



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**PCR EN TIEMPO REAL PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE  
BOCAVIRUS HUMANO EN MUESTRAS NASOFARÍNGEAS DEL HOSPITAL  
INFANTIL DE MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”**

Tesis profesional para obtener el título de  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
Área Bioquímica Clínica

Presenta

ARÉVALO PALACIOS BRANDON AXEL

No. De cuenta: 310013990

2019

Director de Tesis: Dra. en B.E. Guillermina Campos Valdez  
Asesor de Tesis: M. en C. Roberto Cruz González Meléndez

Hospital Infantil de México “Federico Gómez”  
Laboratorio de Infectología  
Tesis Experimental



Ciudad de México 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## AGRADECIMIENTOS

Al Hospital Infantil de México “Federico Gómez” por recibirme y permitirme lograr mi desarrollo profesional, así como al Laboratorio de Infectología en el área de virología por todo su apoyo para poder desarrollar la parte experimental de este proyecto.

Un agradecimiento especial para el Dr. José Arellano Galindo y a la Dra. Guillermina Campos Valdez por su conocimiento y experiencia para el diseño, desarrollo y realización de los experimentos, así como sus consejos y la motivación de continuar por el camino de la investigación.

A la QFB. Patricia Vidal Millán por sus consejos y enseñanzas, además de siempre demostrarnos que la calidad humana es algo que no se puede comprar.

Al M. en C. Gabriel A. Romero Díaz por haber sido de los mejores profesores de la carrera y haberme brindado todo su conocimiento.

Al resto de profesores que me ayudaron en mi formación académica, por sus conocimientos y experiencias.

A los amigos y compañeros de la carrera: Enrique Velázquez, Jesús López, Daniel Grifaldo, Ulises Ramírez, Alejandro Carrillo, Enrique López, Sharone Garduño y Zeltzin Palacios, por su amistad y todo el apoyo en los momentos más difíciles.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por brindarme todas las herramientas para mi formación profesional, por haberme acogido y convertirse en mí segundo hogar todos estos años.

### DEDICADO A:

*Mi papá Bernardo Arévalo por haberme dado la oportunidad de existir, haberme dejado todos los consejos y enseñanzas para convertirme en un hombre de bien, para ver siempre por mi familia y luchar por todo aquello que me proponga, a dar siempre mi mayor esfuerzo y salir adelante de los problemas con la cabeza en alto. Mi mamá Magdalena Palacios por brindarme siempre su amor, su cariño y confianza, pero sobre todo por su enorme sacrificio, de ser madre y padre a la vez, de siempre darme todos los recursos y por hacer que la escuela siempre fuera mi única obligación. Esta meta alcanzada es también de ustedes. ¡Los Amo!*

*A mi hermano Edgar Arévalo por ser siempre esa persona que me motiva a ser mejor día a día y sé que al final de todo siempre estarás ahí para apoyarme. A mis mejores amigos Enrique Velázquez y Dalía Alvarado por haber estado conmigo siempre en las buenas y en las malas, por ser siempre ese apoyo, por todos los sabios consejos y por tantos años de amistad. A mi familia, a mi abuelita 'tony', a mis tíos y a mis primos, en especial a mis tíos Alejandra Moncada y Luis Arévalo por haberme acogido en su casa y siempre estar para apoyar en las buenas y en las malas. A Lizbeth Sánchez, por haberme apoyado e impulsado a terminar esta tesis, por todo el amor y el cariño y todos esos momentos de felicidad que me motivaron a ser mejor día a día.*

## ÍNDICE

I. Abreviaturas.....	6
II. Introducción .....	8
III. Marco Teórico .....	9
III.I Infecciones Respiratorias Agudas.....	9
III.II Bocavirus Humano.....	11
III.III Patogenicidad y Prevalencia de HBoV.....	15
III.IV Diagnóstico de HBoV.....	16
III.V PCR.....	18
Desnaturalización.....	20
Alineamiento .....	20
Extensión.....	21
III.VI PCR en tiempo real.....	24
IV. Planteamiento del Problema.....	30
V. Hipótesis .....	31
VI. Objetivo General.....	31
VI.I Objetivos Particulares.....	31
VII. Diseño Experimental.....	32
Estrategia metodológica para la estandarización de la RT-PCR para la identificación y cuantificación de Bocavirus Humano 1.....	33

