticos se observa un tipo de inflamación de las vías respiratorias que las hace más reactivas a diversos elementos desencadenantes que ocasionan reducción excesiva de la luz y disminución de la corriente de aire, con ello la aparición de sibilancias y disnea sintomáticas. La reducción de la luz de las vías respiratorias por lo regular es reversible, pero en algunas personas con asma crónica la obstrucción es irreversible.

Las infecciones víricas son frecuentes como elementos desencadenantes de exacerbaciones asmáticas, pero no hay certeza de que intervengan realmente como agentes causales.²⁰

2.1.3. Neumonía

La neumonía es una infección del parénquima pulmonar. Esta enfermedad, a pesar de ser una causa de morbilidad y mortalidad importante, a menudo se le diagnostica y se trata de modo equivocado y no se valora en su verdadera frecuencia. Se clasifica de forma típica dentro de tres variantes: como una infección adquirida de la comunidad, en un hospital o vinculada con el uso del respirador.

Existen muchos microorganismos causantes de neumonías, incluyen desde bacterias, hongos y virus. Entre los virus recién descubiertos se encuentran los virus de hanta, los metapneumovirus, coronavirus que ocasionan el síndrome respiratorio agudo (SARS) .²⁰

2.2. Virus Respiratorios

Tenemos una diversidad de virus respiratorios muy amplia que afecta al humano como: Virus Sincicial Respiratorio (VSR) A o B, Rinovirus (RV) A B o C, Enterovirus 68, Parainfluenza (PIV) 1 2 3 o 4, Influenza, Adenovirus (AdV) B D E o C, Metapneumovirus (MpV) y los recién descubiertos como Bocavirus (BoV), entre otros.

2.2.1. Paramyxoviridae

2.2.1.1. Clasificación

La familia *Paramyxoviridae* está clasificada en dos subfamilias: la *Paramyxovirinae* y la *Pneumovirinae*. La primera contiene 5 géneros: *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Avulavirus*, *Morbillivirus* y *Henipavirus*, dentro del género de *Respirovirus* se encuentra el virus de Parainfluenza (PIV). A su vez la subfamilia *Pneumovirinae* contiene dos géneros: *Pneumovirus* donde se encuentra el virus sincicial respiratorio (VSR) y *Metapneumovirus* siendo el virus representativo metapneumovirus (MpV). La clasificación es basada en características morfológicas, la organización del genoma y las actividades biológicas de las proteínas.³

2.2.1.2. Características generales

Los Paramyxoviridae contienen una bicapa lipídica que es derivada de la membrana plasmática del hospedero. En general es esférico, con un diámetro de 150 a 350 nm. Adentro de la membrana viral en el núcleo se encuentra la nucleocápside, algunas veces llamada ribonucleoproteína, que contiene de 15,000 a 19,000 nucleótidos de RNA. En la figura No. 1 se muestra el diagrama del virión de Paramyxovirus, en el cual se observa la Hemaglutinin-Neuramidasa (HN) y la glicoproteína de Fusión (F) insertadas en la membrana viral, en forma de tetrámero y trímero respectivamente. La proteína pequeña hidrofóbica (SH) solo se encuentra en ciertos rubulaviruses, como PIV 5. Entre la envoltura y el núcleo se encuentra la proteína viral Matriz (M); la cual es importante en la estructura del virión.³

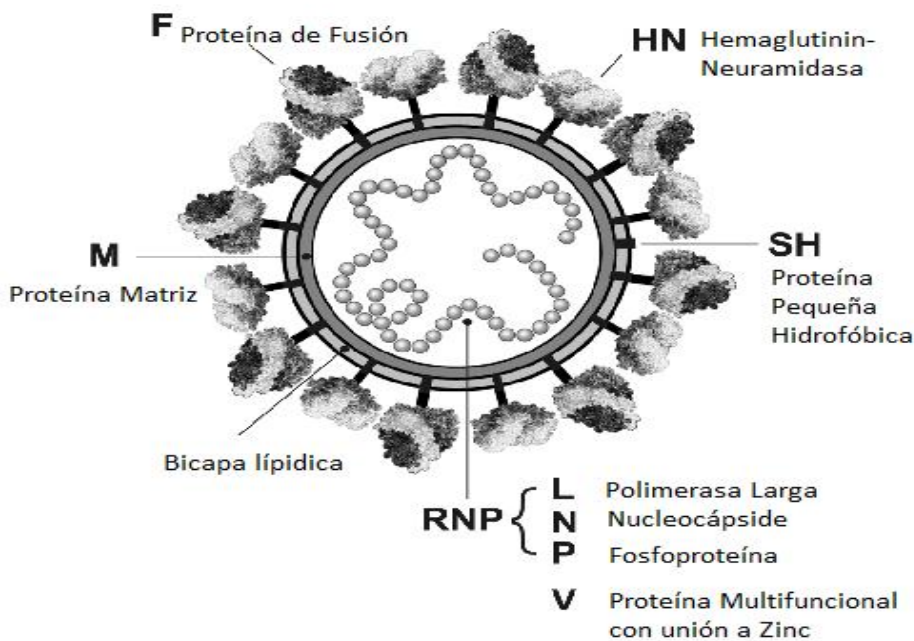


Figura No.1. Diagrama de Paramyxovirus. (HN) Hemaglitin-Neuramidasa, (M) Proteína matriz, (F) Proteína de Fusión, (SH) Proteína Pequeña Hidrofóbica, (L) Polimerasa larga, (N) Nucleocápside, (P) Fosfoproteína y (V) Proteína Multifuncional con unión a Zinc.³

2.2.1.3. Genoma

El genoma de los Paramyxovirus es no segmentado de una sola cadena de RNA con polaridad negativa y se replica en el citoplasma. La longitud de su genoma va desde 15 a 19 Kb y contiene de seis a diez genes. Dentro de la envoltura se encuentra el genoma de RNA, la Nuclueocápside (N), la fosfoproteína (P) y la polimerasa larga (L), las cuales inician la replicación intracelular viral.³

Para el caso de VSR tiene 10 genes que son transcritos secuencialmente en orden de 3' a 5' en mRNAs separados. Cada mRNA contiene un solo marco de lectura, excepto M2, el cual está sobrelapado con M2-L.

El genoma de MpV tiene una longitud de aproximadamente de 13kb, el cual codifica para 9 proteínas en el orden 3-N-PM- F-M2-SH-G-L-5 (figura 2). El gen M2 codifica para dos proteínas; M2-1 y M2-2, sobrelapándose en el marco de lectura, como sucede con el RSV.^{4,9} El genoma también contiene regiones líderes no codificantes 3', la cual tiene el promotor viral. Comparado con VSR, no tiene las 2 proteínas estructurales NS1 y NS2 localizados en la región final de 3' del genoma de VSR (figura 2); la falta de estos genes en MpV podría tener una importancia en la patogenicidad, con respecto a VSR.⁴

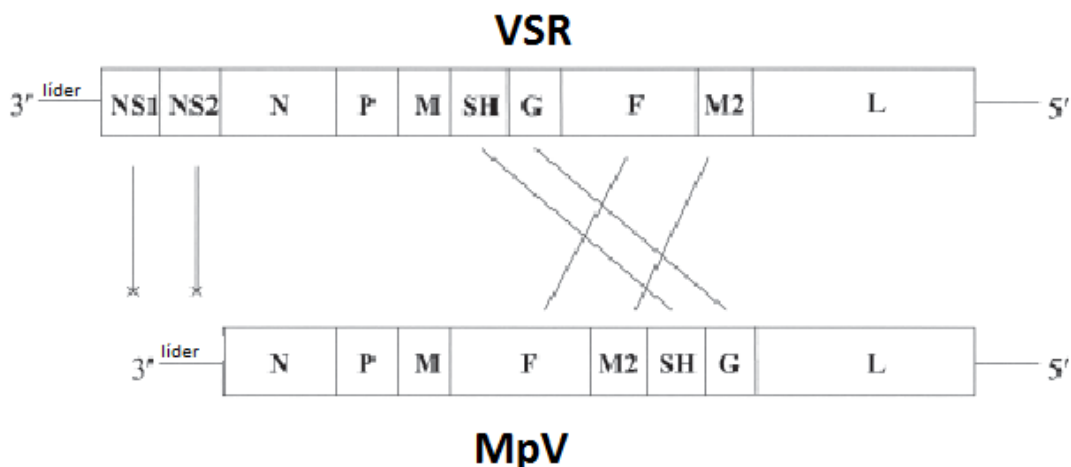


Figura No.2 Esquema del RNA genómico de RSV y MpV. Se muestra el orden de los genes desde 3' a 5' y las proteínas específicas codificadas por estos genes.³

2.2.1.4. Características clínicas

El VSR causa una variedad de enfermedades respiratorias, frecuentemente fiebre con resfriados, pero también puede causar bronquiolitis, tos, infecciones en el tracto respiratorio bajo y neumonía. Los niños que presentan una infección típica por este virus, presentan un decremento en el apetito antes de que cualquier síntoma aparezca. La tos se desarrolla 1 o 3 días después, estornudos, fiebre, sibilancias, irritabilidad, decremento de la actividad y apnea son muy frecuentes en la infección por virus sincicial respiratorio.

El VSR es un virus respiratorio que infecta principalmente el epitelio del tracto respiratorio. La infección dura aproximadamente de 1 a 2 semanas.⁴

Los PVI 1, PIV 2 y PVI 3 están más asociados con inflamación de las vías respiratorias que conducen a los pulmones y neumonías y se encuentran con mayor frecuencia en la población.³

En el caso de MpV los síntomas son iguales a los otros virus pertenecientes a la familia de Paramyxoviridae; como el VSR y parainfluenza, presentándose como enfermedades respiratorias.^{4,9}

2.2.1.5. Tendencias Estadísticas

En la figura 3 se presenta el porcentaje de casos positivos de parainfluenza tipo 1 en los Estados Unidos, desde abril del 2011 hasta abril del 2012, semestralmente. Detectados por aislamiento del virus (amarilla) y por la presencia de antígeno (azul).²⁷

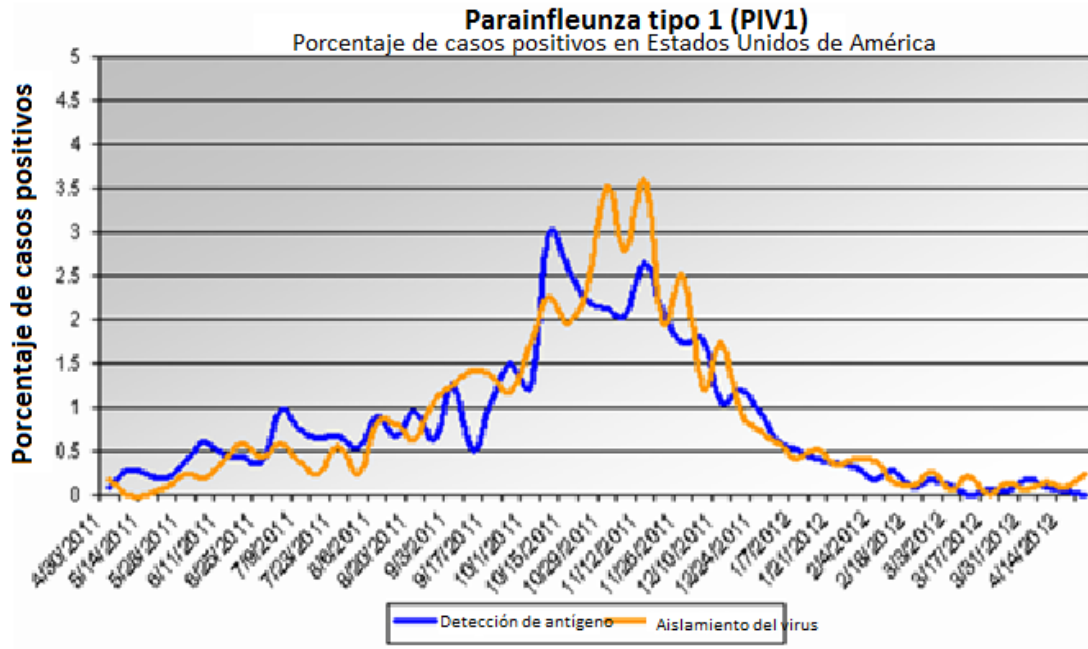


Figura No.3. Porcentaje de casos positivos en Estados Unidos de América. (CDC)

En la figura No. 4 se muestran los porcentajes positivos para la detección del Virus Sincicial Respiratorio en los Estados Unidos del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Desde el año 2011 hasta abril del presente año, por cada seis meses.²⁷

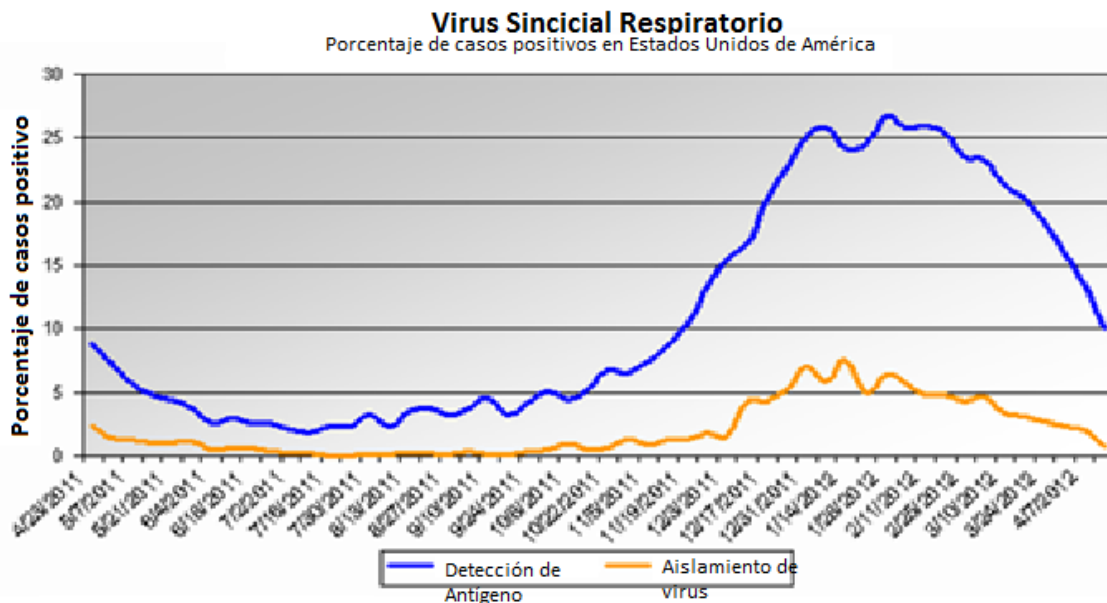


Figura No. 4. Porcentajes de casos positivos en Estados Unidos de Virus Sincicial Respiratorio. (CDC)

2.2.2. ADENOVIRUS

2.2.2.1. Clasificación

La nomenclatura de adenovirus fue realizada en el años de 1956, después fue reclasificada en 1999. La familia se llama *Adenoviridae* y existen 4 géneros aceptados: *Mastadenovirus*, de mamíferos; *Aviadenovirus*, de aves; y *Atadenovirus* y *Siadenovirus* con una amplia gama de hospederos. El adenovirus que infecta a humanos está dividido en seis especies: A, B, C, D, E, y F. Estas especies también están referidas en grupos y subgrupos, se conocen cerca de 51 serotipos que afectan a humanos. Un serotipo está definido basado en la neutralización con antisuero específico.

2.2.2.2. Características Generales

El adenovirus mide alrededor 90 a 100nm, es un virus no envuelto icosaédrico con doble cadena de DNA. El 13% de su masa es ADN, el 87% es proteína. El virion consiste en una proteína que rodea al ADN, llamada cápside. Adenovirus es relativamente resistente a químicos y agentes físicos y a condiciones de pH adversas, lo cual le da bastante resistencia al virus.

2.2.2.3. Genoma

El genoma de adenovirus está compuesto por doble cadena de DNA (dsDNA) y tiene una longitud de 35, 937 pb, que codifican aproximadamente para 40 genes; en el cual se incluyen los de transcripción temprana (E1A, E1B, E2, E3, y E4), los genes expresados tarde en la fase temprana (IX y IVa2) y los genes transcripción tardía (L1 a L5). Todo es procesado para generar 5 familias de RNAm tardíos, los cuales son transcritos por la RNA polimerasa II.³

2.2.2.4. Características clínicas

Adenovirus comúnmente causa infecciones en el tracto respiratorio bajo, como neumonías, bronquitis, bronquiolitis, etc. En infantes y personas con el sistema inmunológico debilitado, están en riesgo de complicaciones severas por la infección de adenovirus, que pueden llevar hasta la muerte. Usualmente los signos

y síntomas son fiebre, congestión nasal, faringitis, con tos y algunas veces con otitis

Las infecciones oculares por adenovirus son comunes. La más frecuente manifestación de este virus es por conjuntivitis folicular aguda, la cual es superficial y se resuelve en pocos días. La fiebre faringoconjuntival es una conjuntivitis folicular acompañada por síntomas en el tracto respiratorio alto, fiebre, linfadenopatía y faringitis.^{4, 11}

2.2.2.5. Tendencias estadísticas

En la figura 5 se muestra el porcentaje de casos positivos detectados por medio de aislamiento de virus y la presencia de antígeno en los Estados Unidos. Desde el primer cuatrimestre del año 2011 hasta abril del 2012.²⁷

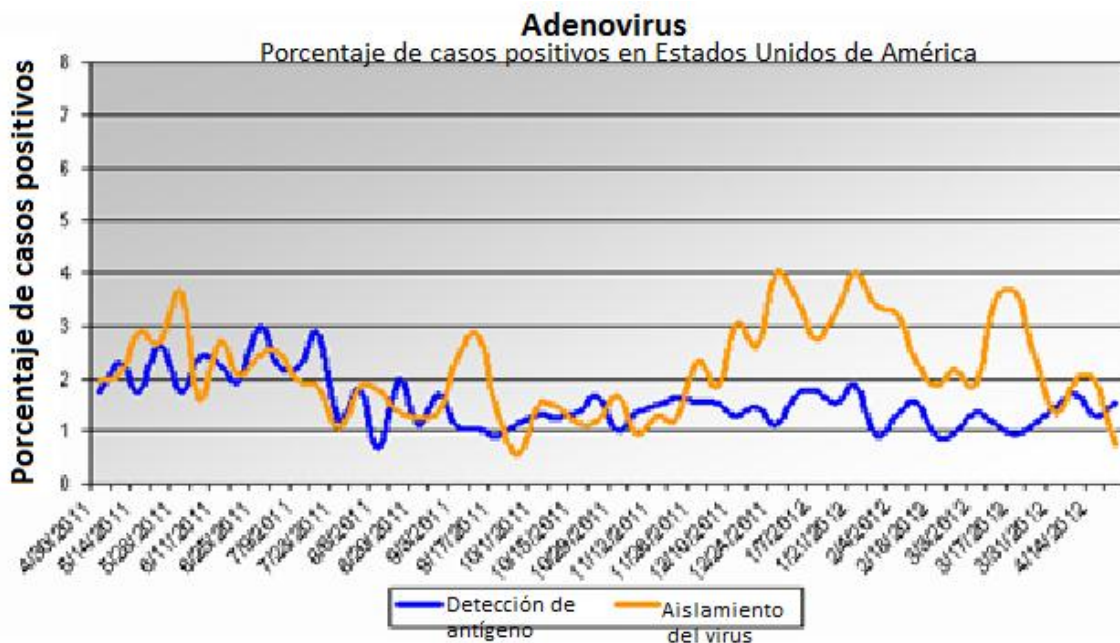


Figura No. 5 Porcentaje de casos positivos de adenovirus en Estados Unidos de América. (CDC)

2.2.3. PICORNAVIRUS

2.2.3.1. Clasificación

La familia Picornaviridae está compuesta de nueve géneros: aphthovirus, cardiovirus, enterovirus, erbovirus, hepatovirus, kobovirus, parechovirus, rinovirus y tehovirus. El género de enterovirus incluye poliovirus (3 serotipos), coxsackie (23 serotipos), echovirus (28 serotipos) y enterovirus humano (4 serotipos). Los que afectan el tracto respiratorio en este género son algunos como el enterovirus 68, coxsackie, echovirus.

Por otro lado existen 101 serotipos de rinovirus, llamado así por su replicación en la nasofaringe, pero recientemente también se ha demostrado que este virus también se replica en el tracto respiratorio bajo.

2.2.3.2. Características

Los miembros de esta familia son virus sin envoltura con una sola cadena de RNA (ssRNA) con polaridad positiva. El nombre de esta familia fue debido a su tamaño pequeño y el tipo de genoma que presenta.

Los viriones de esta familia son esféricos con un diámetro alrededor de 30nm. Las partículas son simples y consisten de una proteína que rodea el RNA desnudo. Las partículas virales carecen de una envoltura lipídica.

2.2.3.3. Genoma

Su genoma está compuesto por una sola cadena de RNA, de polaridad positiva y la replicación del virus se lleva a cabo en el citoplasma. El RNA viral es infeccioso porque es traducido a su entrada en la célula para producir todas sus proteínas que requiere para la replicación. El genoma de picornavirus es único porque está covalentemente unido en la región 5' a una proteína llamada VPg. VPg varía su longitud en los diferentes virus de esta familia, de 22 a 24 residuos de aminoácidos y es codificado en un solo gen viral.

La longitud del genoma varía, va desde 7,209 hasta 8,450 bases. La región 5' no codificante de picornavirus es larga y altamente conservada. Esta región del genoma contiene secuencias de control de la replicación y traducción del genoma.

La región 3' no codificante de picornavirus es corta con una longitud de 47 nucleótidos. Esta región también contiene una estructura secundaria incluyendo un pseudo nudo, que está implicada en el control de la síntesis de RNA.

La región codificante ha sido dividida en tres regiones: P1, P2 y P3; las cuales son separadas por dos proteinasas virales: 2A^{pro} y 3C^{pro}. Como se muestra en la figura 6.³

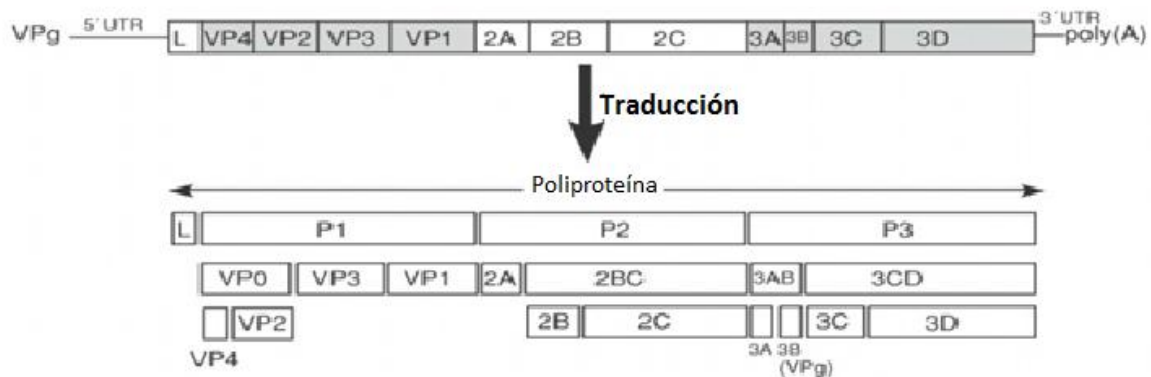


Figura No. 6 La organización del genoma de la familia de Picornavirus. Arriba: Diagrama del genoma de RNA, ligado a la proteína VPg en el extremo 5', la región codificante a proteína, la región 3' no traducida y la cola de poli A. Abajo La región codificante fue dividida en tres regiones: P1, P2 y P3; las cuales son divididas por dos proteinasas virales, 2A^{pro} y 3C^{pro}. Los productos finales e intermedios están indicados.³

2.2.3.4. Características clínicas

Los rinovirus son los principales causantes de los resfriados comunes, recientemente están implicados en casos de asma y en enfermedades crónicas de pulmón. También están relacionados con otitis media y sinusitis. Los rinovirus están considerados como un patógeno respiratorio de baja importancia clínica.⁴

Durante el verano y otoño, el enterovirus es el responsable de resfriados con los mismos síntomas que en el caso de rinovirus.

En los últimos dos años la CDC ha asociado enfermedades respiratorias a enterovirus 68 (HEV68); es el único enterovirus que comparte características epidemiológicas y biológicas con rinovirus. En 1962, en California se aisló por primera vez de cuatro niños con bronquiolitis y neumonía.⁷

2.2.4. CORONAVIRUS (CoV)

2.2.4.1. Clasificación

Los miembros de la familia de *Coronaviridae* son envueltos y con una cadena positiva de RNA, dentro del orden de Nidovirales, incluyendo dos familias: *Coronaviridae* y *Arteriviridae*. La familia *Coronaviridae* incluye los miembros del género *Torovirus* y *Coronavirus*, los cuales tienen una organización del genoma y replicación similar, pero diferente morfología del virión y la longitud de su genoma.

El coronavirus puede ser dividido en tres distintos subgrupos serológicamente. El grupo I contiene el prototipo CoV-229E, CoV-NL63 que afectan principalmente vías respiratorias. En el grupo II los virus que afectan el tracto respiratorio son el coronavirus OC43, HKU1 y SARS-CoV. Los virus pertenecientes al subgrupo III han sido aislados de aves.³

2.2.4.2. Características

El virión es esférico con un diámetro de 100nm a 160nm. Adentro del virión se encuentra la cadena de RNA de sentido positivo de 27 a 32 Kb. El núcleo del virus está encerrado por una envoltura lipo-proteica, la cual se forma durante el ensamblaje. Contiene dos tipos de picos predominantes: El pico largo de 20nm, llamado S de naturaleza glico-proteica, está presente en todos los coronavirus, el pico corto que se llama Hemaglutinina-esterasa (HE), también es una glicoproteína, presente solo en algunos coronavirus.

La envoltura también contiene glicoproteínas transmembranales (M), extendiéndose en la bicapa lipídica y una proteína de envoltura (E), la cual está presente en pequeñas cantidades con respecto a otras proteínas de envoltura (figura 7).^{4,3}

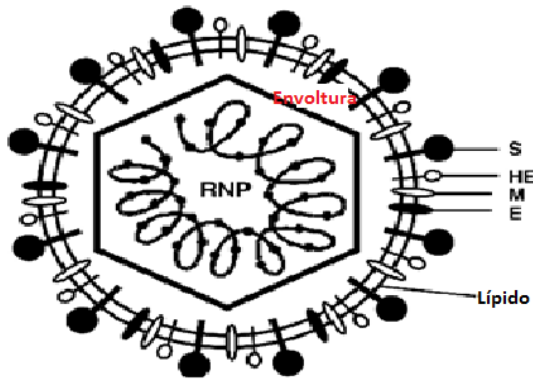


Figura No.7 Diagrama de la estructura del virión de coronavirus. S punta de glicoproteína, HE glicoproteína hemaglutinina-esterasa; M glicoproteína de la membrana, E proteína pequeña de envoltura, RNP: proteína nucleocápside-RNA.⁴

2.2.4.3. Genoma

El genoma de los coronavirus es un RNA de polaridad positiva con una secuencia de poliadenilación en su región 3', que le permite funcionar como RNA mensajero (RNAm). En la región 5' se encuentra una secuencia de 65 a 98 nucleótidos denominada "RNA líder", que también se encuentra en RNAs más pequeños o subgenómicos. Posterior a la secuencia líder se encuentra una región no traducida o UTR de 200 a 500 nucleótidos, seguida por una región codificante constituida por 7 a 14 marcos de lectura. En la región 3' también se encuentra esta región UTR y finalmente la región de poliadenilación. Las secuencias 3' y 5' son importantes para la replicación de RNA y su traducción.³

2.2.4.4. Características clínicas

El síndrome respiratorio agudo severo mejor conocido por sus siglas SARS es una enfermedad respiratoria viral causada por un coronavirus (SARS-CoV). SARS fue reportado en Asia en febrero del 2003. Esta enfermedad se esparció en más de doce países en norte América, sur América y Europa.