VII.II Materiales .....	34
VII.III Métodos .....	37
A) Toma de muestras (Exudado nasofaríngeo) .....	37
C) PCR punto final enzima Amplicasa .....	38
D) Electroforesis.....	40
E) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Tiempo Real con SYBR Green de Thermo Scientific ®.....	41
F) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Tiempo Real con sonda TaqMan: Curva de concentración de sonda. ....	43
G) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Tiempo Real con sonda TaqMan: Curva de temperatura de alineamiento.....	44
H) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Tiempo Real con sonda TaqMan: Procesamiento de las muestras.....	46
J) Carga Viral con el método desarrollado .....	49
VIII.Resultados .....	50
PCR tiempo real con SYBR Green .....	50
Curva de concentración de sonda TaqMan por PCR tiempo real .....	52
Curva de temperatura de alineamiento con sonda TaqMan por PCR tiempo real .....	53
Curva estándar del Kit para cuantificación de Bocavirus .....	54

Curva estándar del método diseñado para cuantificación de Bocavirus .....	56
Muestras procesadas .....	57
Carga viral.....	58
Cuadro de datos.....	62
IX. Discusión .....	68
Amplificación de muestras .....	68
Frecuencia de infección de Bocavirus humano 1 .....	69
Carga viral.....	70
Correlación de datos clínicos con la carga viral .....	70
X. Conclusiones.....	71
XI. Propuesta.....	72
XII. Anexos .....	73
XIII. Glosario.....	74
XIV. Referencias .....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfica de la etiología Viral de las IRA en 2008.....	10
Figura 2. Estructura 3D de Bocavirus Humano .....	12
Figura 3. Secuencia completa de Bocavirus Humano.....	13
Figura 4. Estructura completa de la proteína NS1 de HBoV-1 .....	14

Figura 5. Ciclo completo de la PCR. .... 22

Figura 6. Ilustración de la forma correcta de tomar el exudado..... 29

Figura 7. Diagrama de la extracción de DNA de muestras biológicas..... 38

Figura 8. Diagrama con las condiciones con las que se programó el termociclador para la PCR punto final. .... 40

Figura 9. Diagrama con las condiciones con las que se programó el termociclador para la RT-PCR con SYBR Green. .... 42

Figura 10. Diagrama con las condiciones del termociclador para la PCR tiempo real con sonda

Figura 11. Diagrama de las condiciones del termociclador para la RT-PCR con sonda TaqMan ..... 47

Figura 12. Diagrama de las condiciones del termociclador con las que se corrieron las muestras por PCR tiempo real con sonda TaqMan. .... 48

Figura 13. Diagrama donde se señala la región que ocupa el amplicón con respecto a la secuencia completa de la proteína NS1. .... 49

Figura 14. Diagrama que señala la región donde se unen los oligos y la sonda en el fragmento de DNA blanco. .... 49

Figura 15. Grafica obtenida del Programa SmartCycler (Syber Green) ..... 51

Figura 16. Gráfica obtenida del programa SmartCylcer (Sonda)..... 52

Figura 17. Gráfica obtenida del programa SmartCycler (Temperatura) ..... 53

Figura 18. Gráfica de barras con las cargas virales de las muestras positivas. .... 61

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Materiales y métodos.....	34
Cuadro 2. Concentraciones para la PCR punto final.....	39
Cuadro 3. Secuencia de primers utilizados. ....	40
Cuadro 4. Concentración de los reactivos para la PCR tiempo real con SYBR Green. ....	41
Cuadro 5. Concentración de reactivos ocupados en la RT-PCR para realizar la curva de concentración de sonda.....	43
Cuadro 6. Concentración de reactivos empleados en la RT-PCR con sonda TaqMan para realizar la curva de temperatura de alineamiento. ....	45
Cuadro 7. Concentración de reactivos utilizados para la procesar las muestras por PCR tiempo real con Sonda TaqMan.....	47
Cuadro 8. Secuencia de los primers y la sonda ocupados para procesar las muestras.....	48
Cuadro 9. Carga viral de las muestras positivas. ....	58
Cuadro 10. Datos clínicos de los pacientes cuyas muestras resultaron positivas. ....	62
Cuadro 11. Correlación entre el sexo y el rango de carga viral.....	64
Cuadro 12. Estacionalidad de los pacientes frente a el rango de carga viral. ....	65
Cuadro 13. Correlación ente la situación Clínica y el rango de Carga viral.....	65
Cuadro 14. Correlación entre el rango de edad y el rango de carga viral. ....	66
Cuadro 15. Correlación entre coinfección y el rango de carga viral. ....	67

## I. Abreviaturas

A	Adenina
AdV	Adenovirus
BPV	Papilomavirus Bovino (Por sus siglas en inglés Bovine Papillomavirus)
C	Citosina
cDNA	Ácido Desoxiribunucleico Complementario (Por sus siglas en inglés Complementary Desoxyribonucleic Acid)
CMnV	Virus Minuto Canino (Por sus siglas en inglés Canine Minute Virus)
DNA	Ácido Desoxiribunucleico (Por sus siglas en inglés Desoxyribonucleic Acid)
dNTP	Desoxirribonucleotidos trifosfato (Por sus siglas en inglés Desoxyribonucleotid Triphosphate)
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Por sus siglas en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
Flu A	Influenza tipo A
Flu B	Influenza tipo B
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (por sus siglas en inglés Förster resonance energy transfer)
G	Guanina
HBoV-1	Bocavirus Humano 1 (por sus siglas en inglés Human Bocavirus 1)
HCoV	Coronavirus Humano (Por sus siglas en inglés Human Coronavirus)

hMPV	Metapneumovirus Humano (Por sus siglas en inglés Human Metapneumovirus)
HPIV	Virus Humano de la Parainfluenza (Por sus siglas en inglés Human Parainfluenza Viruses)
HRV	Rinovirus
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IgM	Inmunoglobulina tipo M
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IRA	Infección Respiratoria Aguda
ORFs	Marcos Abiertos de Lectura (Por sus siglas en inglés Open Reading Frames)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Por sus siglas en inglés Porymerase Chain Reaction)
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (Por sus siglas en inglés Quantitative Polymerase Chain Reaction)
RNAm	Ácido Ribonucléico mensajero (por sus siglas en inglés messenger Ribonucleic Acid)
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
VSR	Virus Sincicial Respiratorio

## II. Introducción

En México, se ha determinado que las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA por sus siglas) se presentan con mayor frecuencia en niños menores de 5 años, el origen de dichas infecciones es principalmente por patógenos virales y bacterianos, siendo los patógenos virales los que con mayor frecuencia se presentan.

De los principales agentes virales, el de más reciente descubrimiento y con menor número de estudios reportados es el Bocavirus Humano 1 (HBoV-1), este es un virus de la familia *Parvoviridae* que fue identificado por primera vez por Allender y col. en 2005.<sup>(1)</sup> Ha sido detectado en el 4.59% de los pacientes con enfermedad respiratoria aguda a nivel mundial,<sup>(2)</sup> en donde se ve asociado a sibilancias, otitis media aguda, neumonía grave e insuficiencia respiratoria<sup>(3)</sup> y en adultos se detecta con muy poca frecuencia.

En México, los estudios sobre HBoV-1 son bastante escasos y no se dispone de metodología diagnóstica de rutina; debido a esto, es de suma importancia desarrollar nuevas metodologías, que nos permita identificar el HBoV-1 de forma sensible y específica para dar un diagnóstico oportuno.

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR por sus siglas en inglés “Real Time-Polimerase Chain Reaction”), resulta ser uno de los métodos más sensibles que existen para la identificación de virus, ya que tanto los oligonucleótidos como la sonda utilizada, son específicos para el virus de interés, esto además permite detectar cargas virales en un tiempo menor respecto a otras técnicas convencionales.