El CoV está asociado a infecciones del tracto respiratorio y ligado a enfermedades severas pulmonares. El CoV 229E se caracteriza por un periodo largo de incubación, con un periodo corto de síntomas. El impacto de este coronavirus es la transmisión nosocomial en infantes y en neonatos, asociado a neumonías.

Los síntomas más comunes en una infección por CoV-OC43 son rinitis y tos, también se ha asociado en exacerbaciones de asma, neumonía. Pacientes con CoV- NL63 muestran síntomas como fiebre, tos, dolor de garganta y rinitis en infecciones severas del tracto respiratorio bajo, las cuales requieren hospitalización.

El CoV- HKU1 fue descrito en pacientes con problemas respiratorios y cardiovasculares. Los síntomas respiratorios son rinorea, fiebre, tos y sibilancias; desarrollando bronquiolitis y neumonías.^{4,3}

2.2.5. BOCAVIRUS (BoV)

2.2.5.1. Clasificación

El BoV es un miembro de la familia de *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae* y del género *Bocavirus*. El bocavirus fue clasificado como un bocavirus basado en su estructura genómica y la secuencia de aminoácidos que comparte con los miembros de su género, como parvovirus bovino y el virus canino. Consecuentemente, el primer miembro de este género que afecta a humanos es bocavirus. Otro parvovirus humanos de interés es parvovirus 4.¹⁰

2.2.5.2. Características

El género de Parvoviridae se define por la propiedades genómicas y biológicas. Muchos miembros del género de parvovirus tienen cápside, en la cual contiene una sola cadena de DNA de 5kb, otros virus pertenecientes a este género tienen empaquetado cadenas de DNA tanto en sentido positivo como negativo en diferente proporción.³

Los miembros de esta familia son pequeños, tienen un diámetro aproximado de 18 a 26 nm. El genoma completo tiene una longitud aproximada de 4000 a 6000 nucleótidos. Carece de envoltura, lo cual contribuye a la tenacidad de resistencia al calor, a solventes y a tratamientos con detergentes. El virión no contiene lípidos o carbohidratos, pero contiene fosfolipasa A₂, la cual es requerida durante la entrada a la célula hospedera.^{4,10}

2.2.5.3. Genoma

El genoma de Bocavirus está constituido por una cadena de DNA (ssDNA), con tan solo de 4 a 6 kb y tiene tres propuestas de marcos de lectura (ORF), con dos ORF que codifican las proteínas estructurales (NS1 y NP-1) (figura 8) y una que codifica dos proteínas virales de cápside, la secuencia de VP2 está anidada con VP1. La función de la proteína NS1 se desconoce, pero se especula que juega un papel en la replicación del DNA.^{10, 2}

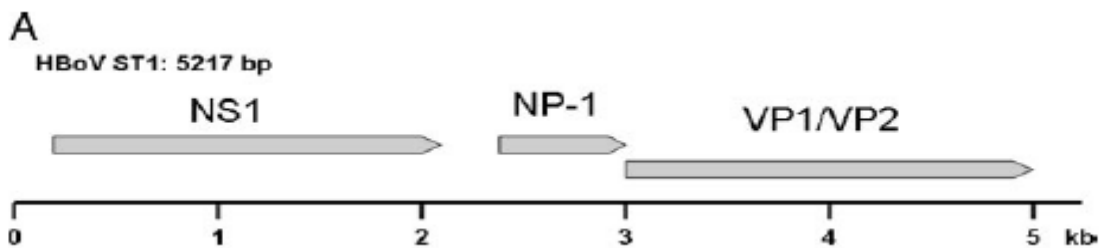


Figura No. 8 **Mapa del genoma de BoV.** (A) Diagrama en el cual se muestran los tres marcos de lectura: NS1, 1920 nucleótidos (183-2102 nucleótidos), 639 aminoácidos; NP-1, 660 nt (2340-2999 nucleótidos), 219 aminoácidos; y VP1/VP2, 2016 nucleótidos (2986-5001 nucleótido), 671 aminoácidos.¹²

2.2.5.4. Características clínicas

El Bocavirus es frecuentemente detectado en el tracto respiratorio alto de niños con síntomas respiratorios. Frecuentemente se encuentra en co-infección con otros virus; como VSR, adenovirus y rinovirus.

Los síntomas clínicos más frecuentes reportados son: tos, rinorrea, fiebre, los más comunes bronquitis en niños con o sin co-infección, bronquiolitis, neumonía y exacerbaciones agudas de asma. Los cuadros clínicos de los pacientes con una infección por bocavirus son similares a las infecciones por RSV y MpV. No hay una distinción clínica para casos positivos de bocavirus a otros virus.¹⁰

2.2.6. Influenza

2.2.6.1. Clasificación

El virus de la influenza pertenece a la familia de Orthomyxoviridae y se clasifica en tres diferentes tipos: A, B y C. La influenza A infecta una gran variedad de aves y mamíferos incluyendo a humanos. En contraste, existe un solo tipo subtipo de B que infecta a humanos. La Influenza C produce enfermedades respiratorias en humanos y algunos animales.

Con base a la antigenicidad de sus proteínas hemaglutinina (HA) y neuramidasa (NA), el virus de influenza se clasifica en diferentes subtipos; hay 16 subtipos de HA (H1-H16) y 9 subtipos de NA (N1-N9).

2.2.6.2. Características

Tiene una apariencia pleomórfica cuando se observa en el microscopio electrónico, con un diámetro de 100 nm y cuando está en su forma elongada puede alcanzar hasta unos 300nm de longitud. La partícula viral tiene una envoltura lipídica, en la cual tres proteínas están insertadas, la glicoproteína HA y NA, también pequeñas cantidades de la proteína trans-membranal M2. La bicapa rodea a una proteína interna formada por la proteína matriz M1, que encierra al genoma viral asociado con la nucleoproteína NP y con PB1, PB2 y PA que forman el complejo de RNA polimerasa. Adentro del virus también se encuentra la proteína no estructural NS2 (figura 9).¹

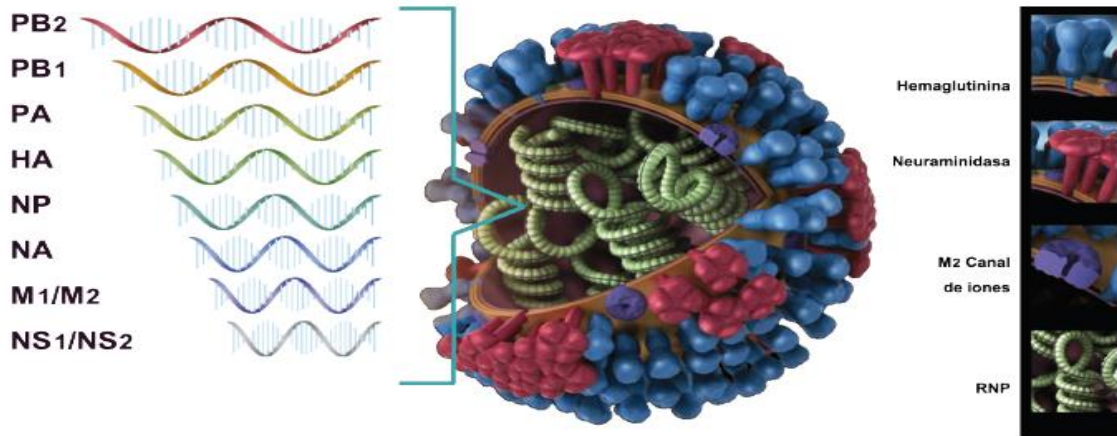


Figura No.9 Esquema del virión de influenza. Izquierda. El genoma segmentado del virus de influenza, que contiene 8 fragmentos, que codifican para 11 proteínas. Derecha. Las proteínas que se encuentran en la envoltura del virión.¹

El virus de la influenza constantemente evoluciona usando diferentes mecanismos. El más importante es la falta de correcciones de la RNA polimerasa durante su replicación, lo cual da como resultado mutaciones puntuales (drift antigénico). El segundo mecanismo de la evolución de influenza se debe a la naturaleza segmentado del genoma, la cual permite la formación de nueva progenie por la combinación de segmentos de dos o más virus diferentes infectando una sola célula (shift antigénico) (figura 10).

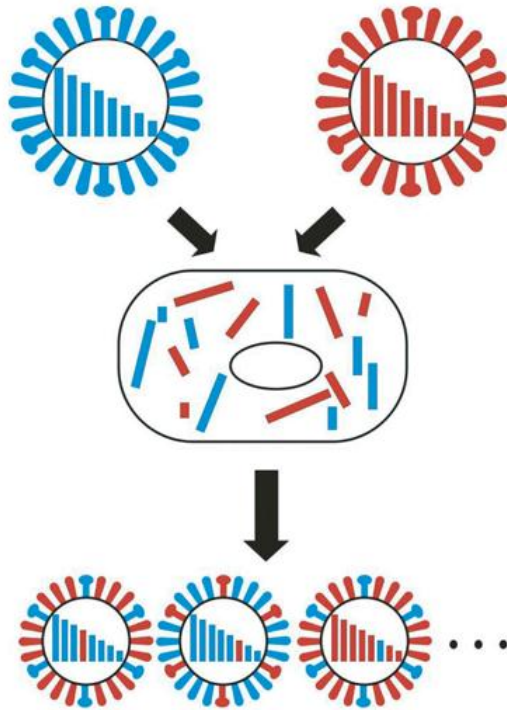


Figura No. 10. Redistribución. Co-infección de células con dos diferentes virus de influenza A, pueden dar como resultado diferentes genotipos.

2.2.6.3. Genoma

El genoma de influenza A está formado por ocho segmentos de una sola cadena de RNA con polaridad negativa, que varía del tamaño de nucleótidos de 2350 nt a 890 nt. En total el genoma contiene cerca de 13600 nt, que codifican para 11 proteínas. Todos los segmentos codifican para una proteína, excepto el gen PB1, el cual también codifica para PB1-F2 en algunas cadenas virales, el gen de matriz que codifica para M1 y M2 y el más pequeño de los genes puede codificar para NS1 y NEP. Todo los genes virales una región 5' y 3' no traducida (NTR) de longitud variable que contienen las señales de replicación y encapsidación; en los extremos 5' y 3' los primeros 12 a 13 nt respectivamente son altamente conservados entre todos los genes del virus.¹

2.2.6.4. Características clínicas

El virus de la influenza es contagioso y puede ocasionar enfermedades severas, que pueden llevar a la muerte. Las personas que son infectadas presentan los siguientes síntomas: fiebre, tos, dolor de garganta, secreción o congestión nasal, dolores musculares y articulares, dolor de cabeza, fatiga y en menor medida vómitos y diarrea.

La Influenza es una enfermedad respiratoria aguda causada por el virus de influenza. La incubación tiene un período de 1 a 4 días. La severidad clínica de la infección tiene un rango asintomático, desarrollando neumonía hasta la muerte. Los síntomas agudos generalmente se presentan de 2 a 7 días. Las complicaciones de influenza incluyen una infección secundaria por alguna bacteria y exacerbaciones. ¹

2.2.6.5. Tendencias estadísticas

En la figura 11 se muestra en número de casos positivos en Estados Unidos desde la semana 40 del año 2011 hasta la semana 6 de año 2012. ²⁷

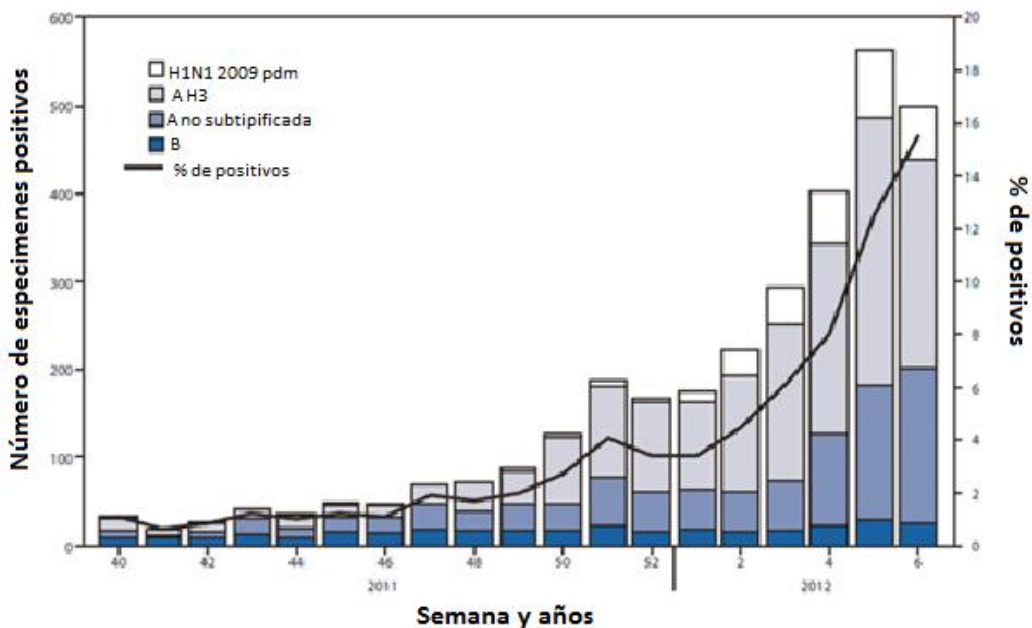


Figura No11. Porcentaje de muestras positivas a influenza, por semana y año en Estados Unidos.(CDC)

2.2.7. HANTAVIRUS

2.2.7.1. Clasificación

La familia Bunyaviridae está formalmente compuesta por 5 géneros: *Orthobunyarius*, *Phlebovirus*, *Nairovirus*, *Hantavirus* y *Tospovirus*, el más representativo del género de *Hantavirus* es hantavirus que causa enfermedades respiratorias. El nombre Hantaan proviene del río Hantaan, en el sur de Corea, cerca de ahí se aisló originalmente.

2.2.7.2. Características

El virión generalmente se encuentra en forma esférica y tiene un diámetro aproximado de 80 a 110 nm, se conoce que tiene en su superficie glicoproteínas en forma de proyecciones con una longitud de 5 a 10nm, las cuales están integradas en la bicapa lipídica de la envoltura.

2.2.7.3. Genoma

Los viriones contienen tres cadenas de RNA segmentadas designadas como: Larga (L) cuya longitud es de 6500 nucleótidos; un segmento medio (M), que tiene alineados de 3600 a 3800 nucleótidos y un segmento pequeño (S) de sentido negativo con una longitud aproximada de 1700 a 2100 nucleótidos. El primer segmento codifica una polimerasa viral; el segundo, las glicoproteínas G1 y G2 y el tercero codifica la proteína N de la nucleocápside. Las secuencias terminales son altamente conservadas entre cada género y están complejados con la nucleocápside, para formar la estructura de ribonucleocápside. La nucleocápside y la RNA polimerasa dependiente de RNA están empaquetados dentro de una envoltura lipídica que contiene las glicoproteínas: Gn y Gc.

2.2.7.4. Características clínicas

En contraste a otros géneros de la familia de Bunyaviridae, hantavirus es transmitida a humano por roedores infectados y sus heces. Hantavirus tiene el potencial de causar dos diferentes tipos de enfermedades en humanos: la fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHRS) y el síndrome pulmonar por hantavirus (SPH). Este último causando la muerte por disfunción del miocardio e hipoxia.

El SPH en el continente americano es raro, pero suele ser un trastorno grave transmitido por el contacto muy cercano con orina, heces o saliva de roedores infectados. La enfermedad se divide en cuatro fases: febril, cardiopulmonar, de diuresis y de convalecencia o muerte. La primera fase se caracteriza por fiebre, mialgias, escalofríos, astenia, mareos, cefaleas, anorexia, náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea. Por lo común no aparecen manifestaciones de ataque de las vías respiratorias superiores, tales como faringitis, rinorrea, sinusitis y dolor de oídos. En los comienzos del pródromo no se han señalado manifestaciones como tos, taquipnea y disnea con el ejercicio, pero aparecen y se anticipa el comienzo del edema pulmonar que se trata de la segunda fase.

La diuresis espontánea define el comienzo de la fase de diuresis. Esta tercera fase de la enfermedad se caracteriza por la eliminación rápida del líquido del edema pulmonar, y la resolución de la fiebre y del choque.¹⁵

2.3. TRATAMIENTOS

Existen diferentes fármacos que tienen como blanco principalmente proteínas virales y por lo tanto inhiben su función, impidiendo la replicación viral. El Ribavirin es un análogo del nucleósido purínico con una base modificada y d-ribosa como azúcar. La ribavirina es fosforilada con rapidez por acción de la cinasa de adenosina a metabolitos monofosfato, difosfato y trifosfatos. Este último producto es un potente inhibidor competitivo de la deshidrogenasa de monofosfato de inosina, de la polimerasa de RNA del virus y de la guaniltransferasa del RNA mensajero. Estas acciones disminuyen los reservorios intracelulares de trifosfato de guanosina e inhiben las síntesis proteica y de RNA vírico. Con una actividad potente agonista del VSR. Usualmente se administra en aerosol, durante 6 o 8 horas diariamente de 3 a 7 días.³²

Para los virus de influenza A y B, los inhibidores de la neuramidasa; el oseltamivir y zanamivir son los antivirales permitidos pero solo para adultos no para infantes. Estos medicamentos pueden ser usados como profilaxis a la exposición del virus. Se deben administrar 48 horas después de la exposición o 36 horas después de los primeros síntomas.⁶

La proteína M2 es el principal blanco de los medicamentos antivirales para influenza; que son la amantadina y rimantidina que bloquean la actividad de los canales iónicos de la M2. Estos medicamentos tienen propiedades antivirales contra todos los tipos de influenza A, pero no contra la influenza B o C.¹

Cidofovir es un potente inhibidor no tóxico de la replicación de adenovirus. Es un análogo de 2',3'-dideoxycitricina y el cidofovir puede ser convertida de la forma di a trifosfato por enzimas celulares. Este compuesto tiene mucho más afinidad por la DNA polimerasa viral que la celular; lo que lo hace específico para células infectadas por virus, actuando como inhibidor de la polimerasa.³

Otros medicamentos están enfocados para superar la obstrucción de las vías aéreas; como por ejemplo broncodilatadores, incluyendo agonistas de receptores β_2 , epinefrina y antimuscarínicos; como bromuro de apatropio. También el uso de

corticosteroides para controlar la inflamación en el tracto respiratorio y subsecuentemente los síntomas.⁵

2.4. REPLICACIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS

2.4.1. ADHESIÓN

El primer paso de una infección por un virus es la adhesión. El virus debe ser capaz de adherirse y entrar en la célula “correcta” o célula “blanco”. La adhesión es un fenómeno electrostático y no requiere energía celular, a pH 7 los virus y las células tienen cargas negativas, de modo que es necesaria la presencia de iones positivos, cumpliendo este requerimiento los iones de magnesio. Si se bloquea la adhesión se impide que se desarrolle la infección. Se dice que el tropismo de un virus es cuando se dirige e infecta a una célula en específico. En muchos casos, son poblaciones específicas celulares dentro del organismo. (Tabla 1)

Tabla No. 1 Tropismo celular de algunos virus respiratorios

VIRUS	Tipo celular
Influenza A	Epitelio respiratorio
Rinovirus	Epitelio nasal
Parainfluenza	Epitelio respiratorio
Coronavirus	Epitelio del tracto respiratorio alto

Para infectar las células, las proteínas de adhesión, localizadas en la parte externa del virus, deben ser capaces de unirse a receptores de superficie celular. Los receptores celulares son generalmente proteínas, glicoproteínas, carbohidratos o lípidos. (Tabla 2)

Tabla No. 2 Receptores que usan algunos virus respiratorios para adherirse a la célula.

Virus	Receptor de superficie celular
Influenza A	Ácido siálico $\alpha_{2,3}$ y $\alpha_{2,6}$
Rinovirus	Molécula de adhesión intracelular (ICAM-1)
Adenovirus	Integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$
Coxsackie	Factor de decaimiento (CD55)
Enterovirus	Ácido siálico

Hay varios factores que pueden influir sobre la eficiencia de la adhesión viral, como la densidad de receptores en la superficie de la célula del hoperero, la densidad de los ligandos en el virus. La temperatura, el pH y la presencia y ausencia de algunos iones específicos pueden desempeñar un papel en la eficiencia de la adhesión. Para algunos virus como rinovirus y el virus de influenza, un único tipo de receptor celular es suficiente para la adhesión.

2.4.2. PENETRACIÓN.

Después de que el virus se adhiere al receptor celular, éste debe atravesar la membrana bilipídica de la célula del hospederero. La actividad de la superficie de la membrana celular es dinámica y se recambian constantemente.

2.4.2.1. Ingreso de los virus envueltos

Los virus envueltos tienen una bicapa lipídica o envoltura que rodea la nucleocápside. Estos virus ingresan a las células por la fusión de la membrana viral y la membrana celular. Las dos formas básicas de ingreso de un virus envuelto son la **fusión mediada por ligando** de la membrana del virus y la membrana plasmática celular o la **endocitosis mediada por receptores**.

En la fusión mediada por ligando, el virus se adhiere a la membrana plasmática y la fusión tiene lugar entre las membranas viral y celular. La nucleocápside del virus se libera dentro de la célula, mientras que la envoltura viral permanece en la membrana plasmática de la célula. La fusión, como modo de penetración es independiente del pH.

En la endocitosis el virus se adhiere a un receptor en la membrana plasmática de la célula. La célula recibe estímulos para englobar al virus entero y se forma una vesícula endocítica. Esta se fusiona con lisosomas, que tienen un pH interno ácido. El pH ácido de la vesícula produce cambios conformacionales en las proteínas de la envoltura viral, que facilitan la fusión de la membrana del virus con la membrana endocítica y la liberación consecuente de la nucleocápside viral en el citoplasma. Este modo de penetración es dependiente de pH.

2.4.2.2. Ingreso de virus desnudos.

La mayoría de virus desnudos entran por endocitosis mediada por receptores. La interacción del ligando viral con el receptor de superficie celular causa la invaginación o la formación de una vacuola recubierta por clatrina en la superficie celular. La cubierta por clatrina es eliminada y la vesícula que contiene al virus se fusiona con los lisosomas. El pH bajo, junto con las proteasas en la vesícula endocítica, contribuyen a disociar la cápside y el ácido nucleico viral es liberado en el citoplasma.

2.4.3. DESNUDAMIENTO

En este paso se lleva a cabo la eliminación o degradación de la cápside, con la liberación consecutiva del genoma viral dentro de la célula del hospedero. El genoma se transporta al sitio donde la transcripción y la replicación comienzan. En algunos virus, la cápside no es degradada porque sus proteínas desempeñan un papel en la replicación y la transcripción virales. En estos virus, el desnudamiento es el cambio que sufre la nucleocápside y que la preparan para la transcripción o replicación.

La etapa de desnudamiento puede producirse al mismo tiempo que la penetración del virus en la célula, o seguir inmediatamente a ésta. Es un paso necesario para que tenga lugar la replicación del genoma viral.

2.4.4. REPLICACIÓN VIRAL

Comienza la replicación del ácido nucleico y síntesis de las proteínas estructurales y no estructurales, necesarias para la producción de virus.

El genoma de los virus está formado por DNA o RNA y puede ser de una sola cadena (ss) o de doble cadena (ds).

2.4.4.1. Virus de DNA de doble cadena (dsDNA)

En la mayoría de los virus de DNA el genoma se replica en el núcleo y utiliza tanto la maquinaria sintetizadora de RNA y de DNA, como la maquinaria procesadora de RNA del hospedero. Esto significa, que el genoma debe atravesar la membrana nuclear para utilizarlas.

Las proteínas virales son traducidas a partir de los RNAm monocistrónicos que se generaron mediante la transcripción de los RNAm virales.

Algunos virus de dsDNA como por ejemplo adenovirus utiliza la RNA polimera II dependiente de DNA, localizada en el núcleo del hospedero para transcribir los RNAm virales a partir de dsDNA del genoma viral. La célula huésped debe haber iniciado el ciclo celular, a fin de que las DNA polimeraras estén disponibles para los virus de DNA. Los transcritos de RNA viral son empalmados y escindidos por la maquinaria celular para producir RNAm monocistrónicos, que se exportan al citoplasma y que son traducidos por la maquinaria de traducción celular. El dsDNA viral es empaquetado junto con las proteínas estructurales y enzimas, lo cual da como resultado la generación de nuevas progenies de virus ensamblados. (Figura 12).

Estrategia de replicación de virus de DNA de doble cadena

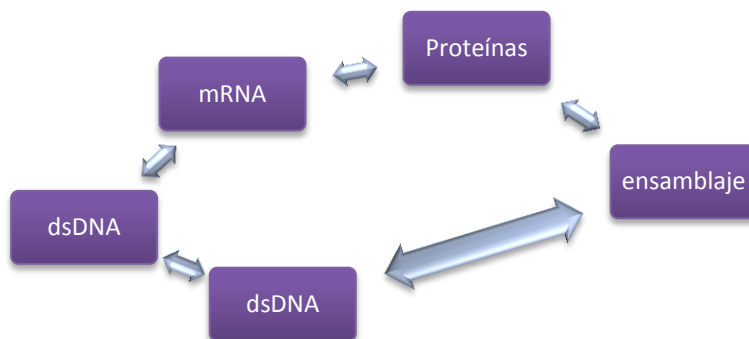


Figura No. 12. Esquema de estrategias de replicación de virus de DNA de doble cadena (dsDNA).

2.4.4.2. Virus de DNA de una sola cadena (ssDNA)

Los parvovirus como por ejemplo bocavirus son los virus más pequeños y a diferencia del genoma de los virus de dsDNA, estos virus de ssDNA tienen genomas lineales muy pequeños. Los parvovirus no portan ninguna enzima en su partícula viral. Infeccionan células que ya iniciaron su ciclo celular porque dependen de la DNA polimerasa del hospedero para sintetizar su ssDNA y de la RNA polimerasa dependiente de DNA para transcribir en el núcleo el dsDNA viral a mRNA. (Figura 13).

Estrategia de replicación de virus de DNA monocatenario

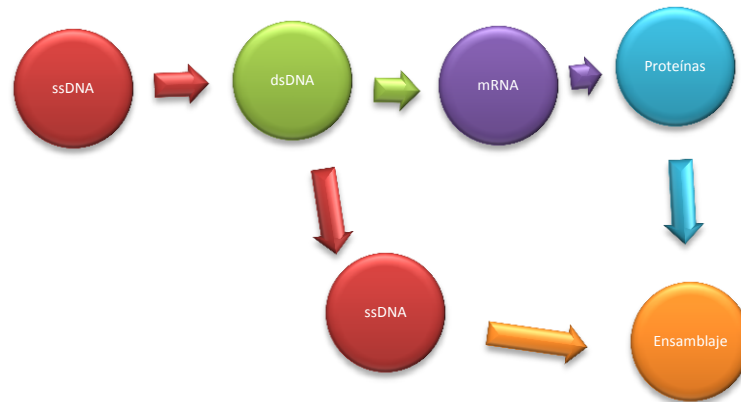


Figura No.13. Esquema de estrategias de replicación de virus de DNA monocatenario (ssDNA).

2.4.4.3. Virus de RNA

Los genomas de los virus de RNA presentan diversas características, son de doble o de una sola cadena, lineales o segmentados. El tipo de genoma de RNA determina si el primer paso después del desnudamiento será la traducción, la transcripción o la replicación del RNA.

Los virus que tienen genomas ssRNA+ pueden ser traducidos directamente mediante la maquinaria celular del hospedero porque el ssRNA+ actúa como un mRNA.

Los otros tipos de virus de RNA deben ser transcritos a mRNA antes de que se produzca la traducción.

2.4.4.4. Virus de RNA de doble cadena (dsRNA)

Estos virus tienen genomas segmentados de dsRNA. El hospedero no produce RNA polimerasa dependiente de RNA, por lo cual el virus porta su propia RNA polimerasa y el ciclo de replicación ocurre solamente en el citoplasma. Después de la adhesión, el ingreso y el desnudamiento, el virus sintetiza ssRNA+ a partir de cada uno de los segmentos de dsRNA (usa como molde las cadenas de ssRNA- del genoma de RNA de doble cadena). La mitad de las cadenas de ssRNA+ nuevamente sintetizadas y que contienen la estructura de cap(mRNA), se traducen en el citoplasma por medio de la maquinaria celular. Las cadenas restantes son empaquetadas en la cápside viral durante el ensamblaje. (Figura 14)

Durante la maduración, las cadenas de ssRNA- se sintetizan a partir de los moldes de ssRNA+ que tienen el cap adicionado, para formar los segmentos restantes de dsRNA genómico dentro de la partícula viral.

Estrategia de replicación de virus de RNA de doble cadena

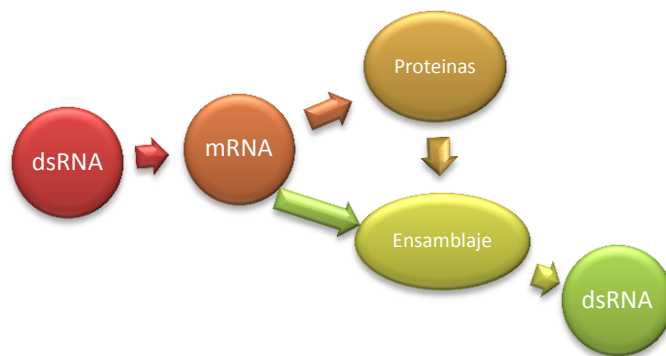


Figura No.14 Esquema de estrategias de replicación de virus de RNA de doble cadena (dsRNA).

2.4.4.5. Virus de RNA de una sola cadena en sentido positivo (ssRNA+)

Los miembros de la familia de Picornaviridae como rinovirus, enterovirus, coxsackie, entre otros, causan enfermedades en tracto respiratorio y su composición genómica es de RNA de una sola cadena en sentido positivo. El RNA en la partícula viral funciona en sí como mRNA. Este RNA genómico es un mRNA policistrónico que la maquinaria celular reconoce y traduce (como un único marco de lectura abierto) en un precursor de una poliproteína, que luego es escindida en proteínas virales mediante proteasas virales y celulares. Una de las proteínas virales codificada es una RNA polimerasa dependiente de RNA que replica el genoma viral. Transcribe el ssRNA+ en un intermediario replicativo de ssRNA-, el cual actúa como molde para el ssRNA+ genómico. (Figura 15).

Estrategia de replicación de virus de RNA de una sola cadena en sentido positivo

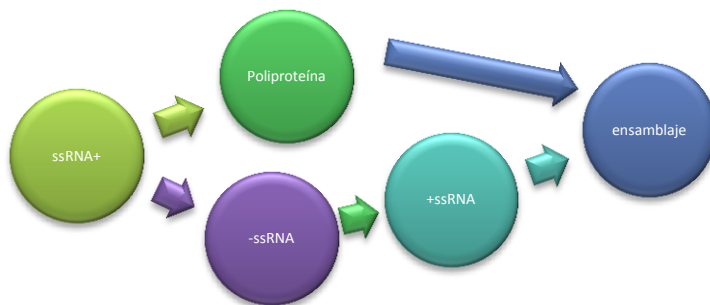


Figura No.15 Esquema de estrategias de replicación de virus RNA de una sola cadena en sentido positivo (ssRNA+).

2.4.4.6. Virus de RNA de una cadena en sentido negativo (ssRNA-).

Los virus de la familia Paramixoviridae, como por ejemplo metapneumovirus tienen genomas no segmentados de ssRNA-. Estos virus codifican su propia RNA polimerasa dependiente de RNA, que transcribe su genoma ssRNA- en varios +ssmRNA monocistrónicos, que son reconocidos por la maquinaria de la célula del hospedero. Se traducen variantes de mRNA viral para originar diferentes proteínas virales, en lugar de una sola poliproteína. Todas estas proteínas no se forman al

mismo nivel y se utilizan numerosos mecanismos de control. Una segunda función de la RNA polimerasa dependiente de RNA es sintetizar el genoma del virus o de su progenie mediante el uso del ssRNA+ como molde. Por lo tanto, a veces se dice que la RNA polimerasa tiene funciones de transcriptasa y de replicasa. (Figura 16)

Cada segmento produce un RNAm monocistrónico o un RNA que es empalmado de un modo diferente para generar monocistrónicos.

Estrategia de replicación de virus de RNA de una cadena en sentido negativo.

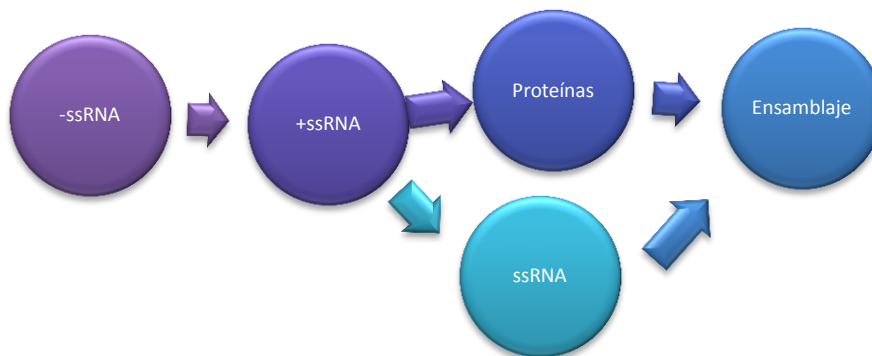


Figura No.16 Esquema de estrategias de replicación de virus de RNA de una cadena de sentido negativo (ssRNA-).

2.4.5. ENSAMBLAJE

A pesar de la diversidad estructural de las partículas virales, el repertorio de mecanismos de ensamblaje es limitado. Todos los componentes del virus deben ensamblarse para crear una estructura estable. Simultáneamente, los virus recién ensamblados deben llevar a cabo el desnudamiento para comenzar un nuevo ciclo infeccioso.

El proceso de ensamblaje ocurre cuando se alcanza una concentración adecuada de proteínas virales y de ácidos nucleicos genómicos y éstos se encuentran en los sitios específicos dentro de la célula infectada. Los ácidos nucleicos son empaquetados en la cubiertas preexistentes que se formaron por autoensamblaje

de las proteínas virales de la cápside. Los sitios de ensamblaje pueden ser el citoplasma, el núcleo o la superficie interna de la membrana plasmática celular, difieren según los virus y tienen cierta influencia en el mecanismo de liberación de la partícula viral.

2.4.6. MADURACIÓN

Este es el estadio del ciclo viral en el cual el virus se torna infeccioso. Las proteasas virales o celulares participan a menudo en la maduración. Una o más proteínas de la cápside o envoltura, pueden sufrir una escisión proteolítica específica dentro de la partícula, la cual lleva a cambios estructurales sutiles en la partícula viral que pueden aumentar su estabilidad.

2.4.7. LIBERACIÓN

Los virus recién formados se liberan al ambiente externo después de la lisis y escapan de la célula, cuando ésta se desintegra, o mediante gemación a través de la membrana plasmática, como en el caso de los ortomixovirus, paramixovirus. Los virus que son liberados por brotación pueden dañar la célula. Algunos virus brotan a partir de otras membranas y son liberados de la célula por un mecanismo semejante a la secreción.¹⁹

2.5. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS RESPIRATORIAS AGUDAS

El diagnóstico de virus respiratorios se realiza mediante combinaciones de técnicas incluyendo inmunoensayos con enzimas, detección con anticuerpos fluorescentes, cultivos celulares y la amplificación de ácidos nucleicos. Con el descubrimiento de nuevos virus, los laboratorios se ven en la tarea de cambiar sus métodos de detección hasta para 19 virus diferentes, causantes de enfermedades del tracto respiratorio tanto alto como bajo.

Una identificación del agente causal de la infección es esencial, para dar un diagnóstico preciso y que el tratamiento sea el apropiado, y así reducir la transmisión nosocomial.

2.5.1. Pruebas de diagnóstico de virus respiratorios no moleculares

La prueba directa rápida de antígeno (RADTs) es una prueba no molecular, rápida comparada con métodos tradicionales como el cultivo y la prueba directa con un anticuerpo fluorescente (IF), ambos métodos pueden detectar 7 virus respiratorios como: adenovirus, influenza A, influenza B, parainfluenza 1,2 y3.

La sensibilidad de RADTs va desde el 100% hasta un 75% y su especificidad se encuentra en un intervalo de 50% hasta 100%, esto depende del agente viral, edad del paciente y el tiempo de recolección de la muestra. En general, RADTs es mejor cuando se trata de pacientes pediátricos, porque los niños pueden arrojar títulos mayores de virus por un período de tiempo más largo que el de los adultos.¹³

Las pruebas IF y cultivo celular presentan sensibilidad por debajo del 50% para virus sincicial respiratorio y para influenza alrededor del 80%, comparado con la amplificación de ácidos nucleicos. El tiempo estimado para la detección por cultivo celular es de 10 días, por lo que es incompetente, al tratarse de pacientes que se encuentran en situación grave. El aislamiento del virus se desarrolla en 4 o 3 líneas celulares y para influenza se utilizan huevos embrionarios por lo que este método es costoso y demasiado tardado.

Además existen una gran variedad de pruebas serológicas incluyendo la inhibición de hemaglutinación (HAI), fijación del complemento e inmunoensayos las cuales utilizan enzimas por lo que se denominan ensayos inmunoenzimáticos (EIA). Estas pruebas también se encuentran disponible para subtipificar el virus de influenza por H1 o H3.¹³

En lo que respecta a la inmunofluorescencia (IF), en los 90's los tubos de cultivo se remplazaron por viales de cultivo y junto con anticuerpos monoclonales, se detectaron antígenos virales específicos en uno o dos días a diferencia del cultivo que se lleva alrededor de 10 días. El tiempo estimado para el diagnóstico utilizando la detección directa con un anticuerpo fluorescente es de 3 horas, pero estas pruebas carecen de sensibilidad y usualmente arrojan falsos positivos.

2.5.2. Pruebas de diagnóstico de virus respiratorios moleculares

La amplificación de ácidos nucleicos, comúnmente conocido con reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es especialmente usada para la detección de patógenos por ser un método rápido en comparación con otras técnicas. En muchos casos esta prueba brinda mayor sensibilidad; la especificidad varía según el blanco y el ensayo designado pero generalmente es alta.

En la actualidad se han desarrollado técnicas multiplex para detectar en una sola muestra hasta 20 virus respiratorios diferentes en un aproximado de 5 horas, usando pares de iniciadores específicos para los tipos y subtipos de virus.

2.5.2.1. Diagnóstico de virus respiratorios mediante Luminex xTAG (TmBioscience, Toronto Canada).

La detección múltiple aprobado por la Administración de Drogas y Fármacos (FDA) en Estados Unidos, es el sistema de Luminex xTAG de panel de virus respiratorios (TmBioscience, Toronto Canada), que detecta adenovirus, influenza A (con la subtipificación estacional H1 o estacional H3), influenza B, PIV1, PIV2, PIV3, MpV, rinovirus, RSV A, RSV B, coronavirus y enterovirus. La xTAG tiene múltiples pasos, por lo que el tiempo completo aproximado para detectar virus respiratorios es de 8 a 10 horas, dependiendo el número de muestras. Se extraen los ácidos nucleicos, tanto de las muestras como del control interno (*E. coli* MS2 fago). Después se realiza una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) multiplex, usando primers específicos para cada blanco, amplificando los ácidos nucleicos, tanto de los virus como del control interno. Los productos de PCR son tratados con exonucleasa I para degradar los iniciadores restantes.

El siguiente paso consiste en la extensión del blanco específico con el iniciador (EBEI). Cuando el blanco viral está presente, los iniciadores específicos son extendidos y la biotina-deoxicitidina trifosfato es incorporada en la reacción. La detección de los productos amplificados se lleva a cabo por el sistema de sorting de Luminex. El producto de la reacción se deposita en los micropozos conteniendo

esferas espectralmente distinguibles con unas anti-etiquetas, las cuales son complementarias a la secuencia de los iniciadores. Cada iniciador etiquetado es hibridizado solamente con su única anti-etiqueta complementaria con una esfera de color específico, mientras que un molécula reportera fluorescente (streptavidina-ficoeritrina), se une con la biotina (Figura 17). Las esferas son analizadas con el instrumento Luminex xMAP, con dos láser; el primero identifica el código de color de las esferas, y el segundo determina si el amplicón es hibridado a la esfera fluorescente en la base de la detección de la fluorescencia (intensidad media fluorescente [MFI]). (Figura 18)

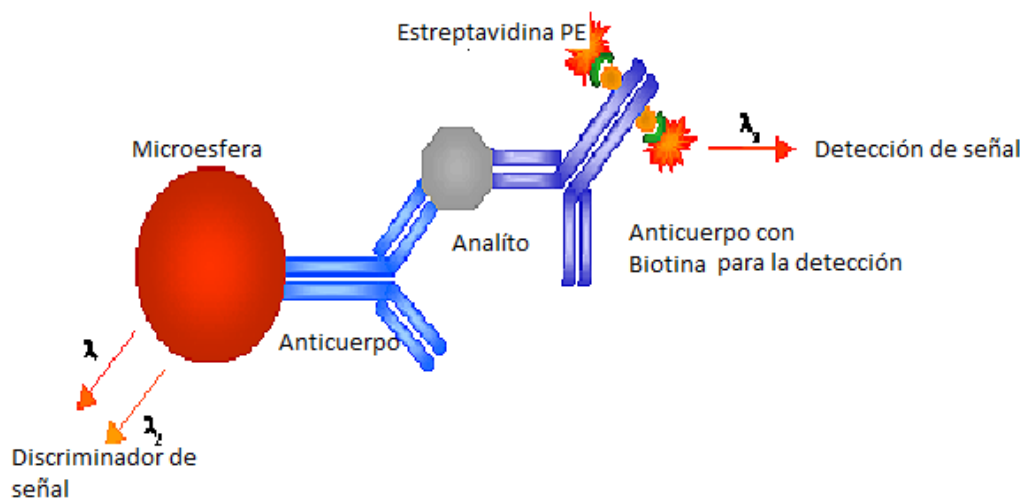


Figura No. 17. Formación del complejo de la microesfera con el anticuerpo marcado con estreptavidina.

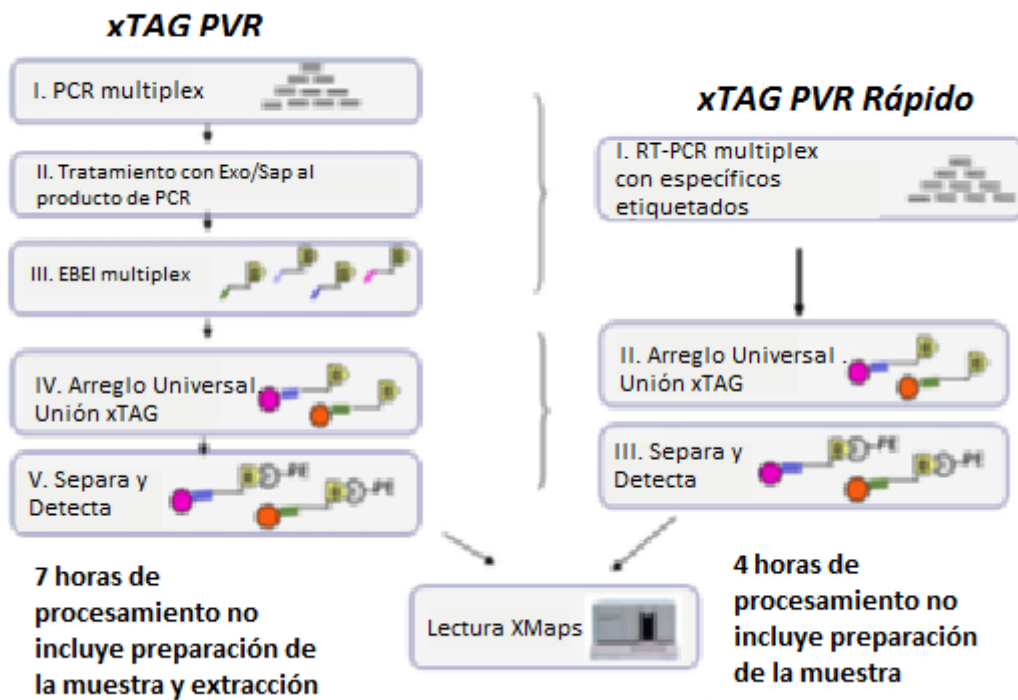
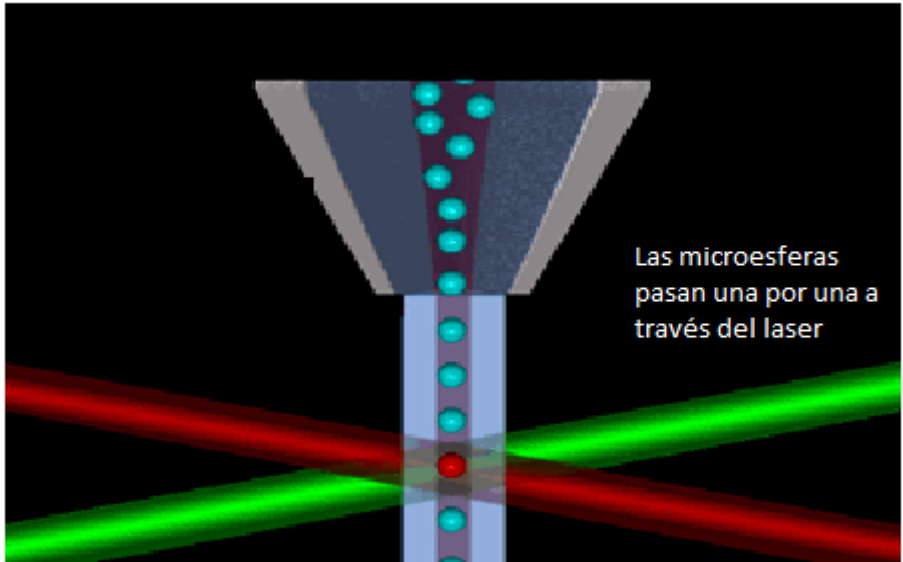


Figura No. 18. Forma de detección en el Luminex xMap

Figura No. 19. Comparación de las dos versiones de Luminex. Izquierda. xTAG RVP y a la derecha XTAG RVP FAST.

El diagnóstico molecular por Luminex se encuentra en el mercado en dos versiones la primera es XTAG RVP y la segunda es xTAG RVP FAST, la

diferencia es el que segundo no requiere el tratamiento con exonucleasa por lo que se requieren solo 4 horas para obtener resultados y la subtipificación del virus de influenza como H1 y H3. (Figura 19)^{8, 13}

2.5.2.2. Anyplex™ II (Seegene)

Otro multiplex que actualmente se encuentra en el mercado es Anyplex™ II para la detección de 16 virus respiratorios, como: virus de influenza A, influenza B, virus respiratorio sincicial A, virus respiratorio B, metapneumovirus, adenovirus, coronavirus 229E, coronavirus NL63, coronavirus OC43, rinovirus ABC, enterovirus, bocavirus, parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3, parainfluenza 4.

La tecnología TOCE™, está basada en detectar múltiples patógenos en un solo canal de fluorescencia en instrumentos para PCR tiempo real. Realizando una curva de disociación y siempre teniendo el mismo valor de Tm para los diferentes virus, esta tecnología fue diseñada para no ser afectada por las variaciones en la secuencia.

2.5.2.3. Nanofluidos

En la década de los años 70's ingenieros de San Francisco, diseñaron una tecnología que se basaba en semiconductores aplicada a líquidos para la industria de ciencias de la vida. En dispositivos de microfluidos se puede incorporar pasos complejos de biología molecular minimizando el volumen requerido sin pérdida de confiabilidad.

El dispositivos de microfluidos está compuesto por unas válvulas Nanoflex™, que es una membrana que se dobla bajo la presión que ejerce los fluidos. La válvula está hecha de dos capas de elastómero de goma y se colocaron en un molde micro-mecanizado. Las capas forman canales y cámaras en un chip de goma.

Cuando el gas a presión se aplica a los canales, el caucho se deforma justamente en la intersección de los canales, formando una válvula simple. (Figura 20)

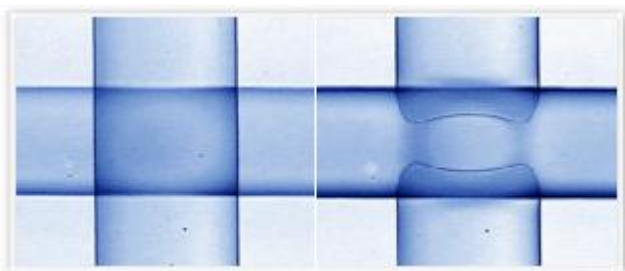


Figura No. 20. Formación de la válvula en el momento de la inyección del gas en los canales.

Se agregan tanto las muestras como los ensayos, al dispositivo en donde se realiza la reacción de PCR; mejor conocido como chip, se llenan las cámaras de las muestras con 9nL (Figura21). Las moléculas blanco son encerradas y separadas en los compartimientos. En las otras cámaras de 1nL se llenan con los ensayos, (Figura 22) se abren las válvulas permitiendo el mezclado de los ensayos con las muestras. Todo esto se realiza en el controlador IFC. (Figura 22)

El chip digital es colocado en el sistema Biomark, en el cual en su interior contiene un termociclador, una cámara CCD y una fuente de luz de fibra óptica, para detectar en cada ciclo de amplificación la cantidad de moléculas presentes. Las muestras positivas a algún patógeno fluorescen. Esta tecnología es cuantitativa y cualitativa, porque el número de copias del blanco de interés puede ser calculado.



Figura No. 21. Cámaras para muestras con un volumen de 9 nL en un chip del fluidigm.



Figura No. 22. Izquierda. Cámaras para el ensayo con un volumen de 1 nL en un chip del fluidigm. Derecha. Mezclado de la muestra con el ensayo en el chip.

Hoy en día, la tecnología de Fluidigm permite el análisis rápido, eficiente y reproducible de decenas de cientos de marcadores genéticos, a través de cientos o miles de muestras de ADN, en muy pocas horas. La tecnología está basada en la genómica, así como en la expresión de genes de una sola célula y tecnologías tan innovadoras como el PCR digital.²⁶

3. JUSTIFICACIÓN

Una identificación rápida, sensible y específica de agentes microbianos en infecciones respiratorias, evitaría el uso indiscriminado de antibióticos y reduciría transmisiones nosocomiales. En la actualidad se cuenta con cuatro vías principales para el diagnóstico virológico: cultivo celular, serología, detección de antígeno por inmunofluorescencia y PCR. Las desventajas del cultivo viral y serología es que los resultados son tardados, pueden tomar hasta 10 días para el crecimiento en alguna línea celular y 2 semanas para el desarrollo de anticuerpos contra la infección viral. La detección de antígeno se basa en el uso de anticuerpos monoclonales específicos, en contra del virus y con el uso de una enzima conjugada o fluoróforo se da la detección de antígeno; además puede dar una reacción cruzada entre diferentes virus.

La prueba basada en la amplificación de los ácidos nucleicos (PCR) es significativamente más sensible que otros métodos. Para optimizar el diagnóstico de microorganismos una de las nuevas variantes en la amplificación de ácidos nucleicos es la PCR en tiempo real, en el cual se utilizan sondas de alto costo y las muestras se enfrentan a un solo blanco. En la actualidad se conocen colorantes como el Evagreen que se intercala en la doble cadena de DNA y emite una señal de fluorescencia, y el costo de éste es mucho más bajo en comparación con sondas.

La compañía Biomark, desarrolló la tecnología de nanofluidos llamada Fluidigm, para el estudio de expresión de genes con reactivos de fácil acceso, utilizando un volumen de reacción pequeño y en un tiempo corto. Nosotros adaptamos esta tecnología para la detección de virus respiratorios en pacientes con infecciones respiratorias agudas.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar una metodología molecular nueva para la identificación y tipificación de virus respiratorios, mediante la amplificación múltiple en tiempo real empleando tecnología de arreglos dinámicos de nanofluidos.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar estrategias de amplificación por medio de qRT-PCR para la detección total de diferentes virus, comúnmente presentes en muestras respiratorias como virus sincicial respiratorio, metapneumovirus, adenovirus, parainfluenza, rinovirus, enterovirus y virus de influenza, empleando las regiones más conservadas dentro de cada genoma viral e identificando los subtipos virales empleando regiones variables que puedan subtipificar.
- Estandarizar estas metodologías de qRT-PCR usando Evagreen como colorante en un formato múltiple, empleando el sistema de arreglos de fluidos que permiten la amplificación y detección de 48 diferentes blancos de 48 distintas muestras a la vez.
- Validar estas metodologías al compararlas con RT-PCR convencionales y/o metodologías de detección múltiple de microorganismos como es la plataforma SeeGen, usando paneles de muestras clínicas y plásmidos para establecer sensibilidad y especificidad de las mismas.
- Comprobar los resultados obtenidos mediante la caracterización genómica a través de secuenciación convencional de los virus detectados.

5. HIPÓTESIS

- Si se estandariza e implementa una nueva metodología molecular como la de nanofluidos, la cual puede identificar y tipificar de diferentes virus respiratorios, entonces se podrá realizar el diagnóstico de los pacientes que ingresen al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), con infección respiratoria aguda en menor tiempo y a bajo costo.