### III. Marco Teórico

#### III.I Infecciones Respiratorias Agudas

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) son padecimientos infecciosos de las vías respiratorias que evolucionan en menos de 15 días y que en ocasiones se complican con neumonía. En México, las IRA son un problema de Salud Pública, ya que son una de las 10 principales causas de defunción en la población general y representan 3 de las primeras causas de muerte en menores de 5 años.<sup>(4)</sup> Éstas se caracterizan por presentar dificultad respiratoria, los cuales pueden estar o no acompañados de fiebre.<sup>(5)</sup> De acuerdo con las estadísticas oficiales del IMSS publicadas en él 2013, las IRA constituyen la primera causa de morbilidad e ingreso hospitalario de menores de 5 años. Por lo que este tipo de patologías, se definen como el conjunto de enfermedades transmisibles del aparato respiratorio, que incluyen desde el resfriado común hasta la neumonía, pasando por la otitis media aguda, amigdalitis, sinusitis, bronquitis aguda, laringotraqueitis, bronquiolitis y laringitis, con evolución menor a 15 días y con la presencia de uno o más síntomas o signos como tos, rinorrea, obstrucción nasal, odinofagia, otalgia, disfonía.<sup>(6, 7)</sup>

Estas infecciones generalmente son causadas por diferentes microorganismos como virus y bacterias, teniendo a los virus como la causa principal de dichas infecciones. Entre los principales virus están: Influenza A y B (Flu A y Flu B), Parainfluenza 1, 2 y 3 (HPIV), Adenovirus (AdV), Virus Respiratorio Sincicial (VRS), Rinovirus (HRV), Coronavirus (HCoV), Metapneumovirus Humano (hMPV) y Bocavirus Humano (HBoV).<sup>(8)</sup>

Según el boletín médico del Hospital Infantil de México publicado en febrero de 2018, en el periodo de octubre de 2014 a enero de 2016 se tomaron 1,705 muestras nasofaríngeas, que tuvieron un porcentaje de positividad para cualquier virus respiratorio del 49.85% (850 muestras), distribuidos de la siguiente manera:

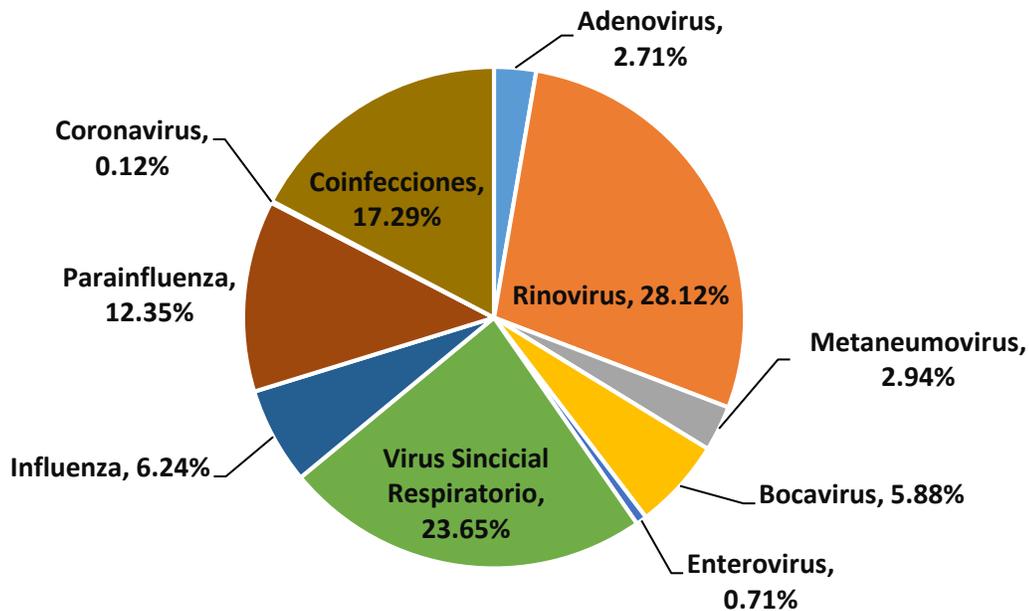


Figura 1. Gráfica de etología viral de las IRA en México entre 2014- 2016.<sup>(9)</sup>

Es importante mencionar que el HBoV se ha encontrado en mayor medida, asociado a casos de coinfección como agente patógeno secundario, actuando en conjunto con patógenos como VSR o hMPV y encontrado principalmente en casos donde las infecciones primarias se complicaban o evolucionaban de manera negativa, cosa que comenzó a llamar la atención de un sector de la comunidad médica y fue en el año 2005 donde se logró identificar al Bocavirus Humano, que si bien en ese momento su prevalencia era mínima, poco a poco crecería el porcentaje de infección a nivel mundial.<sup>(10)</sup>

Como se observa en la Figura 1 el HBoV ocupa un lugar importante entre los virus causantes de IRA y hasta la fecha los estudios en México respecto a este virus son muy escasos.