6. MATERIALES Y METODOLOGÍA.

6.1. Diseño de Iniciadores

En la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y en el caso de influenza en “Influenza Virus Resource, Information, Search and Analysis” (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU). Se descargaron las secuencias consenso de los virus respiratorios en formato fasta. Con el empleo del Software mega 4, principalmente diseñamos los iniciadores de alrededor de 20 nucleótidos de los sitios más conservados, calculando una Tm aproximada de 60°C con base a su información genética, evitando la formación de dímeros entre ellos, o una auto complementariedad.²³

6.2. Muestras clínicas

Se tomó muestras respiratorias (n=461), tanto hisopados nasofaríngeos, como lavados bronquio alveolares, de pacientes que ingresaron al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y se les diagnosticó neumonía adquirida de la comunidad, sospecha de influenza y en caso de los pacientes pediátricos, también se tomaron con crisis asmáticas y bronquiolitis.

Un hisopo de algodón se le introduce a la persona por la nariz en paralelo a la encía, hasta los cornetes, se gira lentamente y se extrae, colocando el hisopo en un tubo con medio de transporte que está compuesto por 5% de albumina bovina, Gentamicina 4 mg/mL, Penicilina/Estreptomina (50,000U/50,000µg), Fungizona (1mg/mL), NaHCO₃ al 7.5%, solución balanceada de Hanks. La solución se ajusta al pH 7.0-7.2, previamente esterilizada por filtración. Se realizan alícuotas de 0.5ml y se guardan a -80°C.

6.3. Extracción de ácidos nucleicos.

La extracción de ácidos nucleicos se realizó tanto de forma manual, como de forma automatizada dependiendo del número de muestras a procesar.

6.3.1. Extracción de ácidos nucleicos de forma manual con el kit de QIAGEN QIAamp® MinElute® Virus Spin.

Comprende 4 pasos: lisis, unión, lavado y elución. Las muestras son lisadas a 50°C. La lisis se lleva a cabo en presencia QIAGEN proteasa y Buffer AL, el cual tienen la función de la inactivación de RNasa y el RNA acarreador tiene la función de mejorar la unión de los ácidos nucleicos con la membrana QIamp. Las condiciones de unión son mejoradas agregando etanol para optimizar la unión de DNA y RNA a la membrana de sílice-gel. Para remover todos los contaminantes se lava con dos amortiguador AW1 y AW2 y por último la elución se realiza con un volumen de 50µl del amortiguador AVE, para obtener una concentración adecuada de ácidos nucleicos. Para nuestra reacción RT-PCR se requiere una concentración elevada para incrementar la sensibilidad.²⁸

6.3.2. Extracción de ácidos nucleicos de forma automatizada por Magna Pure LC® Total Nucleic Acid Isolation (Hoffmann- La Roche).

La cual se basa en la tecnología de perlas magnéticas. Las muestras son lisadas por incubación con el amortiguador Lysis/Binding que contiene sales caotrópicas y Proteínasa K que hace la digestión de proteínas. Una vez lisada la muestra los ácidos nucleicos se une a las perlas magnéticas (MGP's) debidos a las condiciones de las sales caotrópicas. Las MGP's unidas a los ácidos nucleicos son separadas del lisado residual magnéticamente. Posteriormente se remueven las impurezas como proteínas (nucleasas), membranas celulares e inhibidores de PCR y se reduce la concentración de sales caotrópicas, con el amortiguador de lavado. Finalmente el total de ácidos nucleicos es separado de las MGPs por el buffer de elución.²⁵

6.4. Estandarización de condiciones de amplificación.

6.4.1. Preparación de iniciadores.

Los iniciadores específicos para cada virus se prepararon a una concentración stock de 200 μM , posteriormente se preparó una solución de trabajo de 40 μM .

Se tomaron 10 μl de la concentración de 40 μM de cada uno de los iniciadores forward y reverse para la realización de un total de 48 ensayos a una concentración de 20 μM .

Para realizar el pre-amplificado de las muestras clínicas se realizó un pool, el cual consiste en una mezcla de todos los iniciadores; de cada iniciador a 40 μM se tomó 0.5 μl llevando a un volumen final de 100 μl con el buffer de suspensión de DNA 1X (TE) y a una concentración final de 0.2 μM .

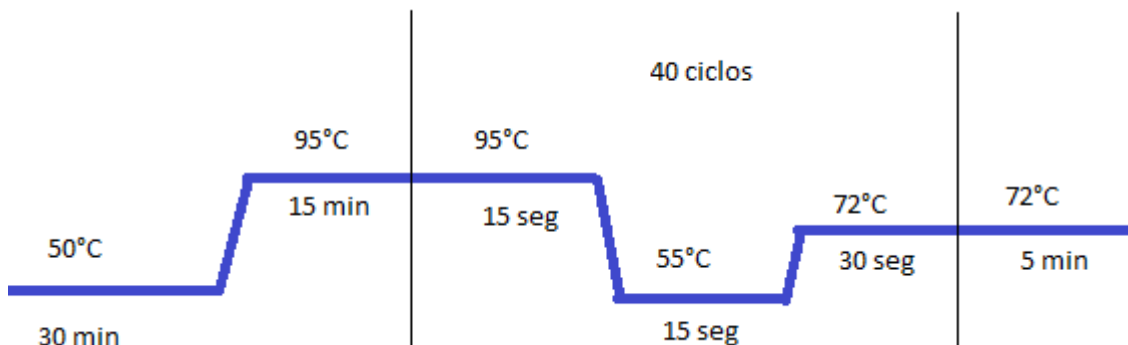
6.4.2. Controles.

Para estandarizar los iniciadores diseñados, se utilizaron muestras ya previamente tipificadas con el equipo de Luminex xTAG Respiratory Viral Panel (RVP) (Canada 2010) o de virus aislados de cultivos donados por los laboratorios de virus respiratorios del INER y del InDRE. En la tabla No. 3 se muestra las condiciones de RT-PCR con el kit One step RT-PCR (Qiagen, USA).

Reactivo	1 Rx (μL)	Concentración final
Buffer 5X	5	1
dNTP's mix (10mM)	1	0.4 mM
RT enzyme mix	1	
Ensayo específico forward + reverse (20 μM)	1	0.4 μM
H ₂ O	12	
Ácidos nucleicos	5	
Vol. total	25	

Tabla No.3. Condiciones de RT-PCR con el kit one step.

Condiciones del termociclador:



A 10 μ l del producto de la reacción se le adicionó 0.5 μ l del colorante Evagreen y se realizó una rampa de disociación HRM en el Rotor-Gene® (QIAGEN, USA). De 75°C a 95°C.³¹

6.4.3. Electroforesis en gel de agarosa

Para la comprobación de la amplificación se realiza una electroforesis basada en la carga neta del DNA, del producto de la RT-PCR, la cual se somete a un campo eléctrico, debido a los fosfatos con carga negativa migrarán al polo positivo y dependiendo del tamaño de las moléculas será su velocidad de migración.

Se realizó un gel de agarosa al 2% con buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, como agente intercalante en el DNA se utilizó Bromuro de Etidio y el marcador de peso molecular de 1Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen, 2011). La electroforesis se llevó a cabo a 100 volts durante 40 minutos, visualizando el DNA bajo luz UV.

6.5. Estandarización de condiciones para la amplificación múltiples en el equipo de nanofluidos fluidigm (Biomark, USA).

6.5.1. Pre-amplificado de las muestras clínicas con el kit One Step RT-PCR (Qiagen, USA)

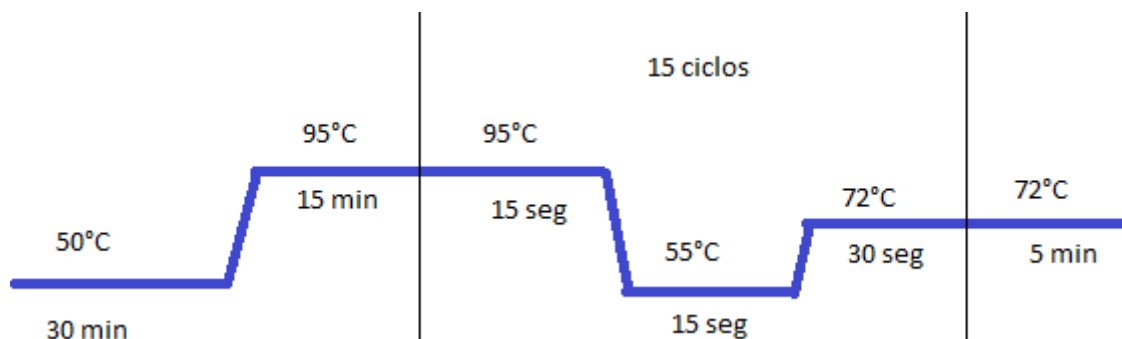
Debido a que la mayoría de los virus respiratorios su genoma está compuesto por RNA, es necesario sintetizar cDNA y un posterior paso de amplificación para aumentar el número de copias y así facilitar su detección. Esto se realizó con el kit de One step RT-PCR (Qiagen, USA).²⁴ y con el pool de iniciadores preparado en

el paso 6.4.1. En la tabla No. 4 se muestra las condiciones de RT-PCR Pre amplificación.

Reactivo	1 Rx (μL)	Concentración final
Buffer 5X	5	1
dNTP's mix (10mM)	1	0.4 mM
RT enzyme mix	1	
Pool de iniciadores	1	8nM
H ₂ O	12	
Ácidos nucleicos	5	
Vol. total	25	

Tabla No. 4. Condiciones de RT-PCR de pre amplificación con el kit one step.

Condiciones en el termociclador:



6.6. Estandarización de iniciadores con la mezcla de reacción TaqMan Gene Expression Master Mix (AppliedBiosystems, USA) y EvaGreen.

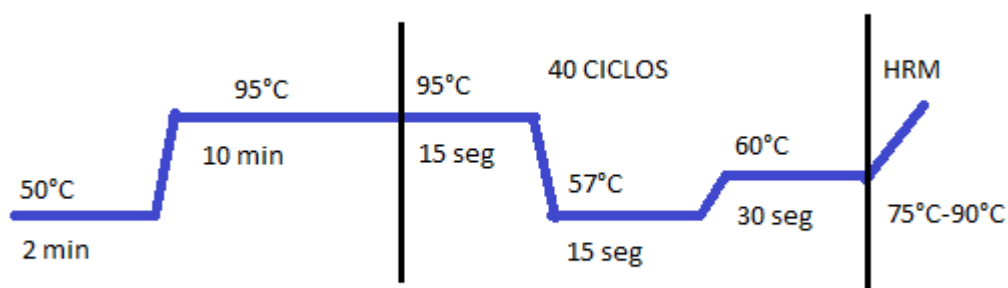
De acuerdo a las indicaciones de uso del equipo utilizamos la mezcla de reacción TaqMan Gene Expression, para realizar la estandarización de los iniciadores y conocer las condiciones óptimas de amplificación. De forma inicial realizamos un ensayo utilizando este mix en el equipo Rotor-Gene® (QIAGEN, USA), el cual presenta condiciones similares al equipo de nanofluidos.

Se tomó 5 μl del pre-amplificado (paso 6.7) y se emplearon las condiciones que se señalan en la tabla No. 5.

REACTIVOS	VOLUMEN (μL)
2X TaqMan Gene Expression Master Mix	10
20X EvaGreen DNA	1
H ₂ O	3
Primer F+R	1
Pre-amplificado	5
Volume Final	20

Tabla No. 5. Condiciones de amplificaciones con el buffer TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA) y EvaGreen.

La RT-PCR se realizó en Rotor-Gene® (QIAGEN, USA), bajo estas condiciones:



6.7. Estandarización en el equipo Fluidigm BioMark™ (San Francisco, USA).

6.7.1. Detección de virus respiratorios utilizando la mezcla de reacción 2X TaqMan Gene Expression Master Mix.

Una vez que se estandarizaron las condiciones de amplificación con la mezcla de reacción 2X TaqMan en el Rotor-Gene, se procedió a la estandarización en el equipo fluidigm Biomark, en donde se realizaron las 2304 reacciones en un mismo ensayo.

Siguiendo las condiciones que marca el proveedor (Tabla No. 6 y 7). Las muestras y los ensayos se preparan por separado en placas de 96 pozos.

6.7.1.1. Preparación de muestras.

REACTIVOS	Volumen por pozo μl	Volumen con exceso μl	Volumen para 60 ensayos μl
2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)	2.5	5	300
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm)	0.25	0.5	30
20X Eva Green DNA binding dye (Biotium)	0.25	0.5	30
Buffer de suspensión de DNA 1X	0.75	1.5	90
cDNA	1.25	2.5	
total	5	10	

Tabla No. 6. Condiciones de muestras en el equipo fluidigm.

6.7.1.2. Preparación de ensayos.

Reactivos	Volumen por pozo μl	Volumen con exceso μl	Volumen para 60 ensayos μl
2X Assay Loading Reagent (Fluidigm)	2.5	5	300
1X Buffer DNA Suspensión (TE)	0.25	0.5	30
Mezcla de los iniciadores Foward y Reverse 20 μM	2.25	4.5	
Total	5	10	

Tabla No.7. Condiciones de ensayos en el equipo fluidigm.

6.7.1.3. Inyectar el fluido control (control line fluid).

En cada acumulador del chip se inyecta el fluido control se coloca en el IFC controlador MX para 48.48 arreglos dinámicos. Como se muestra en la figura 22.

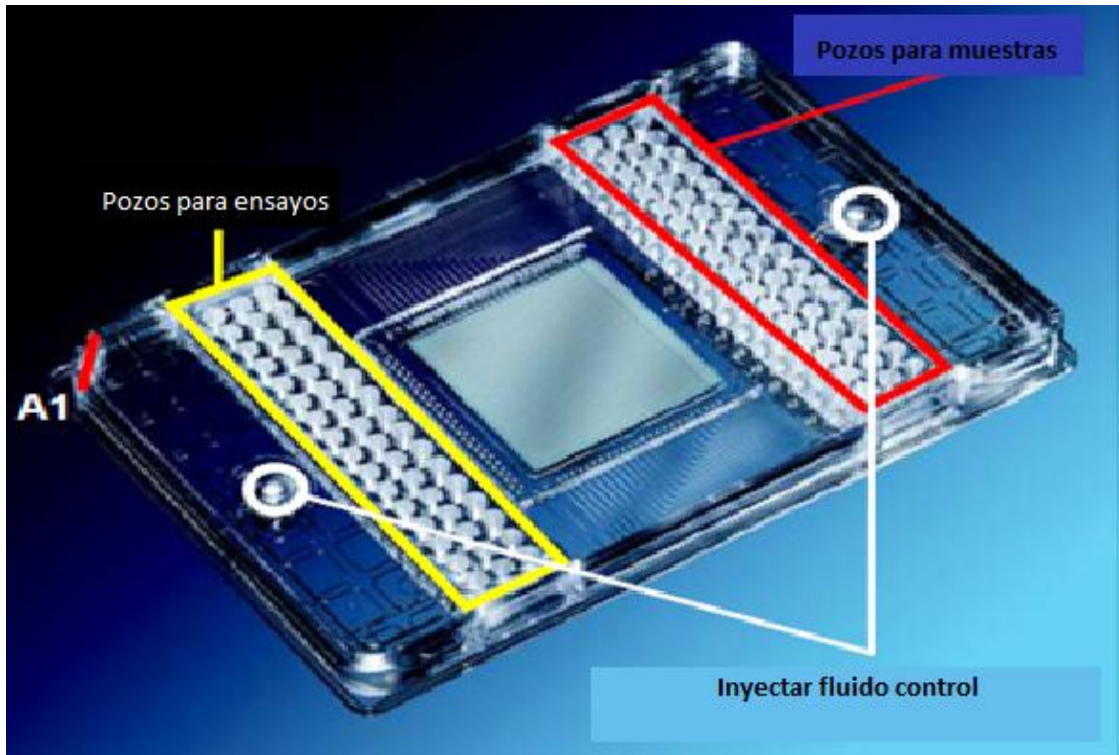


Figura No. 22. Forma de inyección tanto muestras como ensayos en el chip

6.7.1.4. Colocación las muestras y los ensayos en el chip.

Se colocó 5 μl de cada ensayo y 5 μl de cada muestra en sus respectivos pozos del chip, como se muestra en la figura 23 A y B.

MUESTRAS						ENSAVOS						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	Ricornavirus 1	hPV.1 (9) 2	VSR B 3	Corona HTKU1 4	Bocavirus 5	HSN1 op2 6
B	7	8	9	10	11	12	Rino A y C 7	hPV.1 (10) 8	VSR A y B 9	Corona OC43 10	INFB F+R 11	Coron avirus NL63 12
C	13	14	15	16	17	18	Rino B 13	hPV.1 (11) 14	Metapneumovir us 1(19) 15	Corp SARS 16	Hantavirus 17	RNAs a P 18
D	19	20	21	NTC 22	23	24	Intero- echo y coxak 19	hPV.1 (12) 20	Metapneumovirus 2 (20) 21	Corp SARS 22	INFA. graI. 23	Inf. gen H 24
E	25	26	27	28	29	30	Enterio- coxa 25	hPV.2 26	Coronavirus Universal 1 27	Adenovirus B,D,E. 28	H1N1 cat/2009 29	Inf. gen M 30
F	31	32	33	34	35	36	Echo 31	hPV.3 32	Coronavirus Universal 2 33	Adenovirus c 34	Inf. H5N2 35	Bocav irus 36
G	37	38	33	40	41	42	Coxsa 37	hPV.4 38	Corona NL63 39	Bocavirus 40	INF B. graI. 41	H swine 42
H	43	44	45	46	47	48	hPV.1 y 3 43	VSR A 44	Corona 229E 45	Bocavirus 2 46	HSN1 op1 47	Inf. A M2 48

Figura No. 23 (A). Distribución de los ensayos (color amarillo) y de muestras (color rojo) en la placa de 96 pozos.

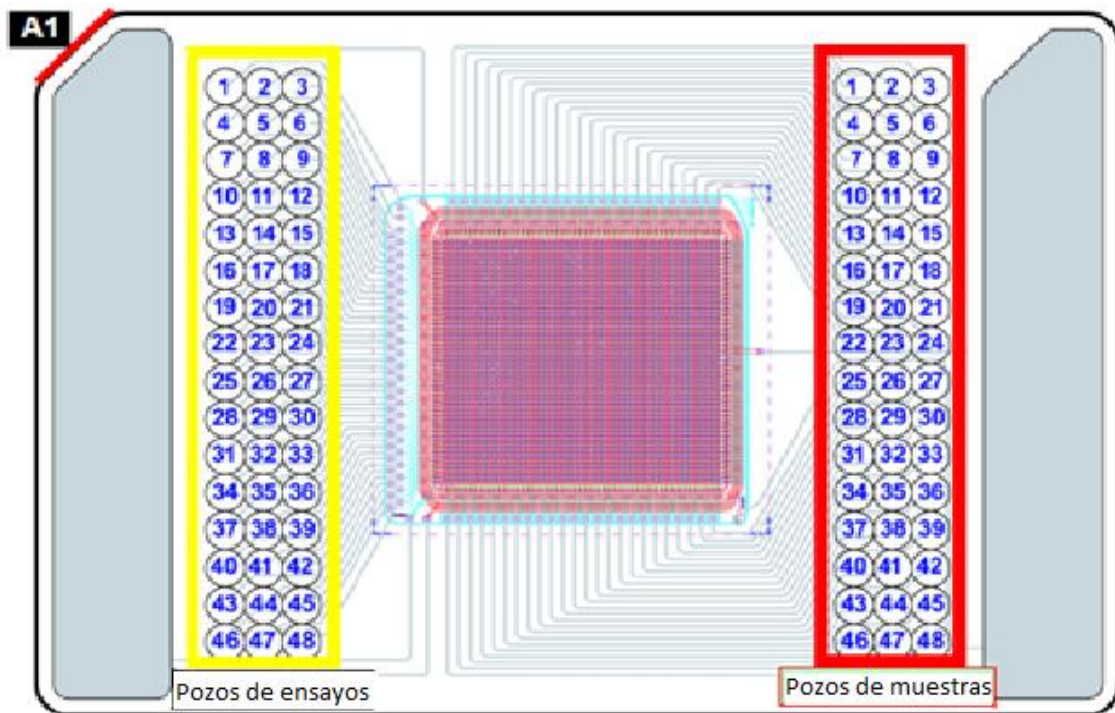
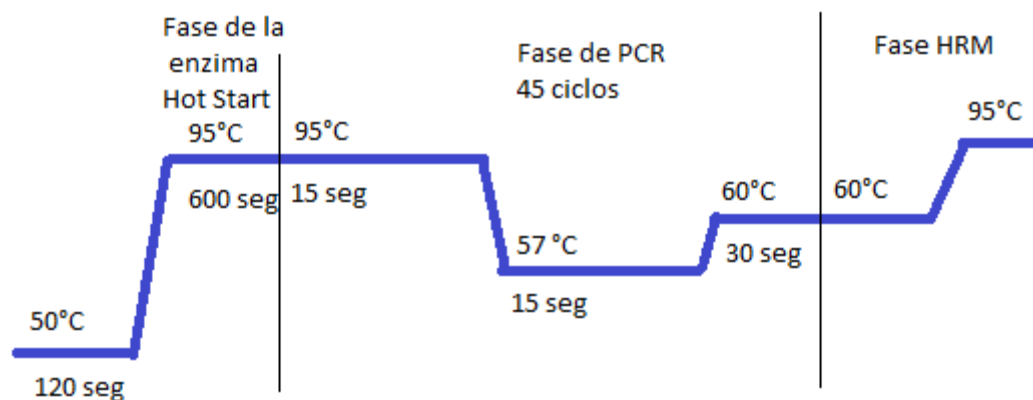


Figura 23(B). Distribución de ensayos (color amarillo) y muestras (color rojo) en el chip.

Se regresó el chip al controlador IFC para cargar y mezclar tanto las muestras como ensayos. Una vez terminada el Load Mix, se colocó el chip al equipo Biomark Fluidigm con las siguientes condiciones de PCR y HRM.



Para el análisis de los resultados se utilizó el software Real-Time PCR Analysis.

6.7.2. Amplificación de virus respiratorios utilizando la mezcla de reacción SsoFast™ EvaGreen Supermix with Low Rox(BioRad) y con tratamiento de Exonucleasa.

Otra opción que sugiere el proveedor es utilizar la mezcla de reacción SsoFast™ EvaGreen Supermix with Low Rox(BioRad) y tratamiento con Exonucleasa (Exo I). A 25µl del pre-amplificado se le adiciona 0.8µl de la Exonucleasa marca USB (10u/µl) y se incuba a las siguientes condiciones: 37°C 15 minutos, 80°C 15 min.

6.7.2.1. Preparación de muestras

En la tabla 8 se muestra las condiciones de las muestras.

Componente	Volumen por pozo µL	Volumen con exceso	Volumen para 60 ensayos
2X master mix SSofast Biorad	2.5	3.5	210
20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	0.25	0.35	21
Muestra tratada con exonucleasa I	2.25	3.15	3.85
Volumen total	5	7	

Tabla No. 8. Condiciones de muestras en el equipo fluidigm con el buffer 2X master mix SSofast.

6.7.2.2. Preparación de ensayos.

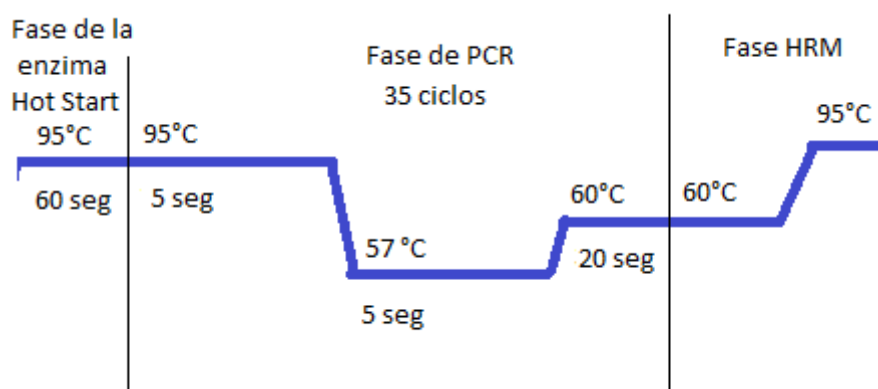
En la siguiente tabla se señalan las condiciones de los ensayos (tabla 9).

Componente	Volumen por pozo	Volumen con exceso	Volumen para 60 ensayos
2X Assay Loading	2.5	3.5	210
Buffer de suspensión de DNA 1X (TE)	1.25	1.75	105
20 µM de Iniciadores Forward and Reverse	1.25	1.75	--
Total	5	7	--

Tabla No. 9. Condiciones de ensayos en el equipo fluidigm con el buffer 2X master mix SSofast.

La inyección del fluido control, las muestras y los ensayos se realizaron de la misma manera que en el paso anterior.

Las condiciones de PCR y HRM fueron las siguientes:



6.7.3. Amplificación de virus respiratorios utilizando la mezcla de reacción SsoFast™ EvaGreen Supermix with Low Rox(BioRad) y sin tratamiento de Exonucleasa.

La estandarización se realizó de forma alternativa sin tratamiento con Exonucleasa, pero manteniendo las mismas condiciones mostradas anteriormente.

6.7.3.1. Preparación de las muestras (tabla 10).³⁰

Componente	Volumen por pozo μL	Volumen con exceso	Volumen para 60 ensayos
2X master mix SSfast Biorad	2.5	3.5	210
20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	0.25	0.35	21
cDNA	2.25	3.15	3.85
Volumen total	5	7	

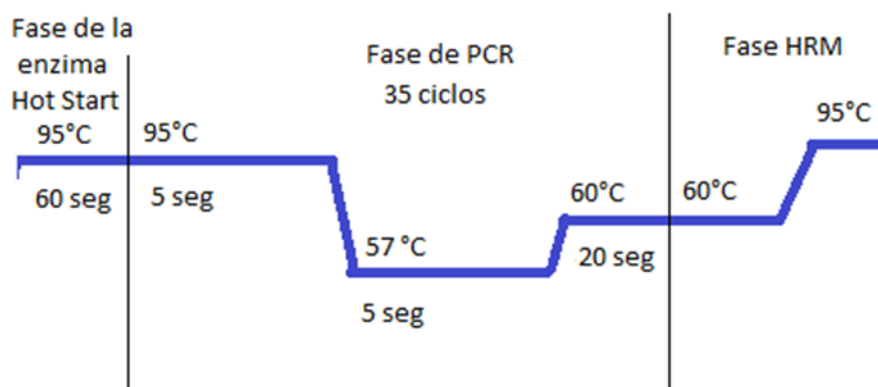
Tabla No. 10. Condiciones de muestras en el equipo fluidigm con el buffer 2X master mix SSofast sin tratamiento con exonucleasa.

6.7.3.2. Preparación de los ensayos (tabla 11).

Componente	Volumen por pozo	Volumen con exceso	Volumen para 60 ensayos
2X Assay Loading Reagent	2.5	3.5	210
Buffer de suspensión de DNA (TE)	1.25	1.75	105
20 μM de Iniciadores Forward and Reverse	1.25	1.75	--
Total	5	7	--

Tabla No. 11. Condiciones de ensayos en el equipo fluidigm con el buffer 2X master mix SSofast.

Las condiciones de PCR y HRM fueron las siguientes:



6.8. Prueba de sensibilidad del equipo Fluidigm Biomark.

Para determinar el límite de detección del equipo, utilizamos el plásmido pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen, 2006) con un tamaño de 4000 nt, que previamente se le integró el fragmento del gen de Neuraminidasa (N) que consta de un tamaño de 1400 nt. Esto fue realizado clonando bacterias E. coli competentes. Tanto el vector como las bacterias son parte del kit TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, 2006).

Se determinó la concentración del plásmido espectrofotométricamente con el equipo NanoDrop ND1000 UV-Vis (Thermo scientific 2011) y de ahí se realizaron diluciones seriales de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 moléculas.

Por duplicado de cada dilución se introdujo al equipo para probar cual era el límite de detección, utilizando las mismas condiciones del paso anterior.

6.9. Prueba de especificidad del equipo Fluidigm Biomark.

Se emplearon muestras clínicas que previamente fueron caracterizadas por el equipo Luminex x-TAG (Toronto, Canada 2010), Fluidigm (Biomark), y sobrenadante de cultivo viral proporcionado por el InDRE o del laboratorio de virus respiratorios del INER para diferentes virus.

Contamos con controles para: Influenza H1N1 2009, coronavirus 229E, Coronavirus HKU, metapneumovirus, parainfluenza 3, bocavirus, Entero/Rino, (muestras previamente caracterizadas) VSR A, VSR B, adenovirus (donados del laboratorio de virología de INER), influenza B y H3N2 (donado del InDre). Cada control se metió por triplicado para determinar si amplificaban solo con los iniciadores que eran específicos para estos controles.

6.10. Secuenciación

6.10.1. Condiciones de secuenciación con la mezcla de reacción Big Dye® terminator v3.1 (Applied Biosystems).

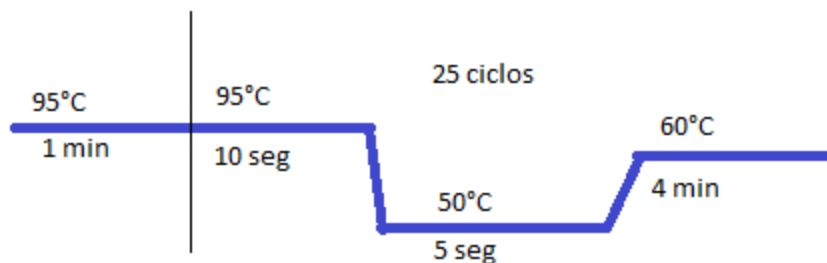
Con el propósito de validar los resultados obtenidos por el equipo de nanofluidos y de caracterizar de forma molecular las muestras que fueron positivas a algún virus, realizamos secuenciación por la técnica de Sanger.

De las muestras que amplificaron para VSR A y B, bocavirus, rinovirus, enterovirus, coronavirus 229E, coronavirus HKU1 y MpV se realizó la secuenciación con las condiciones de la tabla No. 12:

Reactivo	Volumen (µl)
Big Dye® terminator v3.1 (Applied Biosystems)	2
Primer foward (2µM)	1
Primer reverse (2µM)	1
DNA	1

Tabla No.12. Condiciones para la reacción de secuenciación.

Condiciones del Termociclador:



6.10.2. Purificación de la reacción de secuenciación.

La purificación de la reacción de secuenciación se realizó agregando 12.5 µl de etanol al 100% y 0.5µl de acetato de sodio 3M a pH 5.2 para la precipitación del DNA. Con lavados de etanol al 70% y finalmente se resuspendió con 20µl de formamida.

6.10.3. Obtención y análisis de secuencias.

La secuenciación se realizó en el equipo ABI Prism® 3100 –Avant Genetic analizar (Applied biosystems, 2011) utilizando el polímero POP-6 en condiciones estándar.

Los electroferogramas obtenidos se analizaron en el software Mega 4 y se realizó la comparación con la base de datos del NCBI para la comprobación del diagnóstico.

6.11. Diagnóstico de 16 virus respiratorios por Anyplex™ II.

Para validar nuestra metodología comparamos los resultados obtenidos por el equipo de fluidigm con otra tecnología que detecta solo 16 virus respiratorios.

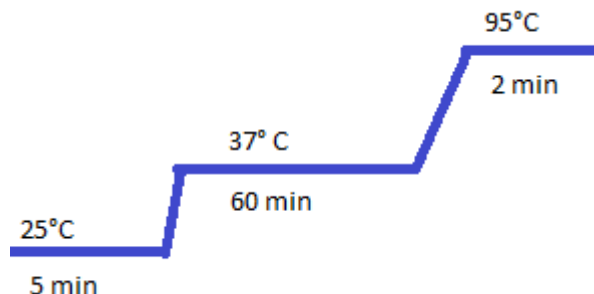
Se seleccionaron muestras con resultados positivos y negativos por nuestra técnica.

Se realizó la extracción y amplificación de acuerdo a las sugerencias del proveedor (Tabla 13).

Reactivos	Volumen (μl)
Premix	10
Hexámeros	2
Ácidos nucleicos	8
Volumen total	20

Tabla No. 13. Condiciones de RT-PCR por el método de Seegene Anyplex II.

Condiciones del termociclador:



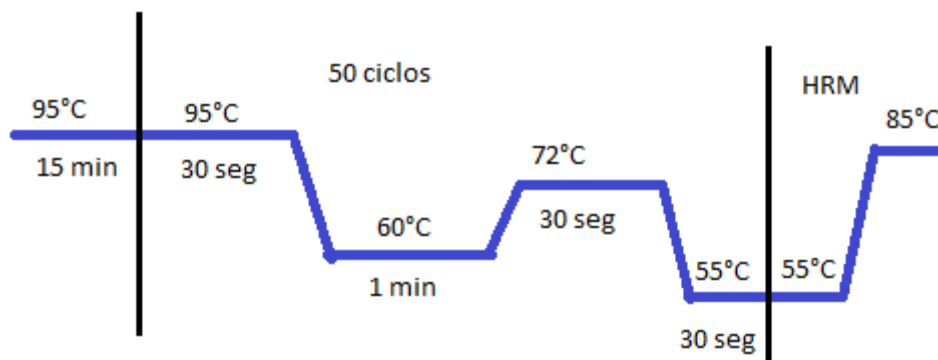
La preparación del PCR en tiempo real se realizó de la siguiente manera:

Reactivos	Volumen (μl)
5X RV16 A OM o 5X RV16 B OM	4
8-MOP	4
5X Anyplex PCR master mix	4
cDNA de las muestras o controles	8
Volume total	20

Tabla No. 14. Condiciones de amplificación de PCR en tiempo real por Seegene Anyplex II.

El kit cuenta con 2 tubos de controles positivos. El control positivo A tiene plásmidos de PIV4, AdV, PIV1, PIV2, PIV3, influenza A, influenza B, rinovirus. El control positivo B tiene para MpV, HBoV, Coronavirus 229E, coronavirus NL63, coronavirus OC43, RSV A, RSVB y enterovirus.²⁹

El PCR en tiempo real se realizó en el equipo CFX96™ (Bio-Rad), con las siguientes condiciones:



7. RESULTADOS

7.1. Estudios Bioinformáticos

De acuerdo a la búsqueda bioinformática realizada, se diseñaron iniciadores para detectar las diferentes familias de virus respiratorios y en su caso subtipificar los virus de cada familia. En la figura 24 se ejemplifica el iniciador diseñado para el virus de influenza H1N1 pandémica. El tamaño promedio de cada iniciador fue de 20 nucleótidos y con una Tm teórica entre 60°C a 64°C. En la tabla 15 se muestran el nombre de los iniciadores, el blanco a los cuales fueron diseñados, así como el tamaño del producto de PCR a obtener.

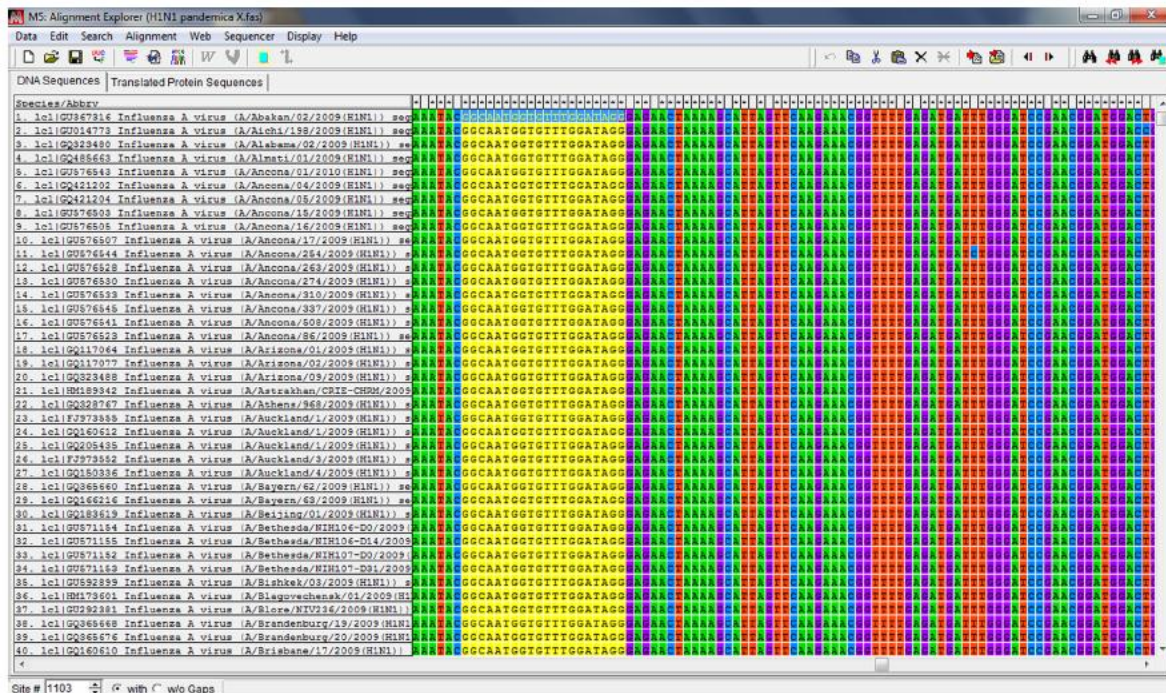


Figura No. 24. Alineación del segmento N del virus de influenza A H1N1 2009, se muestra un sitio conservado que se utilizó para diseñar un iniciador específico. Ejemplifica lo que se realizó para cada uno de los tipos y subtipos de virus respiratorios.

Tabla No. 15. Características de los pares de iniciadores utilizados para la amplificación de los tipos y subtipos de virus respiratorios.

Número de ensayo	Virus Detectados	Combinación de iniciadores	Segmento al que pertenece	Tamaño del segmento amplificado
1	Picornavirus universal	Picouni F+ picouni R	Región 5'UTR	114 Pb
2	Rhino A y C	Rhino A y C F+ Rino ABC R	Región 5'UTR	197 Pb
3	Rhino B	Rino ABC R+ rino B	Región 5'UTR	195 Pb
4	Entero-echo-coxak	Pico F+ entero- echo-cox R	Región 5'UTR	105 pb
5	Entero	Picouni F + entero R	Región 5'UTR	151 pb
6	Echo	Picouni F+ echo R	Región 5'UTR	176 pb
7	coxsakie	Picouni F+ coxsackie R	Región 5'UTR	147 pb
8	hPV 1 y 3	HPV1-3 F+ HPV1- 3 R	Hemaglutinina- Neuramidasa	167 pb
9	hPV 1	HPV1+ HPV1R	Hemaglutinina- Neuramidasa	300 pb
10	hPV 1	HPV1F+ HPV1 RB	Hemaglutinina- Neuramidasa	170 pb
11	hPV 1	HPV1+ HPV1 RB	Hemaglutinina- Neuramidasa	300 pb
12	hPV 1	HPV1 F+ HPV1 R	Hemaglutinina- Neuramidasa	160 pb
13	hPV 2	HPV2 F+ HPV2 R	Hemaglutinina- Neuramidasa	156 pb
14	hPV 3	HPV3 FB + HPV3 RB	Hemaglutinina- Neuramidasa	153 pb
15	hPV 4	HPV4 F+ HPV4 R	Polimerasa viral	202 pb
16	VRS A	RSVA F+ RSVA R	Glicoproteína G	196 pb
17	VRS B	RSVB F+ RSVB R	Glicoproteína G	248 pb
18	VRS B y A	RSV A/B F+ RSV A/B R2	Proteína NS2	281 pb
19	Metapneumovirus	Metapneumo F + Metapneumo R	Nucleocápside	169 pb
20	Metapneumovirus 2	Metapneumo F2 + Metapneumo R2	Proteína de fusión	268 pb
21	Coronavirus I	Coronavirus I F + coronavirus I R	Región UTR 5'	165 pb
22	Coronavirus II	Coronavirus II F +	ORF 1a	206 pb

		coronavirus II R		
23	Coronavirus NL63	Coronavirus NL63 F + coronavirus NL63 R	Glicoproteína estructural de superficie involucrada en el receptor de reconocimiento y entrada a la célula hospedera	200 pb
24	Coronavirus 229E	Coronavirus 229E F+ coronavirus 229E R	Proteína estructural	170 pb
25	Coronavirus HKU1	Coronavirus HKU1 F+ coronavirus HKU1 R	Gen HE	170pb
26	Coronavirus OC43	Coronavirus OC43 F+ coronavirus OC43 R	Proteína no estructural	115 pb
27	SARS-CoV	Cor-pF3 + Cor-pR1	ORF 1b	250 pb
28	SARS-CoV	CorV 154 F2 + CorV	ORF 1b	140 pb
29	Adenovirus BDE	Adenovirus BDE forw + adenovirus BCDE Rev	Gen de transcripción temprana E1A	280 pb
30	Adenovirus C	Adenovirus C F + adenovirus C R	Gen de transcripción temprana E1A	200 pb
31	Bocavirus	Bocavirus F+ bocavirus R	Gen NS1	200 pb
32	Bocavirus 2	Bocavirus 2-4 F + bocavirus 2 R	Gen NS1	170 pb
33	Bocavirus 4	Bocavirus 2-3-4F+ bocavirus 4 R	Gen VP1	267 pb
34	Hantaan	Hantavirus F+ hantavirus no pulmonar R	Segmento S	176 pb
35	Hantaan	Hantavirus F + hantavirus no pulmonar R2	Segmento S	243 pb
36	Influenza A	INFA F + INFA R	Gen M	235 pb
37	Influenza H1N1	H1N1 F1 + H1N1 R2	Gen Neuramidasa	327 pb
38	Influenza H3N2	H3N2 F + H3N2 R	Gen Neuramidasa	238 pb
39	Influenza B	INFB F + INFB R2	Gen M	165 pb

40	Influenza H5N1	H5N1 F2+ H5N1 R3	Gen Neuramidasa	200 pb
41	Influenza H5N1	H5N1 F + H5N1 R	Gen Neuramidasa	268 pb
42	Coronavirus NL63	Coronavirus NL63 F2 + coronavirus NL63 R	Glicoproteína estructural de superficie involucrada en el receptor de reconocimiento y entrada a la célula hospedera	354 pb
43	RNAasa p	RNAasa P F+ RNAasa P R	Gen constitutivo	100 pb
44	Gen H (Influenza A)	HF+HR	Gen H	180pb
45	Gen M (Influenza A)	MF + MR	Gen M	180 pb
46	Bocavirus 3	Boca 2-3 R + Boca 3 F	Gen VP1	200 pb
47	H swine (Influenza A)	Swine H1 R + Swine H1 F	Gen Hemaglutinina	160 pb
48	Infa M2 (Influenza A)	Infa M2 F + Infa M2 R	Gen M	150 pb

7.2. Estandarización y asignación de la mejor combinación de iniciadores para cada subtipo y tipo de los diferentes virus respiratorios empleando RT-PCR en tiempo real.

7.2.1. Estandarización de iniciadores con el kit de RT-PCR One Step QIAGEN®.

Para estandarizar las condiciones de amplificación de cada uno de los iniciadores diseñados, se realizó una reacción de RT-PCR usando el kit One Step RT-PCR (QIAGEN). Como ejemplo se muestra la estandarización realizada con los iniciadores para la detección del virus de parainfluenza 3.

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% para observar el tamaño y la intensidad de la banda, como se muestra en la figura 25.

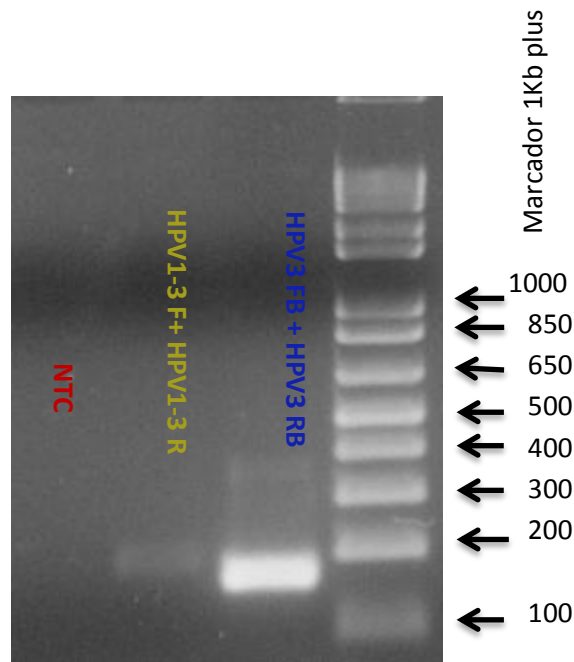


Figura No. 25. Gel de agarosa. En el primer carril se observa el control negativo (NTC), en el segundo carril se muestra la banda correspondiente al ensayo HPV1-3 F+ HPV1-3 R, el tercer carril es el ensayo HPV3 FB + HPV3 RB y el cuarto carril es el marcador de peso molecular de 1Kb plus.

La combinación de HPV 3 FB + HPV 3 RB dio como resultado una mejor eficiencia de amplificación evidenciada por una banda de mayor intensidad y su tamaño aproximado es de 167 pb, mientras que la combinación de iniciadores HPV1-3F + HPV1-3R la banda es menos intensa y el tamaño de la banda esperada es de 176 pb. Lo cual podemos decir que el mejor par de iniciadores para la amplificación de parainfluenza 3 es HPV 3 FB + HPV 3.

Para caracterizar y conocer el valor de la temperatura de disociación (T_m), se utilizó la técnica de disociación de alta resolución (HRM). En la figura 26 se muestra la gráfica de la temperatura contra la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura para el control de parainfluenza 3. En la cual tenemos que para el ensayo 8 (HPV1-3 F+ HPV1-3 R) el valor de T_m es de 79.80°C y para ensayo 14 (HPV3 FB + HPV3 RB) el valor de T_m es de 78.52°C.

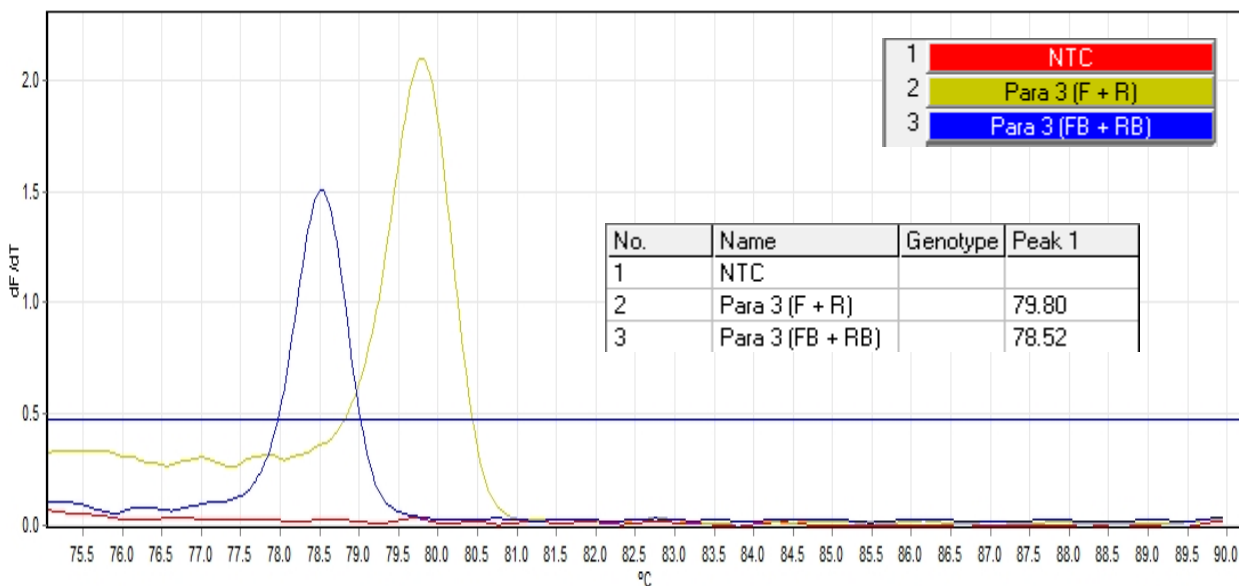


Figura No. 26. Gráfica de Tm de la muestra control de parainfluenza 3 empleando dos combinaciones de iniciadores: HPV1-3 F+ HPV1-3 R en color amarillo y en color azul el ensayo HPV3 FB + HPV3 RB.

Este ensayo nos permitió conocer las condiciones de amplificación de cada par de iniciadores y caracterizar la Tm de cada producto de amplificación, estos datos serán necesarios para el siguiente paso de estandarización de la técnica.

7.2.2. Estandarización de las condiciones de amplificación con la mezcla de reacción TaqMan® gene Expression Master Mix (Applied Biosystems).

Para realizar la estandarización de las condiciones de amplificación en el equipo Biomark (Fluidigm), primero se realizaron de forma individual las amplificaciones de cada par de iniciadores en el equipo Rotor-Gene (QIAGEN), utilizando la mezcla de reacción TaqMan gene Expression. Para esta amplificación se realizó una innovadora estrategia en la se realizó una mezcla con todos los iniciadores que se mencionan en la tabla 15, a una concentración final de 200nM cada uno. Posteriormente se realizó la Retrotranscripción (RT), en el caso de los virus de RNA y seguida con 15 ciclos de amplificación para ambos tipos de virus RNA y DNA.

En la figura 27 se ejemplifica la estandarización de los iniciadores contra el virus parainfluenza 3; donde se observa la amplificación en tiempo real del pre-amplificado utilizando como control positivos RNA del virus de PIV 3 y como

control negativo DNA de adenovirus. En la figura se muestra que solo el control positivo de PIV 3 amplificó con el par de iniciadores HPV 3 FB + HPV 3.

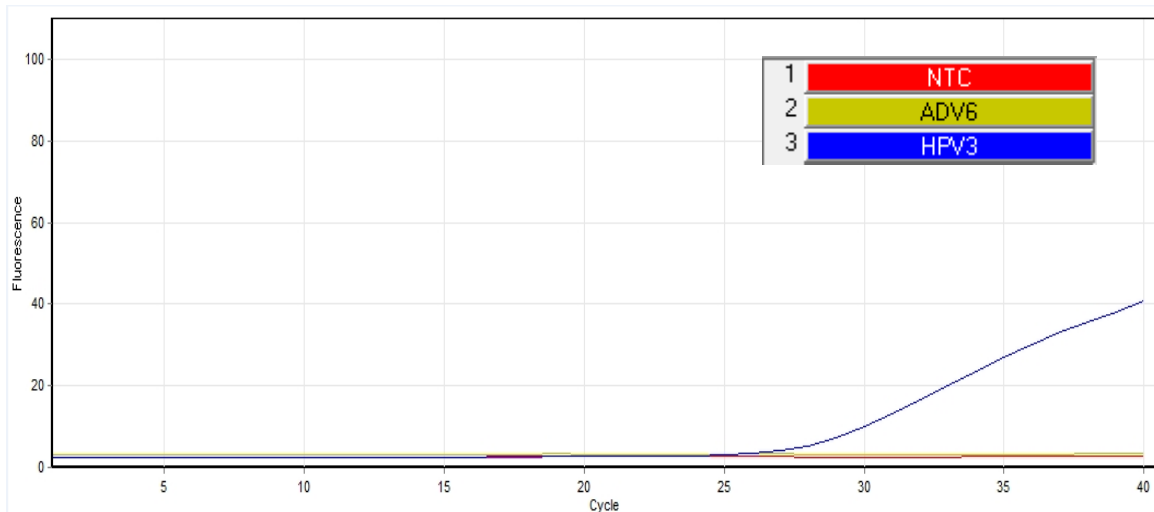


Figura No. 27. Gráfica de Rt-PCR en tiempo real de PIV3. Amplificación del control positivo de PIV3 (azul) con el ensayo 14 (Tabla X).

Posteriormente para caracterizar el amplificado obtenido se empleó la técnica de disociación de DNA de alta resolución o HRM. En la figura 28 se muestra la gráfica de Tm, utilizando el colorante Evagreen como agente intercalante para obtener el valor de Temperatura de melting (Tm), del producto de amplificación. De acuerdo a este ensayo el valor de la Tm con los iniciadores es de 76.03°C.

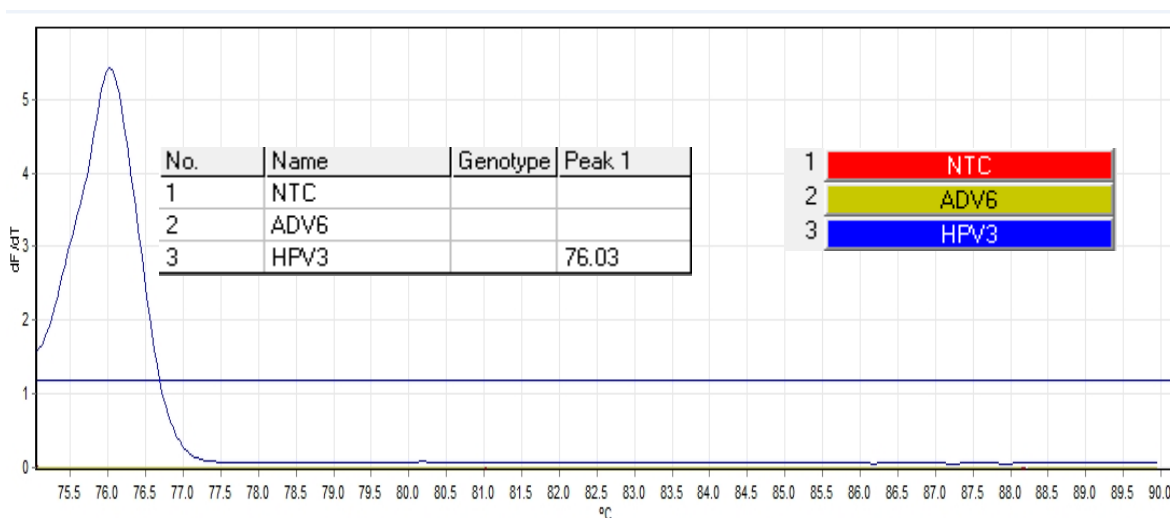


Figura No. 28. Gráfica de Tm de PIV 3. De color azul RNA control de parainfluenza 3 con el ensayo HPV 3 FB + HPV 3, de color amarillos DNA control de adenovirus y en rojo el control negativo (NTC).