### III.II Bocavirus Humano

El Bocavirus humano (HBoV), nombre que recibió este nuevo patógeno, fue descubierto en 2005 por Allander y col., a partir de muestras respiratorias provenientes de niños.<sup>(1)</sup> Desde entonces se ha detectado en aspirados nasofaríngeos, suero y sangre de pacientes con infección respiratoria y en muestras de materia fecal de pacientes con IRA y/o gastroenteritis.<sup>(11)</sup>

Hablando de la composición y la estructura del virus, sus secuencias genéticas y el análisis filogenético muestran una estrecha relación entre HBoV y 2 miembros de la familia Parvoviridae: Parvovirus Bovino (BPV) y Virus Minuto Canino (CMnV), de ahí el nombre de Bocavirus Humano (HBoV), “BO” de bovino y “CA” de canino<sup>(12)</sup>, clasificado taxonómicamente dentro del género Bocavirus, subfamilia *Parvovirinae*, familia *Parvoviridae*.<sup>(13)</sup> HBoV, es un pequeño virus no envuelto, icosaédrico, contiene un genoma de 5,3 kb de DNA de cadena simple, de sentido negativo<sup>(14)</sup> y no crece en líneas celulares estándares por lo cual su diagnóstico se ha basado en la detección del DNA.<sup>(15)</sup>

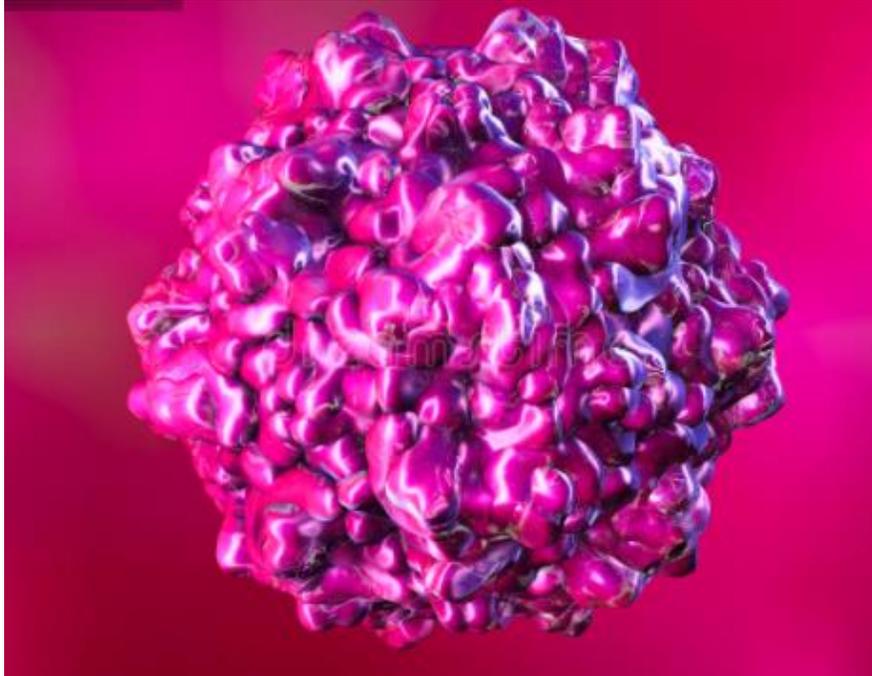


Figura 2. Estructura 3D de Bocavirus Humano<sup>(16)</sup>

El mecanismo de replicación de HBoV aún no está del todo claro, el modelo más cercano propuesto es el conocido como: “Rolling Hairpin”.<sup>(17, 18)</sup> Debido a que la replicación de otros Parvovirus se lleva a cabo mediante la vía del modelo “Rolling-hairpin” con la generación de intermediarios concatenaméricos caracterizados por una estructura de cabeza a cabeza o de cola a cola, se cree que Bocavirus, por pertenecer a la familia Parvoviridae sigue el mismo patrón. Sin embargo, aunque la presencia de monómeros de cabeza a cabeza se ha demostrado en HBoV1, HBoV2 y HBoV3, los intermediarios concatenaméricos no se han encontrado todavía,<sup>(17, 19, 20, 21, 22)</sup> es por ello que se mantiene en discusión el mecanismo de replicación.

El genoma de HBoV contiene tres marcos abiertos de lectura (ORFs por sus siglas en inglés “open reading frames”) (Figura 3). Los dos primeros codifican las proteínas

no estructurales NS1 y NP1 y el tercero codifica las dos proteínas de la cápside viral: VP1 y VP2.<sup>(23)</sup> Cuatro especies de HBoV han sido descubiertas: HBoV1 es la especie que predomina en el árbol respiratorio mientras que HBoV2, HBoV3 y HBoV4 se hallaron principalmente en muestras de materia fecal.<sup>(24)</sup>

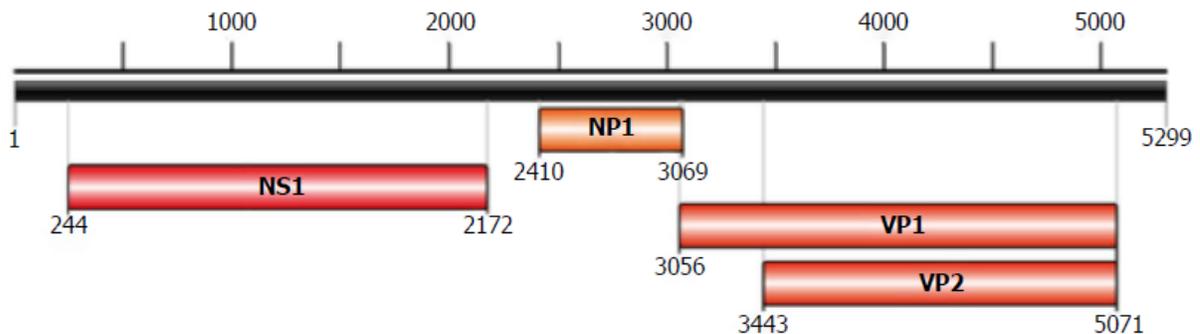


Figura 3. Secuencia completa de HBoV, con sus 3 marcos abiertos de lectura.<sup>(25)</sup>

La secuencia de nucleótidos de las proteínas de la cápside VP1 y VP2 tiene una alta variabilidad, comparada con la de las proteínas no estructurales NS1 y la nucleoproteína NP1, esta última con actividad de evasión del sistema inmunológico,<sup>(26)</sup> por lo cual su análisis ha dividido a HBoV1 en dos genotipos: St1 y St2,<sup>(26)</sup> además esto ha permitido que tanto NS1 como NP1 sean elegidos más frecuentemente como los objetivos principales de estudios de PCR debido a que poseen secuencias altamente conservadas.

Las regiones no codificantes contienen secuencias palindrómicas, comúnmente conocidas como repeticiones terminales invertidas, que son esenciales para la replicación viral.<sup>(27)</sup> NS1 es una proteína multifuncional que tiene varios sitios con

diferentes funciones: en el N-terminal cumple una función de unión y endonucleasa, en el C-terminal se lleva a cabo una transactivación y en la región media tiene función como ATPasa y helicasa.<sup>(28)</sup> Además, así como sucede en el Virus Minuto Canino y en el Virus Minuto de Ratón con NP1, NS1 tiene un rol esencial en la replicación del DNA de HBoV. Esta proteína no estructural también participa en la apoptosis, la detención del ciclo celular y la transactivación génica en B19V.<sup>(29)</sup>