Para comprobar la amplificación con este par de iniciadores se realizó una electroforesis de los productos obtenidos en un gel de agarosa al 2%, como se muestra en la figura 29

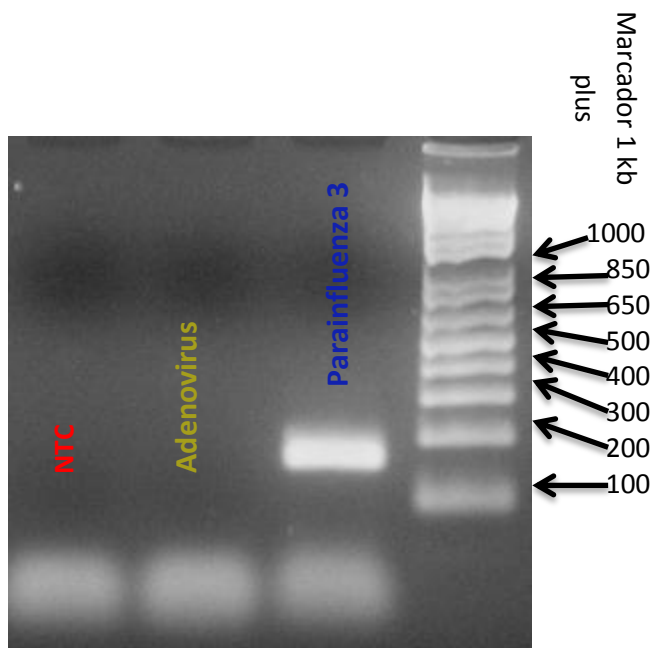


Figura No.29. Gel de agarosa para el control de PIV 3 con el par de iniciadores HPV 3 FB + HPV 3 RB. En el primer carril se observa el control de reactivos (NTC), en el segundo carril se encuentra al control negativo de adenovirus, en el tercer carril se encuentra el control de parainfluenza y en el cuarto carril se observa el marcador de peso molecular 1kb plus.

Se observó un producto de amplificación 167 pb con el control de parainfluenza 3 y no con los controles reactivos, ni con el control negativo de adenovirus.

Estos resultados demostraron que la estrategia de preamplificación con la mezcla de todos los iniciadores y posterior amplificación con iniciadores específicos, fue adecuada y que puede ser empleada en la plataforma de tiempo real Biomark que presenta condiciones similares de amplificación.

7.3. Estandarización y asignación de las mejores condiciones de amplificación de los diferentes virus respiratorios empleando RT-PCR en tiempo real con el equipo Fluidigm (Biomark).

7.3.1. Amplificación de virus respiratorios utilizando la mezcla de reacción TaqMan® gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) en el equipo Biomark (Fluidigm).

Una vez que se estandarizó las condiciones de amplificación con la mezcla de reacción TaqMan gene Expression en el equipo Rotor-Gene, ahora lo realizamos en el equipo Biomark, utilizando de igual manera el pre-amplificado obtenido con toda la mezcla de iniciadores. La ventaja de esta nueva plataforma es que podemos enfrentar 48 muestras a 48 diferentes blancos al mismo tiempo.

Utilizamos muestras clínicas como controles previamente caracterizados o sobrenadantes de cultivo viral. En la figura 30 ejemplificamos la amplificación de bocavirus con el par de iniciadores bocavirus R + bocavirus F en una muestra clínica por triplicado. Los resultados mostraron que bajo estas condiciones no se logra tener una buena reproducibilidad, como se puede observar en la figura 30 la amplificación de la misma muestra por triplicado no empieza en el mismo ciclo y no alcanzan los tres el mismo umbral de detección (Ct).

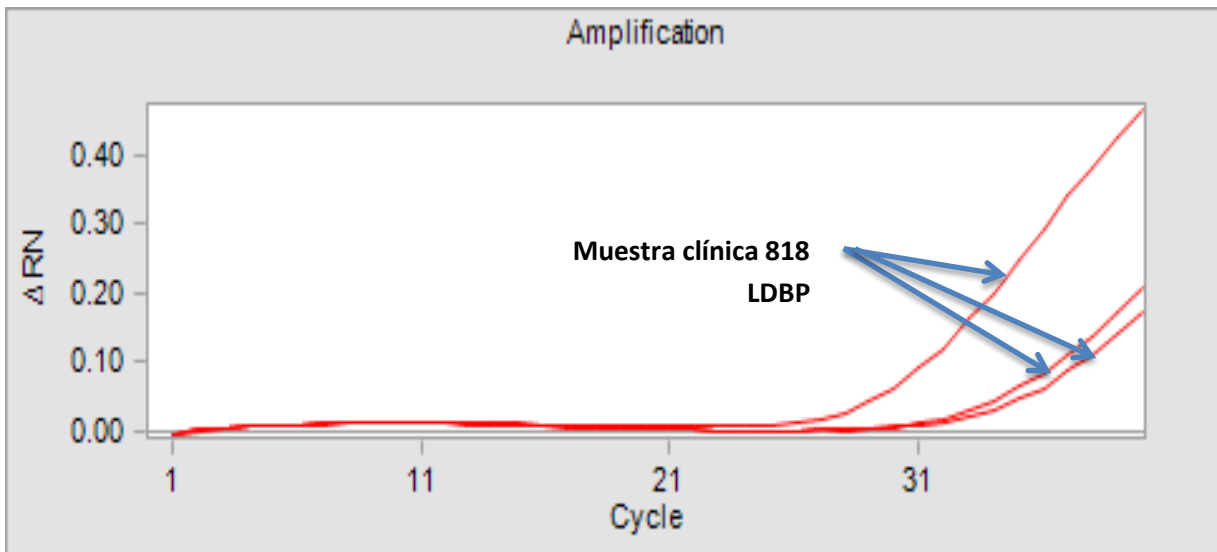


Figura No.30. Gráfica de amplificación en tiempo real de bocavirus . Utilizando como control la muestra clínica 818 LDBP para la amplificación de bocavirus con los iniciadores bocavirus R+ bocavirus F en rojo.

Se determinó la TM de los productos de amplificación presentando una temperatura de 78.02 ° C (Figura 31).

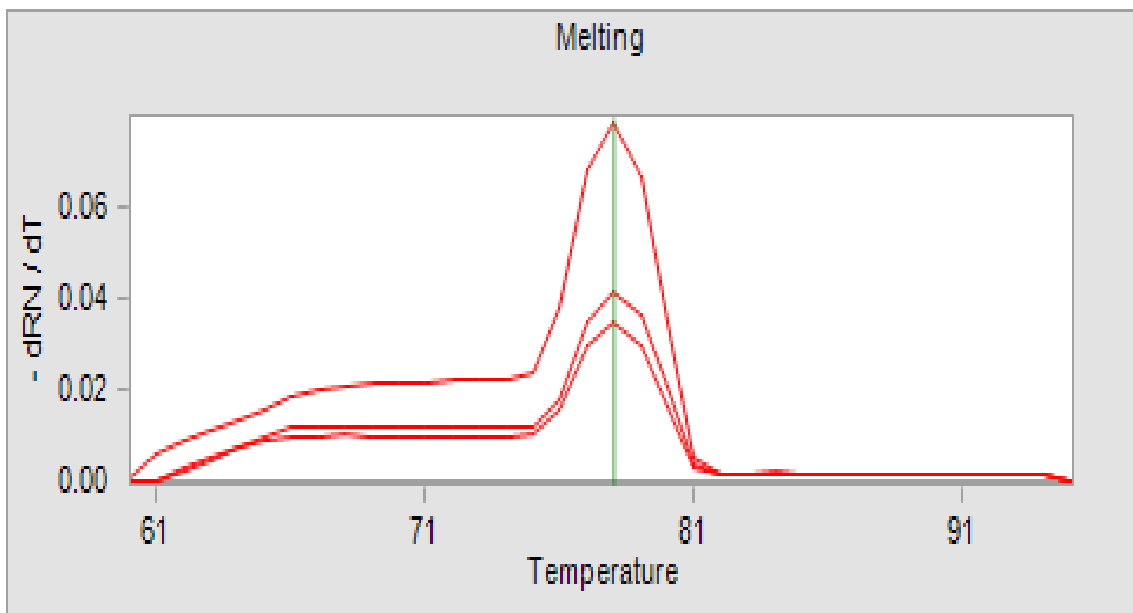


Figura No. 31. Gráfica de Tm de bocavirus. El ensayo bacavirus F+ bacavirus R, utilizando la muestra clínica 818 LDBP por triplicado en rojo.

7.3.2. Amplificación de virus respiratorios utilizando la mezcla de reacción SsoFast™ EvaGreen® Supermix With Low Rox (BioRad) y con tratamiento de Exonucleasa I.

Debido a que con la mezcla de reacción anterior no logramos obtener una reproducibilidad adecuada, cambiamos la mezcla TaqMan Gene Expression por el SsoFast, el cual ya contiene la concentración adecuada de EvaGreen y contiene una enzima que requiere tiempos menores de hibridación y elongación. Adicionalmente el preamplificado se trató con exonucleasa I para eliminar el exceso de iniciadores y evitar la formación dímeros entre éstos.

En la figura 32 se muestra la gráfica de amplificación con el par de iniciadores bocavirus F+ bocavirus R y con tratamiento de exonucleasa I.

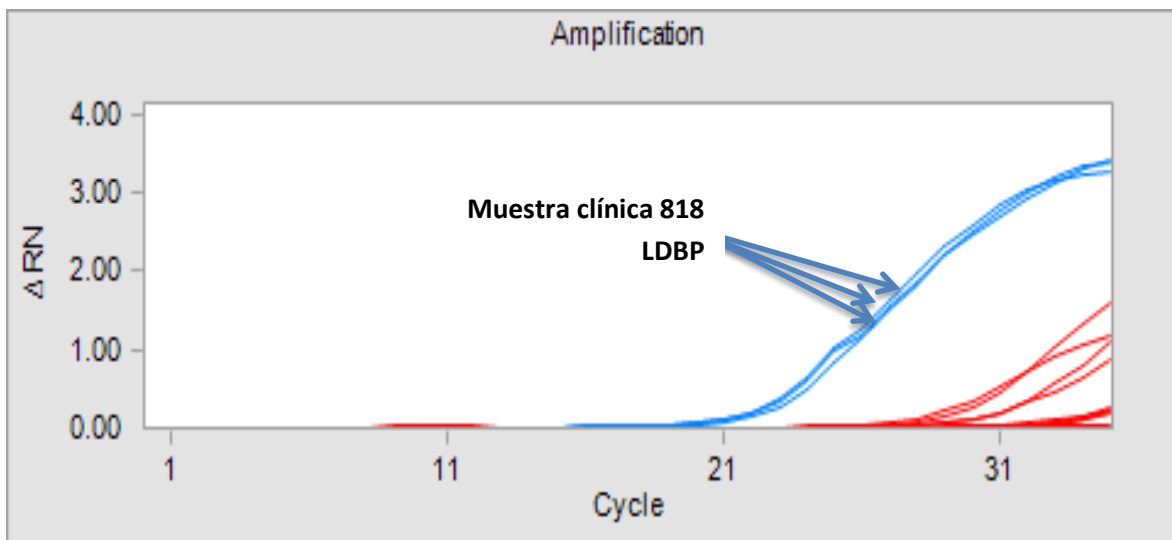


Figura No. 32. Gráfica de amplificación en tiempo real de bocavirus. Utilizando como control la muestra clínica por triplicado 818 LDBP para la amplificación de bocavirus con los iniciadores bocavirus R+ bocavirus F en azul.

La amplificación de la muestra clínica fue reproducible con esta mezcla de reacción; alcanzando el mismo Ct y empezando la amplificación desde el ciclo 21 aproximadamente (figura 32). El equipo detectó al final del ciclado dímeros de iniciadores (en color rojo) en este ensayo, debido al tratamiento con exonucleasa I.

En la figura 33 se muestra la gráfica de Tm del producto de amplificación de bocavirus con los iniciadores bocavirus F+ bocavirus R. El valor de Tm con este par de iniciadores es de 80.7°C; obteniendo el mismo valor en las tres repeticiones.

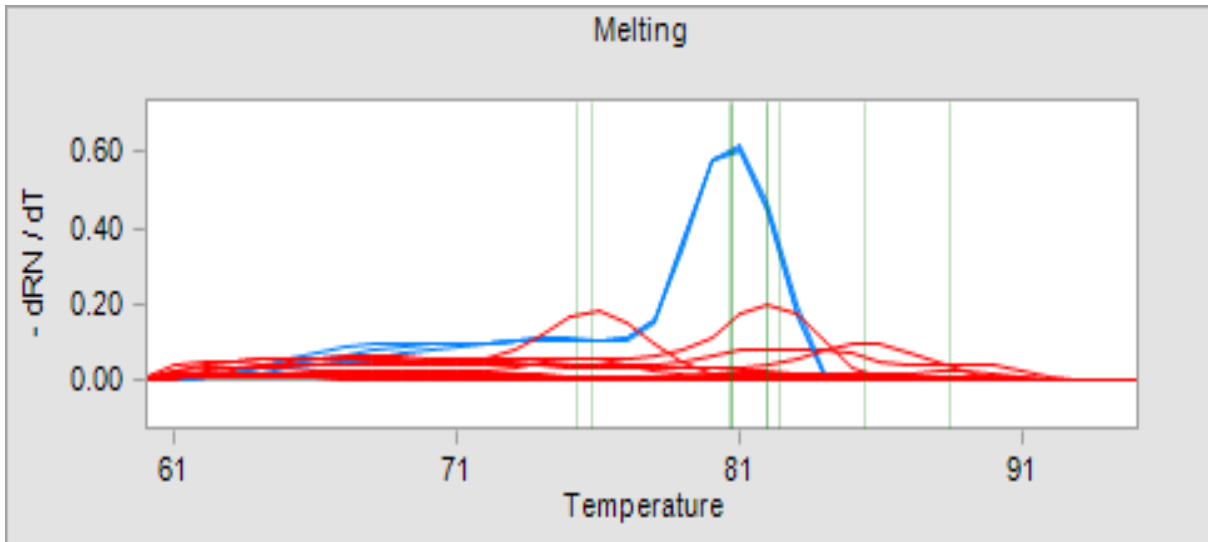


Figura No.33. Gráfica de Tm de bocavirus. El ensayo bocavirus F+ bacavirus R utilizando la muestra clínica 818 LDBP por triplicado en azul.

Con la mezcla de reacción SsoFast se mejoraron las condiciones de amplificación, teniendo una amplificación más temprana y con una muy buena reproducibilidad. Sin embargo, al final de los ciclos de amplificación se formaron dímeros de iniciadores. Esto nos indica que no fue adecuado el uso de exonucleasa I y de forma adversa la temperatura de 37°C a la cual se incubó la reacción, favoreció la formación de dímeros.

7.3.3. Amplificación de virus respiratorios utilizando la mezcla de reacción SsoFast™ EvaGreen® Supermix With Low Rox (BioRad) sin tratamiento de Exonucleasa I.

Debido a que el empleo de exonucleasa I favorecía la formación de dímeros, decidimos omitir el tratamiento del pre-amplificado con esta enzima. En la figura 34 se muestra la gráfica de amplificación en tiempo real del ensayo de la muestra clínica 818 con los iniciadores bocavirus F+ bocavirus R por triplicado, teniendo buena reproducibilidad y en los últimos ciclos no se observan la formación de dímeros.

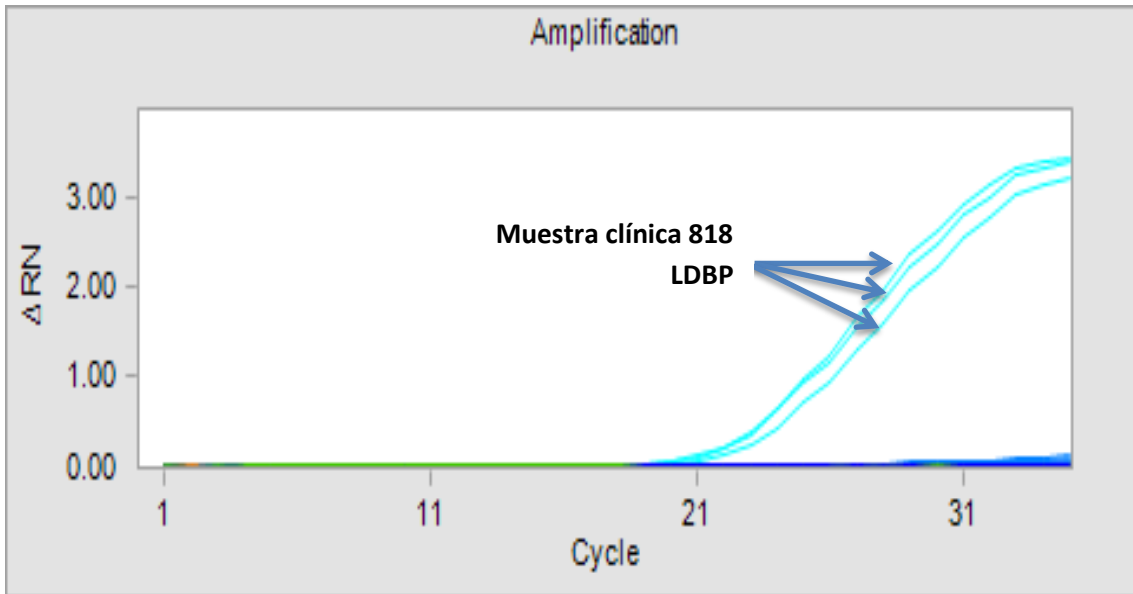


Figura No. 34. Gráfica de amplificación en tiempo real de bocavirus. Del ensayo con los iniciadores de bocavirus F+ bacavirus R. En azul se muestra la amplificación de la muestra clínica 818 LDBP por triplicado.

En la figura 35 se muestra la gráfica de Tm de la amplificación de bocavirus. El valor de Tm es 80.97°C, por triplicado.

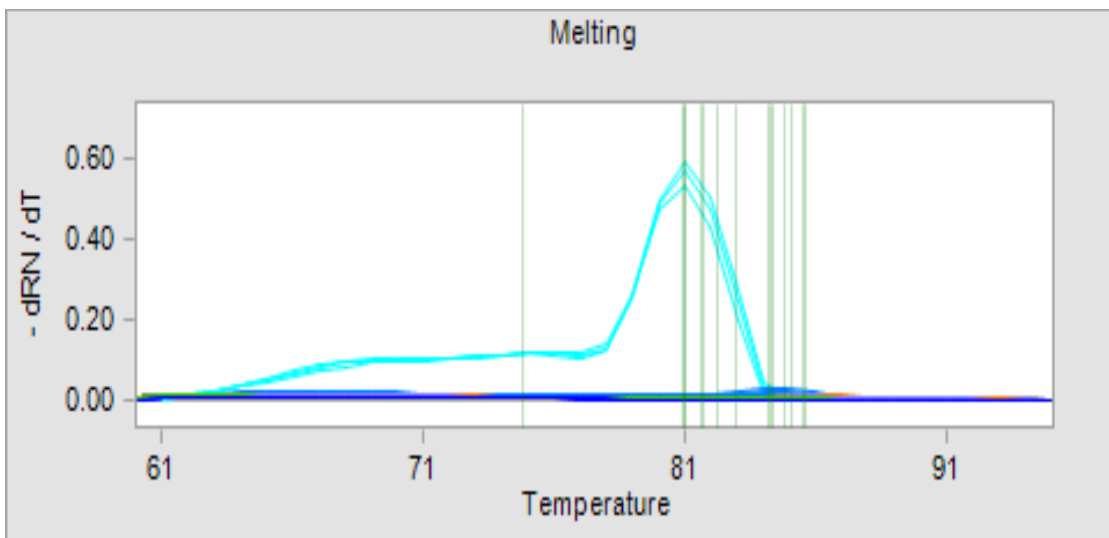


Figura No. 35. Gráfica de Tm de bocavirus. Del ensayo bocavirus R+ bocavirus F utilizando la muestra clínica 818 LDBP por triplicado.

7.4. Determinación de especificidad de los iniciadores en el equipo Biomark (Fluidigm).

Después de obtener las mejores condiciones de amplificación, determinamos la especificidad de nuestros iniciadores en la plataforma Biomark (Fluidigm). En la figura 36 se muestra la distribución de las 48 muestras con los 48 ensayos reaccionando cada blanco con cada ensayo, dando un total de 2304 reacciones de PCR en tiempo real al mismo tiempo. Cada cuadrado representa un pozo de reacción y el color es el valor de Ct de cada amplificación.

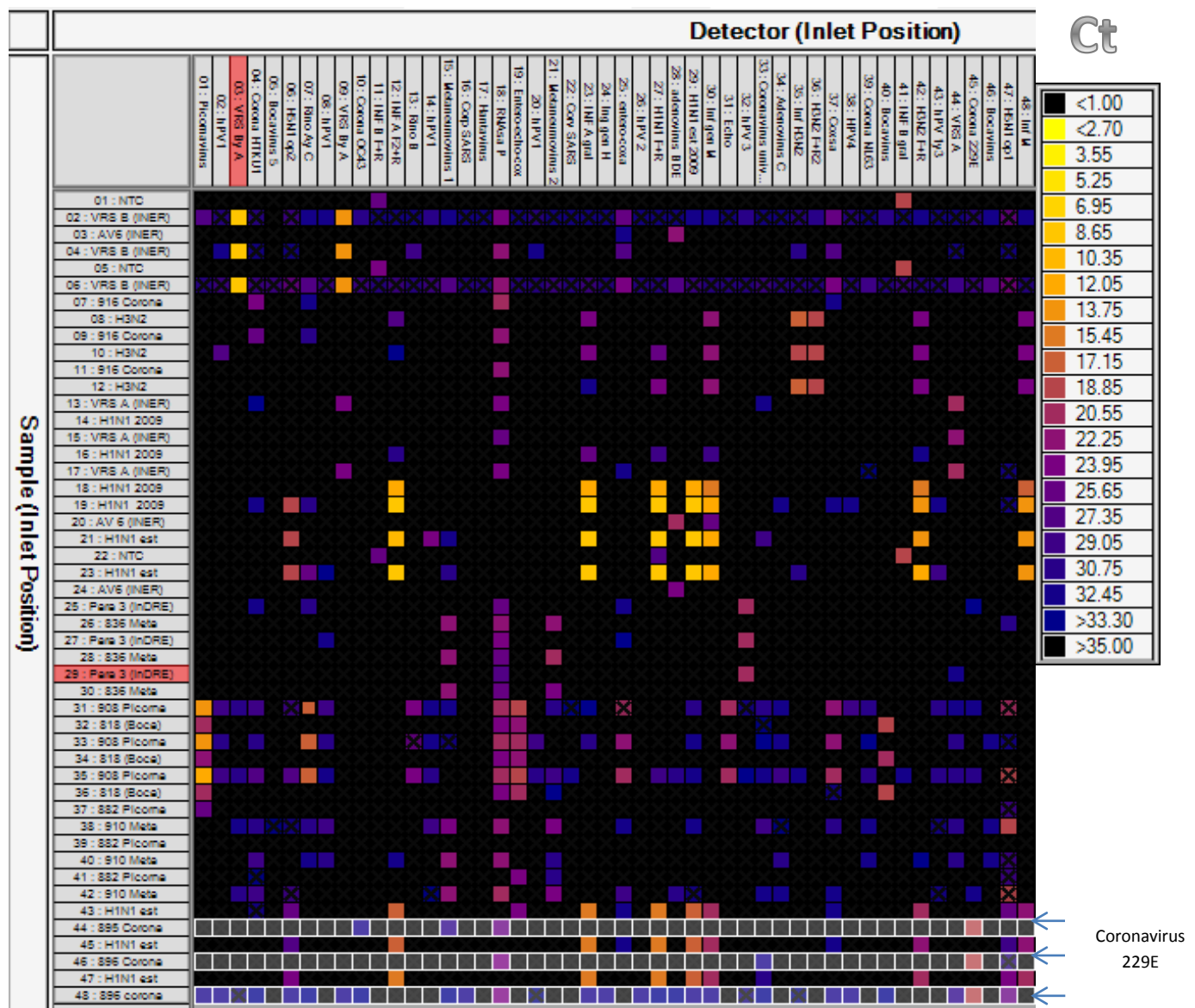


Figura No.36. Diagrama de distribución de ensayos y muestras en el chip. A la izquierda se encuentran las muestras y arriba los 48 ensayos para diferentes virus. A la derecha tabla de código de color para los valores de Ct.

Como ejemplo se seleccionan todos los pozos de reacción de la muestra clínica 896, la cual fue empleada como control positivo de coronavirus 229E (Figura 36). En la gráfica de amplificación en tiempo real (figura 37) se observa amplificación solo con el par de iniciadores coronavirus 229E F+ coronavirus 229E R (ensayo 45) y con el par RNAasa PF + RNAasa PR (ensayo 18), el cual es un gen constitutivo y nos indica la calidad de toma de muestra.

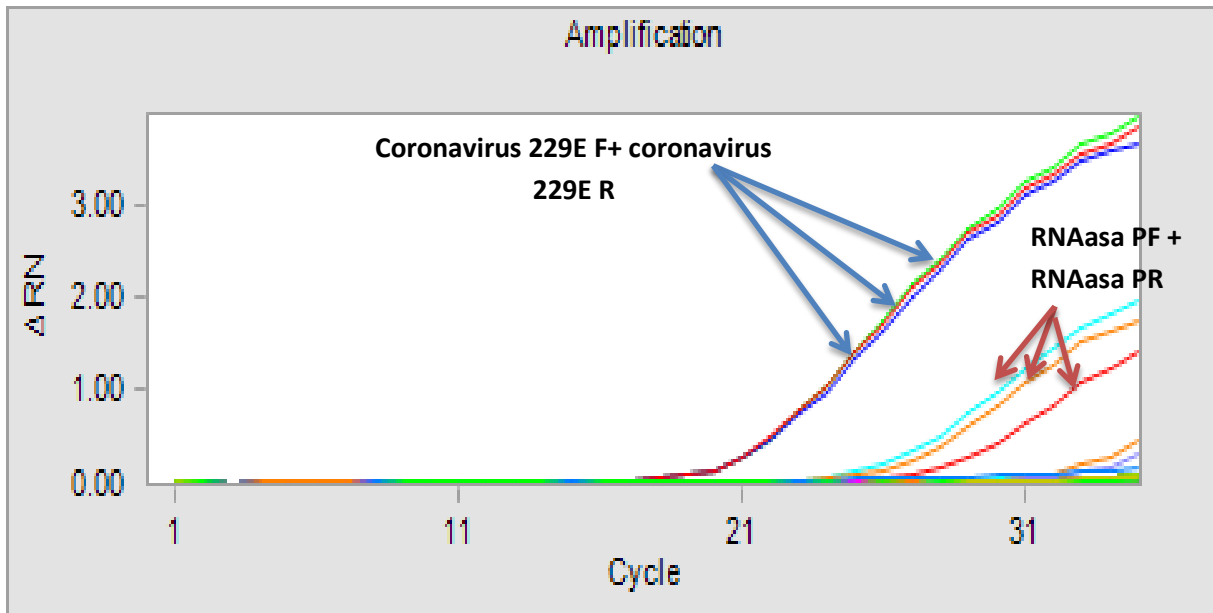


Figura No. 37. Gráfica de amplificación en tiempo real de Coronavirus 229E. Amplificación de la muestra clínica 896 con el par de iniciadores Coronavirus 229E F + Coronavirus 229E R (flechas en azul) y amplificación con el ensayo RNAasaP F+ RNAasaP R (flechas en rojo).

En la figura 38 tenemos la gráfica de Tm de la muestra clínica por triplicado. El valor promedio de la Tm para el ensayo de coronavirus es de 81.89°C y para el ensayo de RNasaP fue de 86.02°C.

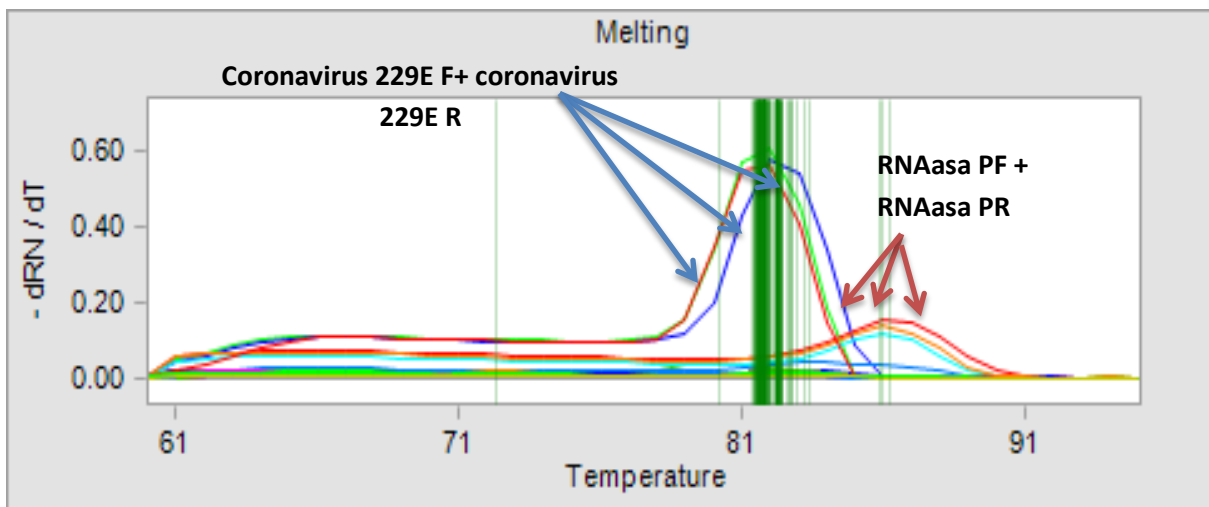


Figura No. 38. Gráfica de Tm de Coronavirus 229E. Las flechas en azul muestran el ensayo Coronavirus 229E F + coronavirus 229E R y en rojo para el ensayo RNasa P F+ RNasa P R, por triplicado. Únicas amplificaciones para la muestra clínica 896.

No se observó otras amplificaciones con otros ensayos para esta muestra clínica; por lo que podemos decir que los iniciadores son específicos en el equipo de nanofluidos. Como ejemplo se mostró la amplificación de coronavirus 229E, el resto de los resultados se encuentran en la tabla 16, donde se muestran los valores de Tm para cada uno de los controles que utilizamos con cada par de iniciadores.

Controles	Ensayo	Virus detectado	Tm
Rinovirus A (muestra clínica)	1. Picouni F, Picouni R	Picornavirus Universal	83.3643555
Rinovirus A (muestra clínica)	2. Rino AyC F, Rino ABC R	Rinovirus Ay C	87.3513096
Parainfluenza 3 (InDRE)	14. HPV3 FB, HPV3 RB	Parainfluenza 3	80.0125042
VRS A (INER)	16. RSV AF, RSV AR	Virus Sincial Respiratorio	83.9858684

VRS B (INER)	17. VSR BF, VSR BR	Virus Sincial Respiratorio B	84.8758343
Metapneumovirus (muestra clínica)	19. Metapneumo F, Metapneumo R	Metapneumovirus	81.4122666
Coronavirus 229E (muestra clínica)	24. coronavirus 229E F, coronavirus 229E R	Coronavirus 229E	81.8914534
Coronavirus HKU 1 (muestra clínica)	25. Coronavirus HKU1 F, HKU1 R	Coronavirus HKU1	77.3068285
AV 6 (INER)	29. adenovirus BDE F, adenovirus BCDE R	Adenovirus BD yE	85.8213083
Bocavirus (muestra clínica)	31. bocavirus F, bocavirus R	Bocavirus	80.9676983
H1N1 est	36. INFA F, INFA R	Influenza A	86.2950638
H1N1 est	37. H1N1 F1, H1N1 R2	H1N1 est/2009	84.494728
H1N1 est	45.Gen MF, gen MR	gen M	83.5615894
H1N1 est	48	Inf M	83.7411576
H1N1 2009	36. INFA F, INFA R	Influenza A	86.0264952
H1N1 2009	37. H1N1 F1, H1N1 R2	H1N1 est/2009	85.0405236
H1N1 2009	45.Gen MF, gen MR	gen M	83.762526

H1N1 2009	48. Infa M2 F+ Infa M2 R	Inf M	83.7170535
H3N2	36. INFA F, INFA R	Influenza A	84.2777684
H3N2	38. H3N2 F, H3N2 R	H3N2	80.8886068
H3N2	45.Gen MF, gen MR	gen M	81.5075568
H3N2	48. Infa M2 F+ Infa M2 R	gen M	81.3999758
Influenza B	39. Inf B F, Inf R2	influenza B	83.3161988

Tabla No. 16. Ensayos con los controles de virus respiratorios y los valores de Tm para cada uno.

7.5. Prueba de sensibilidad del equipo Fluidigm.

Para conocer el límite de detección del equipo fluidigm se empleó como modelo el virus de influenza H1N1 2009 pandémico. Para esto se utilizaron diluciones de plásmidos pCR 2.1 (4000 pb), que tienen integrado aproximadamente 1400 pb del gen Neuramidasasa (N). Primero se midió la concentración del plásmido empleando el espectrofotómetro nanodrop, siendo de 55.5 ng/μl ó 55.5 X10⁻⁹ g/μl, con este dato se calcula el número de moléculas utilizando el número de Avogrado y el peso molecular aproximado de los nucleótidos que es de 677.9 g/mol. Con estos datos se realizan los siguientes cálculos:

$$\text{Nucleótidos totales} = 4000\text{nt (plásmido)} + 1400\text{nt (gen N)} = 5400 \text{ nt}$$

$$5400 \text{ nt} \left(\frac{677.9\text{g}}{1 \text{ mol}} \right) = 3660660 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$55.5 \times 10^{-9} \text{g}/\mu\text{l} \left(\frac{1 \text{ mol}}{3660660 \text{ g}} \right) \left(\frac{6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas}}{1 \text{ mol}} \right) = 9131591025 \text{ moléculas}/\mu\text{l}$$

Después se realizaron diluciones logarítmicas, que posteriormente se detectaron en el equipo Fluidigm. En la tabla 17 se muestran las diluciones que se realizaron y la cantidad de moléculas por μl de cada dilución. En la preparación del pre-

amplificado se le adiciona 5 μl de la muestra por esta razón se multiplica por 5, para conocer la cantidad de moléculas reales en el volumen final de cada dilución.

Dilución	Concentración (moléculas / μl)	5 μl X Concentración (moléculas)
10^{-5}	91315.91025	456579.5512
10^{-6}	9131.591925	45657.95512
10^{-7}	913.1591925	4565.795512
10^{-8}	91.31591925	456.5795512

Tabla No. 17. Serie de diluciones del plásmido con el gen N, número de diluciones y número de moléculas por dilución.

Ahora se puede detectar el número mínimo de copias que puede detectar el fluidigm. En la figura 39 se muestra los resultados de las diluciones por duplicado, siendo 456 moléculas el mínimo que detecta el equipo (color azul).

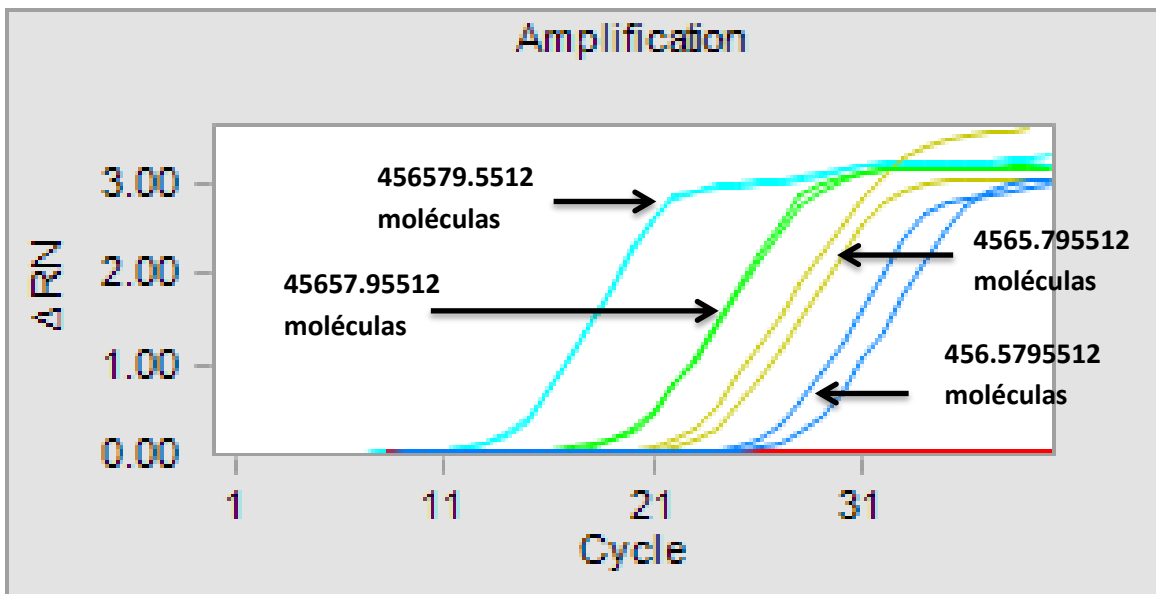


Figura No. 39. Gráfica de amplificación de las diluciones seriales con el ensayo H1N1 est/2009, con la combinación de iniciadores H1N1F1 + H1N1 R2, por duplicado.

Con los resultados anteriores se construyó una curva estándar, y se obtuvo la ecuación de la recta $Ct = -4.2814 \log \text{Concentración} + 35.407$ ($y = mx + b$) con un valor en R^2 de 0.9893; lo cual nos indica que se puede correlacionar el Ct con el logaritmo de la concentración (figura 40).

$$eficiencia = \left[10^{\left(-\frac{1}{pendiente} \right)} \right] - 1$$

$$eficiencia = \left[10^{\left(-\frac{1}{-4.2814} \right)} \right] - 1 = 0.712255 \times 100 = 71.225\%$$

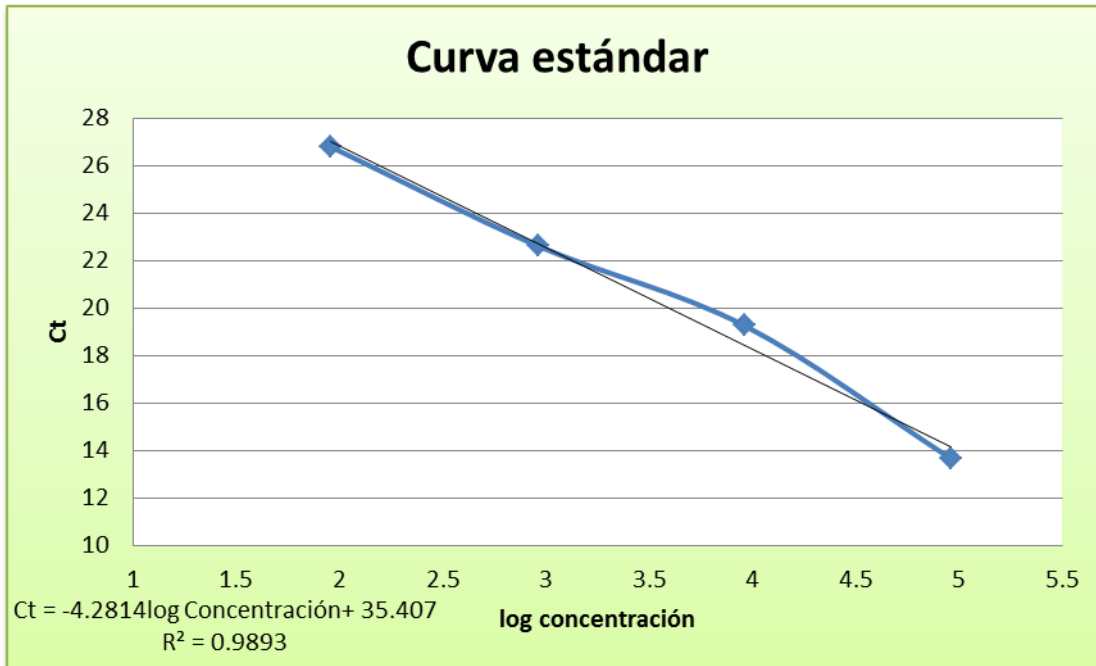


Figura No. 40. Curva estándar para el plásmido con el gen Neuramidasa con los iniciadores H1N1F1 + H1N1 R2. Correlación del límite de umbral de detección (Ct) con respecto al logaritmo de la concentración del plásmido.

El mínimo de moléculas detectables por el equipo Biomark es 457 y con una eficiencia de 71.22%.¹⁸

7.6. Validación de los resultados obtenidos por el equipo Biomark (Fluidigm).

Para validar nuestra metodología evaluamos muestras que resultaron positivas para diferentes virus respiratorios por el fluidigm, probándose con un estuche que ya se encuentra en el mercado de la empresa Seegene y que está avalado por la comunidad europea para la detección de 16 virus respiratorios; también se trata de un RT-PCR multiplex en tiempo real.

La muestra clínica 910 en el fluidigm amplificó para el par de iniciadores Metapneumovirus F + Metapneumovirus R, como se muestra en la figura 41 por el fluidigm y en la figura 42, se muestra la gráfica de amplificación de la misma muestra detectada por Anyplex II.

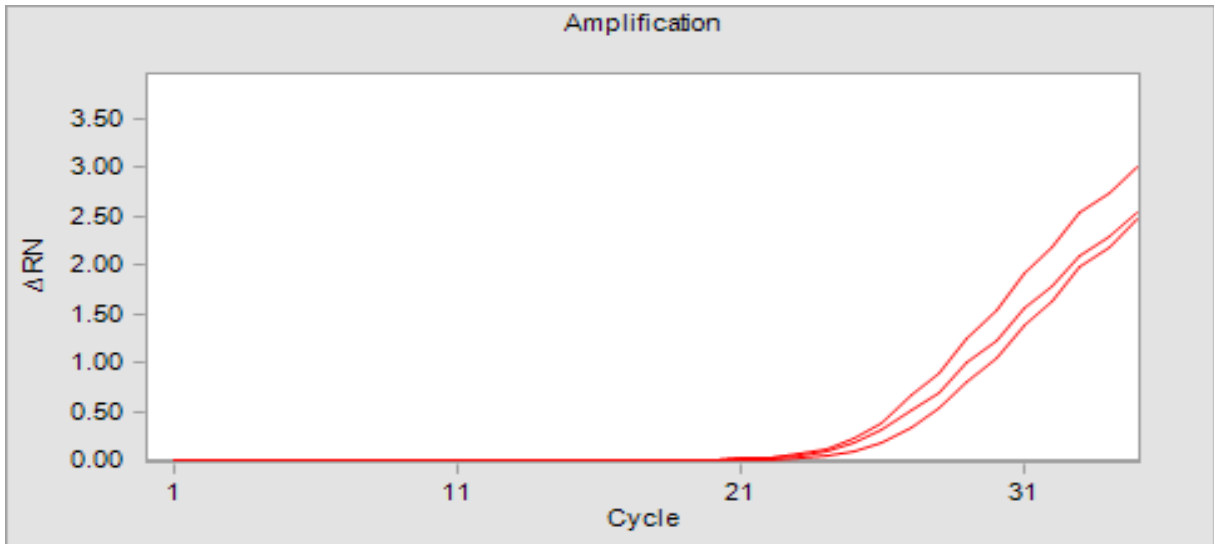


Figura No. 41. Gráfica de amplificación de la muestra clínica 910 con el ensayo Metapneumovirus F+ Metapneumovirus R por triplicado (en rojo), por el fluidigm.

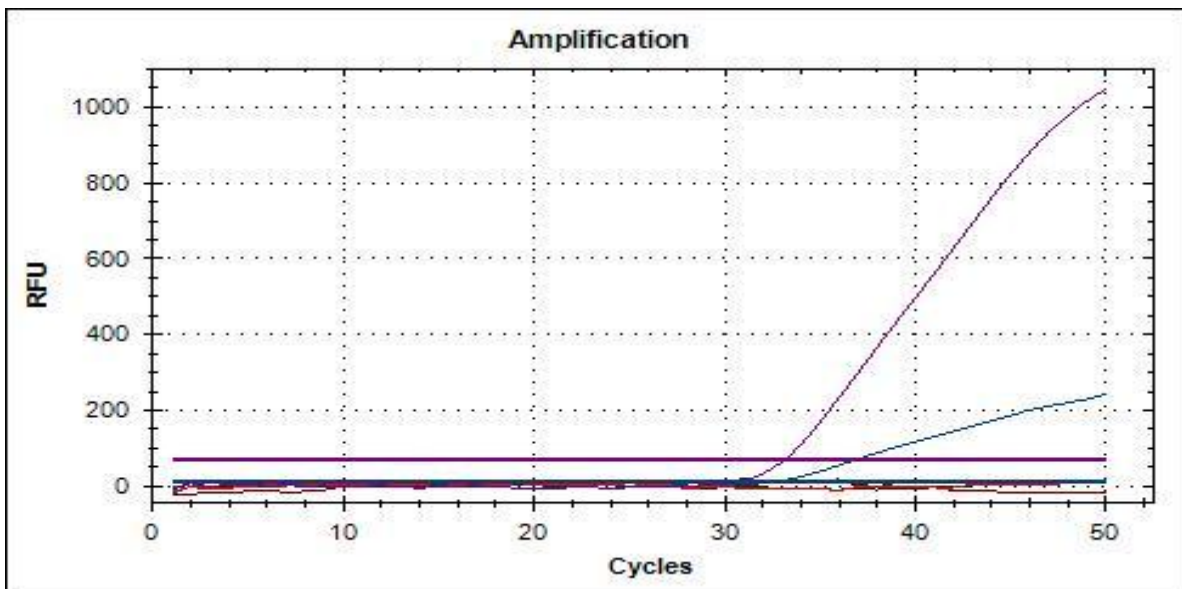


Figura No. 42. Gráfica de amplificación de la muestra 910 por el kit Anyplex II. En azul meptaneumovirus y en violeta el control interno (IC).

Virus Sincial A y B

muestras	Anyplex II	Fluidigm	
841	VRS A	VRS A	1
843	VRS A	VRS A	2
837	VRS A	VRS B	3
896	VRS A	VRS A	4
880	VRS A	VRS A	5
861	VRS A	VRS A	6
977	VRS A	VRS A	7
889	VRS A	VRS A	8
877	Invalido	VRS A	9
829	AdV	VRS A	10
834	Neg	VRS B	11
863	Neg	VRSB	12

Rinovirus y Enterovirus

muestras	Anyplex II	Fluidigm	
900	Rhino ABC	Rhino ABC	1
817	Rino ABC	Rino ABC	2
967	Rino ABC	Rino ABC	3
890	Rino ABC	Rino ABC	4
882	Neg	Enterovirus 68	5

Influenza

muestras	Anyplex II	Fluidigm	
917	Flu A	Flu A	1
965	FluA	Flu A	2
970	Flu A	Flu A	3
974	Flu A	Flu A	4
978	Flu A	Flu A	5
980	Flu A	Flu A	6
966	Flu A	Flu A	7
968	Flu A	Flu A	8
969	Flu A	Flu A	9
925	Flu A	Flu A	10
920	Flu A	Flu A	11

Tabla No. 18. Resultados por la técnica AnyplexII y por fluidigm.

Metapneumovirus

muestras	Anyplex II	Fluidigm	
910	MpV	MpV	1
836	MpV	MpV	2

Co-infecciones

muestras	Anyplex II	Fluidigm	
842	PIV 2, VRS A	VRS A	3
830	VRS A, Rino ABC	VRS A, Rino ABC	4
818	HBoV	HBoV, Rino ABC	5
896	Rino ABC, Corona 229E	Corona 229E	6

controles Negativos

muestras	Anyplex II	fluidigm	
971	Neg	Neg	1
891	Neg	Neg	2
883	Neg	Neg	3
887	Neg	Neg	4

En la tabla 18 se muestran los resultados comparativos por las dos técnicas; tanto fluidigm como Anyplex II. En el caso del virus sincicial respiratorio A, hubo concordancia por ambas técnicas a excepción de la muestra 829 que por Anyplex II detectó adenovirus y por fluidigm virus sincicial respiratorio A. Las muestras 863 y 834 fueron negativas por Anyplex II y por el fluidigm se detectó VSR B; en el caso de las muestras caracterizadas con rinovirus ABC hubo concordancia por ambos métodos; pero la muestra 882 diagnosticada por fluidigm y caracterizada posteriormente como enterovirus 68; en Anyplex II no fue posible detectarla. En el caso de metapneumovirus, influenza y los controles negativos concordaron 100% por ambas técnicas. En las co-infecciones los resultados fueron más inconsistentes; en la muestra 842 se detectó PIV2 y VSR A, mientras que por fluidigm solo VSR A, la muestra 818 se diagnostica por Anyplex II solo con bocavirus mientras que por fluidigm detecta bocavirus y Rinovirus ABC, la muestra 896 por Anyplex II detecta una co-infección por Rinovirus ABC y coronavirus 229E y por fluidigm solo pone de manifiesto la infección por coronavirus 229E. Designamos la metodología de Anyplex II como nuestro estándar de oro y en base a eso, calculamos nuestra especificidad y sensibilidad equipo Biomark fluidigm. En base a la tabla 19 se muestran los valores de falsos positivos, verdaderos negativos, falsos negativos y verdaderos positivos con respecto a Anyplex II (Tabla 19).

		Anyplex II	
		33	3
Fluidigm	Verdadero Positivo (VP)	33	3
	Falso Negativo (FN)	2	8
	Falso Positivo (FP)	2	8
	Verdadero Negativo (VN)	2	8

Tabla No. 19. Comparación de los resultados de fluidigm con respecto por Anyplex II.

$$especificidad = \frac{VN}{FP + VN}$$

$$\text{especificidad} = \frac{8}{3 + 8} = 0.72 * 100 = 72\%$$

$$\text{sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{sensibilidad} = \frac{33}{33 + 2} = 0.9428 * 100 = 94.28\%$$

$$\text{Valor Predictivo Positivo (VPP)} = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$VPP = \frac{33}{33 + 3} = 0.9166 * 100 = 91.6\%$$

$$\text{Valor Predictivo Negativo (VPN)} = \frac{VN}{FN + VN}$$

$$VPN = \frac{8}{2 + 8} = 0.8 * 100 = 80\%$$

7.7. Evaluación de los resultados para virus respiratorios en un corte de pacientes.

Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación en el equipo Biomark Fluidigm realizamos la detección de virus respiratorios de un total de 461 muestras; de las cuales 115 eran pediátricos (menores de 14 años 11 meses) y 346 adultos. En total 222 muestras resultaron positivas para un virus y 7 tenían coinfección por dos virus. En lo que respecta a los niños obtuvimos una prevalencia del 44% para entero/rino, 21% para VSR A, 18% Influenza A, 6% metapneumovirus, 3% adenovirus, 3% PIV 3, 3% VSR B, PIV 1 1% y coronavirus 1% (figura 43).

Para el caso de los adultos el virus de influenza tiene el más alto índice de casos positivos con un 54%; mientras que entero/rino un 33%, metapneumovirus 5%, coronavirus 5%, VSR A 1%, VSR B 1% y bocavirus 1% (Figura 44).

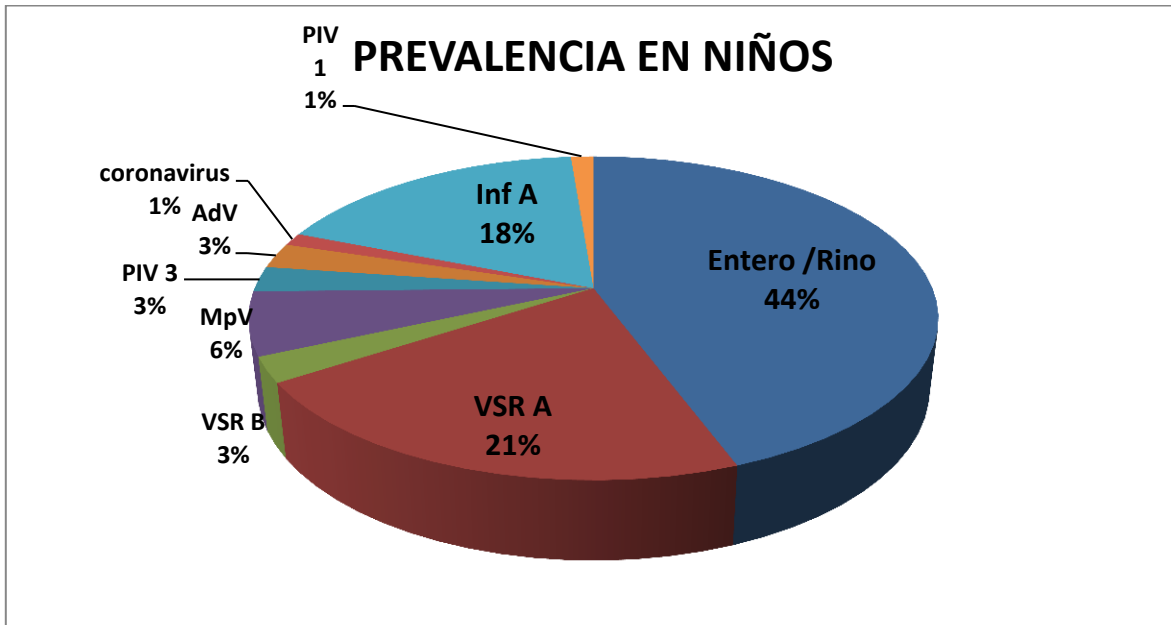


Figura No.43. Prevalencia de virus respiratorios en niños. Influenza A(Inf A), Adenovirus (AdV), Parainfluenza 3 (PIV 3), Parainfluenza 1 (PIV 1), Metapneumovirus (MpV), virus sincicial respiratorio B (VSR B), virus sincicial respiratorio A (VSR A), coronavirus y bocavirus.