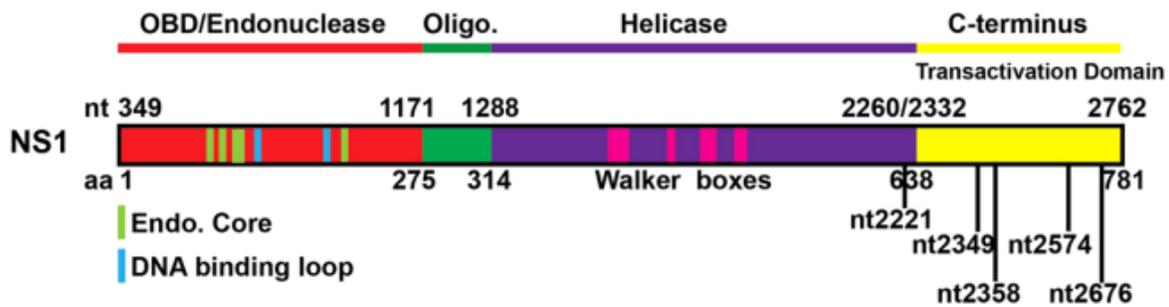


Figura 4. Estructura completa de la proteína NS1 de HBoV-1. <sup>(24)</sup>

La secuencia completa del gen NS1 de HBoV1 tiene 1928 nt de longitud y codifica un polipéptido de 643 aminoácidos (aa). El gen NP1 tiene una longitud de 660 nt y su proteína codificada varía en longitud entre las diferentes cepas, que van de 214 a 219 aa. Además, el ORF HBoV1 VP1 / VP2 contiene la secuencia de codificación completa del gen VP1, que codifica una proteína de 671 aa y el gen VP2 dentro de la secuencia VP1, codificado del nucleótido 3443 a 5071.<sup>(30)</sup>

### III.III Patogenicidad y Prevalencia de HBoV

La patogénesis de HBoV sigue siendo poco caracterizada, principalmente debido a la falta de líneas celulares específicas para el cultivo de virus o modelos animales experimentales.<sup>(31)</sup> Se sabe que el virus ingresa al huésped de manera directa, a través del tracto respiratorio y su posterior paso a torrente sanguíneo, llegando en algunos a tracto gastrointestinal, en donde se ha detectado con menor frecuencia, además la presentación clínica más descrita de la infección por este virus, incluye tos, fiebre, rinorrea, exacerbación del asma, bronquiolitis, sibilancias agudas y neumonía. La media de la carga viral encontrada en los aspirados nasofaríngeos de pacientes con infecciones respiratorias es de  $4.9 \times 10^3$  copias / mL.<sup>(32, 33)</sup>

Las monoinfecciones con HBoV son raras, mientras que las infecciones dobles se observan con frecuencia. Los casos de infección por HBoV muestran una alta tasa de coinfecciones con otros virus y bacterias respiratorios y patógenos gastroenteríticos, tales como rinovirus humano, adenovirus, norovirus, rotavirus.<sup>(35)</sup>

HBoV tiene una distribución mundial; su transmisión e infección ocurre durante todo el año, pero es predominante durante los meses de invierno y primavera.<sup>(34)</sup> Guido y colaboradores<sup>(35)</sup>, calcularon la prevalencia mundial de la infección con base a una búsqueda de artículos publicados en la base de datos Medline desde el 6 de septiembre de 2005 (el año del descubrimiento de HBoV) hasta el 15 de marzo de 2016, concluyendo que de 233,761 muestras de pacientes con enfermedades respiratorias, 10,745 resultaron positivas para HBoV lo que da una prevalencia mundial del 4.59%. De las muestras positivas para HBoV, 5630 resultaron positivas

también para otros virus, por lo que el porcentaje mundial de coinfección es del 2.4% y el porcentaje de infección teniendo a HBoV como único patógeno detectado es del 2.19% a nivel mundial. En México solo se tiene reportado un estudio en el que se procesaron 162 muestras de pacientes con enfermedad respiratoria de los cuales únicamente 8 fueron positivos para HBoV dando así una prevalencia del 4.9%. De los 8 pacientes positivos, 2 pacientes fueron positivos también para VSR y 1 paciente para hMPV, por lo que se puede decir que el virus se encontró como único patógeno en el 3.08% de los casos y en coinfección el 1.85% de los casos. La seroprevalencia de HBoV está relacionada con la edad y oscila entre aproximadamente el 40% en niños entre 18 y 23 meses de edad hasta casi el 100% en niños mayores de 2 años, con un promedio de 76.6% en niños y 23.4% en adultos.<sup>(36, 37)</sup>

Debido a la dificultad que representan técnicas de cultivo y los modelos animales para la detección de HBoV, se ha optado principalmente por técnicas serológicas y de biología molecular tales como la PCR y RT-PCR, siendo la segunda una de las más precisas y que a su vez nos permite conocer la carga viral de los pacientes para un mejor diagnóstico.<sup>(37)</sup>

#### III.IV Diagnóstico de HBoV

Al principio, el método principal para detectar infecciones por HBoV en muestras respiratorias y gastrointestinales fue representado por una herramienta directa, es decir, PCR convencional, la cual posteriormente fue sustituida por la RT-PCR.