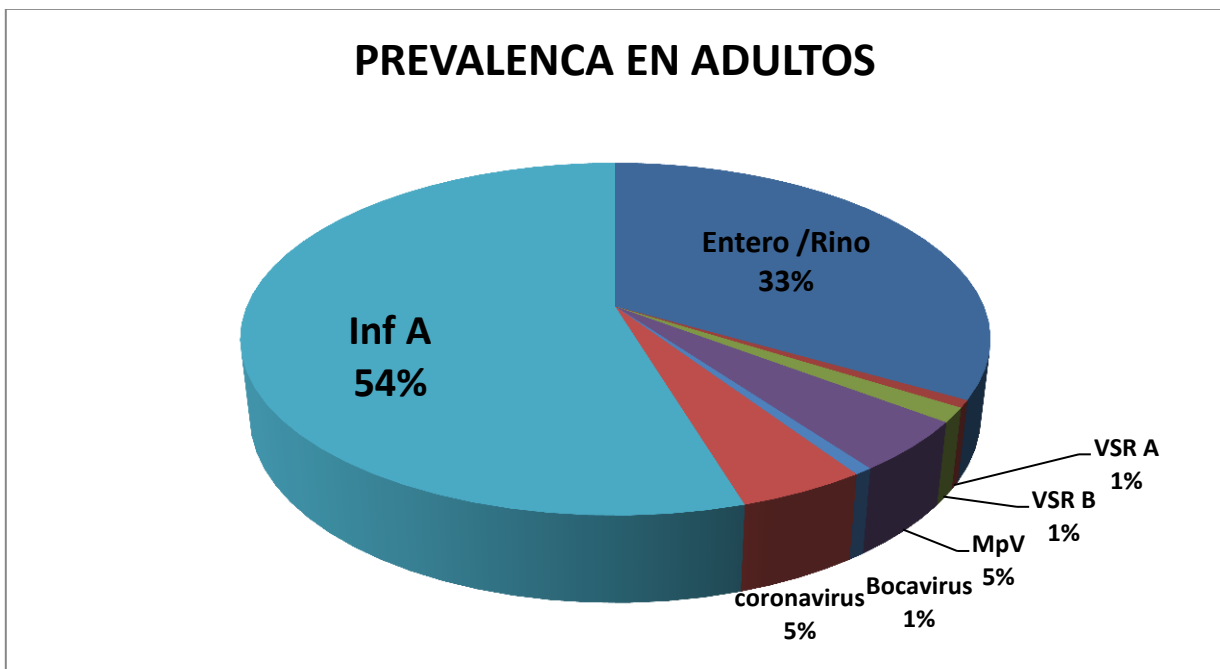


Figura No. 44. Prevalencia de virus respiratorios en adultos. Influenza A(Inf A), Metapneumovirus (MpV), virus sincicial respiratorio B (VSR B), virus sincicial respiratorio A (VSR A), coronavirus y bocavirus.

Dentro de nuestro estudio incluimos niños que se diagnosticaron con infecciones respiratorias agudas (IRA's); tales como Neumonía, bronquiolitis, probable influenza, neumonía adquirida en la comunidad (NAC) y también incluimos niños que cursaban con una crisis asmática. En la figura 45 se muestra el porcentaje de IRA's y crisis asmáticas que están asociados algún virus respiratorio.

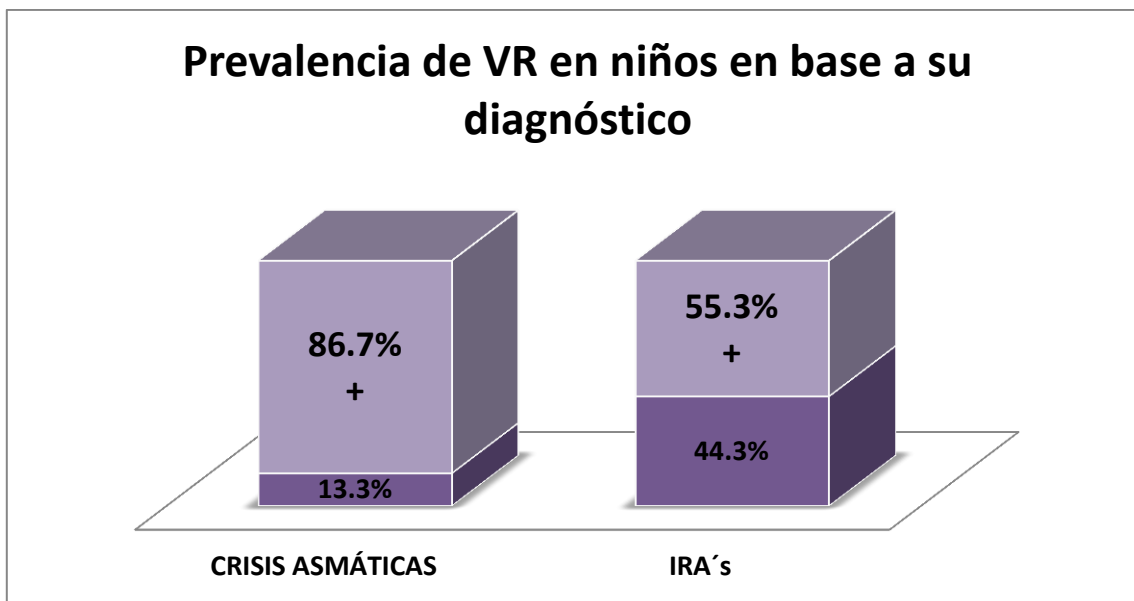


Figura No. 45. Relación de Infecciones Respiratorias Agudas (IRA's) y crisis asmática con la prevalencia en virus respiratorios (VR) en niños. En color morado claro el porcentaje de casos positivos y en color morado oscuros el porcentaje de casos negativos.

El 86.7% de los casos de crisis asmática están relacionados con algún virus respiratorio y de los casos totales de IRA's el 55.3% se relacionó con la presencia de un agente viral.

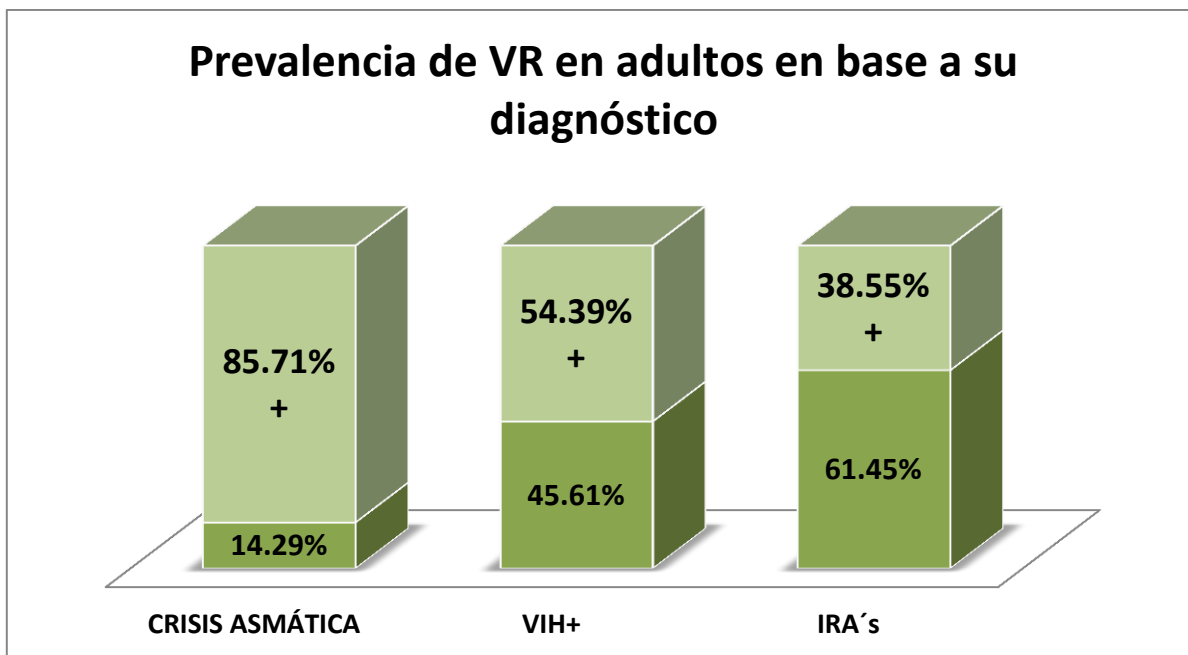


Figura No. 46. Relación de crisis asmáticas, pacientes con VIH+ e IRA's con la prevalencia de virus respiratorios (VR) en adultos. En color verde claro el porcentaje de casos positivos y en verde oscuro el porcentaje de casos negativos.

Los adultos incluidos en nuestro estudio fueron pacientes que ingresaron al hospital por crisis asmáticas, IRA's y pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH+) que cursaban con un cuadro de neumonía. En la figura 46 se muestra la prevalencia de los virus respiratorios con respecto a su diagnóstico. Para el total de las crisis asmáticas el 85.71% resulto positivo para algún virus, el 54.39% de los pacientes inmunocomprometidos están infectados por otro virus respiratorio y del total de los pacientes con alguna IRA's el 38.55% su padecimiento es debido a algún virus.

7.8. Comprobación y caracterización de muestras positivas por medio de secuenciación

Para comprobar la identidad de los virus detectados por medio de nuestra metodología, se seleccionaron muestras positivas para los diferentes virus respiratorios. En las siguientes figuras (47, 48, 48 y 50) se muestran secuencias obtenidas junto con una secuencia prototipo de cada virus del genebank.

1. 829 RSVA COMPLETE	CATATCCACCAAACTCCCTCCATCCACAGAAATACCCAAABAAAACTCTCAAGAAACACACCCCAACCCCGAAAAAACAACCTCCAGACCAACCAAAAGATC
2. 830 RSVA COMPLETE	CATATCCACCAAACTCCCTCCATCCACAGAAATACCCAAABAAAACTCTCAAGAAACACACCCCAACCCCGAAAAAACAACCTCCAGACCAACCAAAAGATC
3. gi 45386490 gb AF5	CATATCCACCAAACTCCCTCCATCCACAGAAATACCCAAABAAAACTCTCAAGAAACACACCCCAACCCCGAAAAAACAACCTCCAGACCAACCAAAAGATC

Figura No. 47. Secuencia de las muestra 829 caracterizadas como virus sincicial respiratorio A. La primera y la segunda secuencia son muestras que fueron positivas para VSR A y la tercera es la secuencia de referencia.

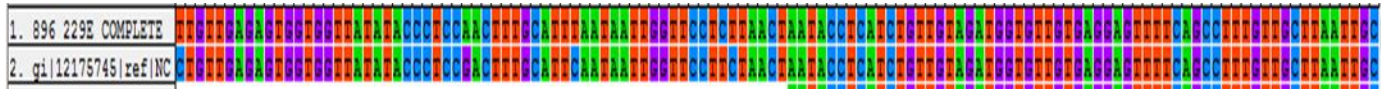


Figura No.48. Secuencia de la muestra 896 caracterizada como coronavirus 229E. La primera es la muestra 896 que fue positiva para coronavirus 229E y la segunda es la secuencia de referencia.

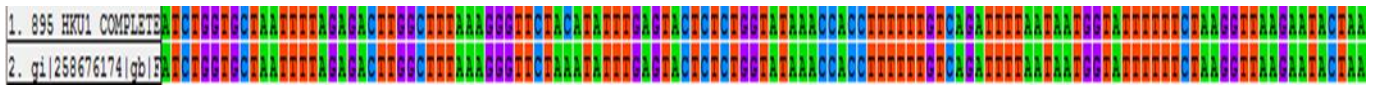


Figura No. 49. Secuencia de la muestra 895 caracterizada como coronavirus HKU1. La primera es la muestra 895 que fue positiva para coronavirus HKU1 y la segunda es la secuencia de referencia.



Figura No.50. Secuencia de la muestra 910 caracterizada como metapneumovirus. La primera es la muestra 910 que fue positiva para metapneumovirus y la segunda es la secuencia de referencia.

En la figuras 47, 48, 49 y 50 se observa que existe una gran homología entre las secuencias de los virus de pacientes y las secuencias prototipo.

En la tabla 21 mostramos los resultados obtenidos del NCBI en base a su secuencia y los resultados en el fluidigm de todas las muestras que se caracterizaron por secuenciación.

muestra clínica	Resultados del NCBI	Resultados en el fluidigm
837	VSR A	VSR A
863	VSR B	VSR B
829	VSR A	VSR A
830	VSR A	VSR A
830	Rinovirus C	Coxsackie
896	Corona 229E	Coronavirus 229E
895	Corona HKU1	Coronavirus HKU1
910	Metapneumovirus	metapneumovirus
890	Rinovirus A	Entero/Rino
894	Rinovirus A	Rinovirus AC

900	Rinovirus C	Entero/Rino
908	Rinovirus A	Enterovirus
817	Rinovirus B	Enterovirus
874	Rinovirus B	Entero/Rino
870	Rinovirus B	Enterovirus
901	Rinovirus C	Rinovirus B
902	Rinovirus C	Entero/Rino
882	enterovirus 68	Entero/Rino

Tabla No. 20. Resultados obtenidos del NCBI y por el equipo Biomark.

De nuestro particular interés fue el resultado de la muestra 882, la cual amplificó con los iniciadores de picornavirus (ensayo1), Rinovirus B (ensayo3) y Entero-echo-cox (ensayo4). Cuando realizamos el estudio de identidad en la herramienta BLAST en la base de datos del NCBI la muestra 882 mostró homología del 98% con secuencias de enterovirus 68 (figura 51). Por lo que podemos concluir que con nuestros ensayos podemos detectar una gran cantidad de virus de la familia Picornaviridae incluyendo uno de los menos frecuentes como es el enterovirus 68.



Figura No. 51. Resultados al realizar el BLAST de la muestra 882. Da 98% de compatibilidad con una secuencia de enterovirus 68.

8. DISCUSIÓN

En el año 2009, con la pandemia de influenza H1N1, se puso de manifiesto la falta de alguna metodología para la detección temprana de algún virus respiratorio en nuestro país. En la actualidad existen varias tecnologías que permiten dar un diagnóstico de virus respiratorios; como por ejemplo el único aprobado por la FDA que es Luminex xTAG; su tecnología está basada en citometría de flujo la cual consta de múltiples pasos que toma aproximadamente 3 días para obtener resultados, elevando los costos y solo detectando 9 virus.

En el mercado existen muy pocas tecnologías para la detección de virus respiratorios y son costosas, impidiendo que se conozca la verdadera etiología de la infección respiratoria; lo que con lleva frecuentemente a dar un diagnóstico incorrecto provocando así mismo el uso indiscriminado de antibióticos.

El principal propósito de este trabajo es tener una alternativa de diagnóstico integral para la detección de virus respiratorios. La tecnología de nanofluidos permite realizar 48 diferentes ensayos a 48 diferentes muestras al mismo tiempo; por lo tanto esta tecnología no solo se puede aplicar para virus sino también para la detección de bacterias y hongos.

Los costos en comparación con otras metodologías son menores al disminuir el uso de reactivos con precios elevados, como el uso de sondas. Las ventajas de usar un agente intercalante como el Evagreen es que su precio es menor en comparación de las sondas y lo podemos usar para cualquier ensayo.

Otra ventaja de nuestra metodología es el tiempo aproximado de procesamiento de la muestra, desde la extracción de ácidos nucleicos hasta la obtención de resultados es de 4 a 5 horas, por no necesitar múltiples pasos como es el caso de la tecnología de Luminex. También se puede utilizar para lavados bronquioalveolares, biopsias de tejido u otro tipo de muestras respiratorias no solo para hisopados nasofaríngeos.

La plataforma que ofrece la empresa Biomark es de 48X48 dando un total de 2304 reacciones y también ofrece una plataforma de 96X96 que son 9216 reacciones. Se puede utilizar cualquiera de estas dependiendo de la demanda y de las aplicaciones que se requieran.

En base a los resultados obtenidos en el ensayo de sensibilidad el límite de detección fue de 457 moléculas. En estudios previos de HRM utilizando el equipo RotorGene el límite de detección fue de 46 copias, para la detección de influenza A H1N1, presentando mayor sensibilidad; pero este equipo solo tiene una plataforma de 36 reacciones. La sensibilidad de nuestro método se puede incrementar eluyendo los ácidos nucleicos en menor volumen, o empleando mayor concentración de iniciadores en la fase de preamplificación. Otro factor importante para la sensibilidad de esta prueba son las condiciones pre-analíticas de la muestra como son; el número de partículas virales presentes, la calidad de toma de muestra, estadio de la infección, entre otros.

Para validar nuestra metodología comparamos los resultados que obtuvimos de muestras positivas y negativas con el estuche comercial Anyplex II de la empresa Seegene®, este estuche se encuentra en el mercado y está aprobado por la comunidad europea para el diagnóstico de virus respiratorios.

La especificidad del equipo Biomark Fluidigm con respecto al Anyplex fue de 72%; mientras que la sensibilidad fue de 94.28%. Esto significa que nuestra metodología es capaz de detectar cargas virales bajas en las muestras respiratorias, sin embargo presenta baja especificidad comparándola con este estuche. Este resultado es debido principalmente a la discrepancia en la detección de muestras con infección con dos virus. A pesar de que este estuche está aprobado para diagnóstico, no fue capaz de detectar en la muestra enterovirus 68 y en la muestra 863 VSRB. Esto fue comprobado por secuenciación, por lo que podemos afirmar que este estuche fallo en la detección del virus en estas muestras. La prueba de oro es una metodología que se emplea para evaluar otras metodologías nuevas, en nuestro caso la prueba de oro podía ser el cultivo viral,

por lo que proponemos elegir este como una alternativa para evaluar de forma más precisa la especificidad de nuestra metodología

En el estuche de anyplex se le adiciona un control interno en el momento de la extracción de ácidos nucleicos, esto para asegurar que la extracción se realizó correctamente. En el fluidigm contamos con un par de iniciadores específicos de un gen constitutivo; que es el ensayo de RNasaP; que nos sirve para conocer la calidad de toma de muestra. Independientemente de la tecnología que se esté empleando, es necesario emplear tanto controles internos del procesamiento de la muestra como de la toma de muestra. En nuestra metodología se le podría adicionar fago E.coli MS2 que nos serviría como control interno.

Las secuencias virales obtenidas en las muestras positivas concordaron con la base de datos del NCBI; por lo que podemos decir que los iniciadores que se diseñaron fueron los adecuados para la detección y subtipificación de diferentes virus respiratorios. Sin embargo hubo otros que no identificaron su blanco y son susceptibles de reemplazar. También es necesario revisar periódicamente la base de datos del NCBI para verificar que los iniciadores todavía se alinean con las nuevas secuencias reportadas. En caso de que esto no suceda; se tendrán que diseñar unos nuevos iniciadores.

La estrategia abordada en el diseño de los iniciadores en el cual se trató de detectar familias de virus y al mismo tiempo iniciadores que tipificaran y/o subtipificaron los virus respiratorios resultó exitosa.

En el caso de los virus pertenecientes a la familia de Picornavirus su genoma es muy variable, por lo que resultó altamente complejo el diseño de unos iniciadores específicos para cada virus de esta familia. Por lo que al contar con un ensayo general para esta familia como fue el ensayo denominado Picornavirus, logramos detectar Rinovirus, Enterovirus y teóricamente se podrá diagnosticar otros virus como coxsackie y echovirus.

En contraste otros pares de iniciadores como los diseñados para detectar la familia Coronaviridae (21 y 22) no resultaron exitosos para detectar estos virus. Mención especial merecen los iniciadores para detectar la familia de Hantaviridae (34 y35) para los cuales no se consiguió control positivo y no se determinó su eficiencia de amplificación.

Con esta nueva metodología de diagnóstico se podrá integrar ensayos para bacterias y hongos que también son causantes de padecimientos respiratorios; como por ejemplo *M. tuberculosis*, *C. pneumonie*. Esto es por las opciones de plataformas que nos ofrece el equipo; sin importar el tipo de muestra o el microorganismo que se busca.

También es necesario implementar esta prueba de rutina en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias para todos los pacientes que ingresen al hospital con una infección respiratoria aguda; ya que muchos pacientes no conocen la verdadera etiología de su padecimiento. Esto nos permitirá realizar una base de datos del número de incidencias por virus respiratorios, del cual nuestro país carece.

9. CONCLUSIONES

- Los iniciadores diseñados para la amplificación de virus respiratorios son específicos para cada virus; tanto en HRM RotorGene como en el fluidigm.
- Se consiguieron las mejores condiciones de amplificación de virus respiratorios en el equipo Biomark Fluidigm incluyendo la cantidad de muestra, la concentración de los iniciadores y la mezcla de amplificación adecuada.
- Obtuvimos un límite de detección de 457 moléculas empleando como modelo el virus de influenza H1N1 09 pdm.
- Se estandarizó de forma adecuada nuestra metodología permitiendo la evaluación de diferentes muestras respiratorias, se obtuvo la prevalencia de virus respiratorios en niños y adultos con infección respiratoria aguda.
- La mayor prevalencia de virus respiratorios (86.7%) se presentó en los niños ingresados al hospital debido a crisis asmática.
- La familia de virus con mayor prevalencia en niños fue Enteroviridae donde la detección de rinovirus/enterovirus fue de 44% y en adultos fue el virus de influenza con 54%.
- Aún se requiere elegir la mejor metodología con la cual se realizará la validación de nuestra prueba. Otra forma de validar nuestros resultados es por la secuenciación convencional o de nueva generación

10. BIBLIOGRAFIA:

1. Hernández, Hernández VA (2012). "Validación de las metodologías de RT-PCR en tiempo real y estudios de disociación de DNA de alta resolución para el diagnóstico y tipificación de infecciones causadas por el virus de influenza Aviar, estacional e influenza A H1N1". Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Edo. De Mex.
2. Meriluoto M, Hedman L, Tanner L, Simell V, Mäkinen M, Simell S, Mykkänen J, Korpelainen J, Ruskanen O, Ilonen J, Knip M, Simell O, Hedman K y Söderlund-Venermo M. (2012). "Association of Human Bocavirus 1 Infection with Respiratory Disease in Childhood Follow-up Study, Finland". *Emerging Infectious Diseases Journal*. Universidad de Helsinki, Helsinki, Finlandia. **(18)** 264.
3. Book, Knipe David M, Howley Peter; 2007 "Fields Virology". Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. **(1)** 795-802, 1305-1310, 1449-1450, 1497-1502, **(2)** 1601-1603, 2355-2360.
4. Book, Murray R.P, Baron JE; 2007 "Manual of Clinical microbiology" ASM press. Washington, D.C, USA. **(2)** 1361-1362, 1406, 1415-1416.
5. Tregoning J, Schwarze J. (2010). "Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology". *Clinical Microbiology Reviews*. St. George's University of London, Reino Unido. **(23)** 74-76.
6. Ernst E. (2011). "Treatment of Acute Viral Bronchiolitis". *The Open Microbiology Journal*. Medical University of Graz, Austria. **(5)** 159.
7. Centers for Disease Control and Prevention. (2011). "Clusters of Acute Respiratory Illness Associated with Human Enterovirus 68 – Asia, Europe, and United States, 2008-2010". *Morbidity and Mortality Weekly Report*. **(60)** 1301.
8. Pabbaraju K, Wong Sallene, Tokaryk K, Fonseca K, Drews S. (2011). "Comparison of the Luminex xTAG Respiratory Viral Panel with xTAG Respiratory Viral Panel Fast for Diagnosis of Respiratory Virus Infections". *Journal of Clinical Microbiology*. University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada. **(49)** 1738.
9. Broor S, Bharaj P, Chahar HS. (2008). "Human metapneumovirus: a new respiratory pathogen". *Journal Bioscience*. Indian Institute of Medical Sciences, New Delhi, India. **(33)**. 483.
10. Schilgen O, Müller A, Allander T, Mackay IM, Völz S, Kupfer B, Simon A. (2008). "Human Bocavirus: Passenger or Pathogen in Acute Respiratory

- Tract Infections". *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. **(21)**. 291.
11. Echevarría M. (2008). "Adenoviruses in Immunocompromised Hosts". *Clinical Microbiology Reviews*. Buenos Aires Argentina. **(21)**. 704.
 12. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Lindell TA, Andersson B. (2005). "Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples". Singapore. *PNAS*. **(102)**. 12891.
 13. Ginocchio. CC. (2011). "Strengths and Weaknesses of FDA-Approved/Cleared Diagnostic Devices for the Molecular Detection of Respiratory Pathogens". *Clinical Infectious Diseases Supplement Article*. New York, USA. (Suppl 4). S312.
 14. Pavia AT. (2011). "Viral Infections of the Lower Respiratory Tract: Old Viruses, New Viruses, and the Role of Diagnosis". *Clinical Infectious Diseases Supplement Article*. University of Utah, Salt Lake City, USA. (Suppl 4). S284.
 15. Organización Panamericana de la Salud (1999). "Hantaan virus en las Américas Guía para el Diagnóstico, el Tratamiento, la Prevención y el Control". Cuaderno Técnico No. 47. Washington, D.C. USA. 1, 16-17.
 16. Kahn SJ. (2006). "Epidemiology of Human Metapneumovirus". *Clinical Microbiology Reviews*. Yale University School of Medicine, Connecticut; USA. **(19)** 546.
 17. Mascona A. (2005). "Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease". *Journal Clinical Investigation*. New York USA. (115). 1688.
 18. Book. Edwards K, Cogar J, Sauders N; 2004 "Real Time PCR an Essential Guide" Horizon Bioscience. London. 163.
 19. Book. Shors T. 2009. "virus Estudio Molecular con orientación clínica". Panamericana. Universidad de Wisconsin Oshkosh; USA. 46-63.
 20. Book. 2009. "Harrison Principios de Medicina Interna". McGraw Hill. Edición 17°. **(2)** 1596, 1619.
 21. Applied biosystems. (2011). BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, from www.obt.lt/sc/files/BDTv3.1_Protocol_04337035.pdf.
 22. Invitrogen. (2011). 1 Kb Plus DNA Ladder, from <http://products.invitrogen.com/ivgn/en/US/adirect/invitroge?cmd=catDisplayStyle&catKey=101&filterDispName=1>.

23. National Center for Biotechnology Information. (2011). from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
24. QUIAGEN. (2008). QUIAGEN® One Step RT-PCR Kit Handbook, from www.qiagen.com/hb/onesteprtPCR.
25. Roche. (2010). MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, from www.roche-applied-science.com.
26. Fluidigm. (2012). Technology, from www.fluidigm.com/technology.html.
27. Centers for Disease Control and Prevention. (CDC), from www.cdc.gov.
28. QIAGEN. (2010). QIAamp® MinElute® Virus Spin Handbook. For simultaneous purification of viral RNA and DNA from plasma, serum and cell-free body fluids.
29. Seegene. (2012). Anyplex™ User Manual. Anyplex™ II RV16 Detection, for use with the CFX96™ Real-time PCR System (Bio-Rad).
30. Fluidigm. (2012). Using EvaGreen DNA Binding Dye for Gene Expression with the 48.48 and 96.96 Dynamic Array IFCs, Advanced Development Protocol (14).
31. QIAGEN. (2012). Rotor-Gene® Type-it® HRM® Discovery Handbook.
32. Book. Rodríguez CR; 2009 “VAM Vademécum Académico de Medicamentos”. Mc Graw Hill. 5° edición. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. 66