Las técnicas de PCR permiten el aislamiento de los fragmentos del genoma viral a partir de muestras de exudados nasofaríngeos, broncoalveolar, heces, suero y orina a través de la amplificación de las regiones génicas NP1, NS1 y / o VP1 / 2.

NP1 y NS1 están más conservados que VP1 / 2, y por lo tanto, son dirigidos comúnmente para la detección basada en PCR del virus.<sup>(38)</sup>

Posteriormente, se desarrollaron ensayos multiplex para detectar genotipos de HBoV en infecciones respiratorias; estos incluyeron Luminex RVP (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Canadá) y RespiFinder (Pathofinder, Maastricht, Holanda).<sup>(39, 40)</sup> A pesar de sus inconvenientes actuales (es decir, alto costo, intensidad de trabajo, tiempo de respuesta prolongado, entrenamiento específico del personal, etc.), a diferencia de la RT-PCR, estos nuevos enfoques pueden proporcionar más información sobre especies o tipo de virus; por lo tanto, son de interés para el diagnóstico de virus en entornos clínicos y de salud pública.

Se han desarrollado métodos serológicos para la estimación de anticuerpos específicos de HBoV en muestras de suero, como el Western Blott, y la inmunofluorescencia. El Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA por sus siglas en inglés “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”) y el Enzimoimmunoanálisis (EIA por sus siglas en inglés “Enzyme Immunoanalysis Assay”), son ensayos serológicos cualitativos y cuantitativos confiables utilizados para detectar anticuerpos IgG e IgM y afinidad de IgG<sup>(41)</sup> utilizando VP2 recombinante o proteínas de cápside VLP; este último, por ejemplo, es producido por una línea celular de insectos infectada con un vector de Baculovirus y

posteriormente utilizada para producir antisueros anti-HBoV de conejo que se aplica para desarrollar una prueba de ELISA. La prueba de avidéz de IgG permite distinguir entre infecciones primarias y secundarias o inmunoactivaciones con alta especificidad diagnóstica. Los pocos estudios serológicos disponibles a la fecha se han centrado principalmente en cuestiones epidemiológica; sin embargo, considerando que los HBoVs son agentes altamente prevalentes que pueden establecer infecciones persistentes, la interpretación de las pruebas serológicas en el contexto de la situación clínica puede ser tan complicada como el uso de los resultados de la PCR.

### III.V PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima DNA polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células.<sup>(25)</sup>

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (DNA o cDNA), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio ( $Mg^{2+}$ ), una solución amortiguadora o buffer y  $H_2O$  libre de DNAsas.

En la PCR, el templado son las cadenas de DNA que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la DNA polimerasa se encarga de la catálisis de la

reacción, sintetizando las nuevas cadenas de DNA que llevan la secuencia blanco. La enzima usada con mayor frecuencia se llama Taq DNA polimerasa,<sup>(42)</sup> que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*; la cual, vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su DNA polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. El rasgo que distingue a esta enzima bacteriana de las polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas, considerándola una enzima termoestable.

Los primers son secuencias de oligonucleótidos que delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente, su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser mayor de 55% en la secuencia.<sup>(43)</sup> Si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos. Esto repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «forward» o sentido y otra «reward» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de DNA puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' tal como sucede endógenamente.

Por su parte, los dNTP's son las bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de DNA. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada, ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa

PCR en tiempo real para identificación y cuantificación de HBoV

(concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM). La solución amortiguadora que se usa en la reacción está compuesta de Tris-HCl (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1X.

El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM. El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos.

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo mediante 3 pasos:

### **Desnaturalización.**

En esta etapa, las cadenas de DNA son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo con el modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso. <sup>(44)</sup>

### **Alineamiento.**

En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el

complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting ( $T_m$ ) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. La Temperatura de Fusión,  $T_m$ , de un oligonucleótido es un valor de crítica importancia. Los principales factores que afectan este valor son: concentración de sales, concentración de ADN, presencia de agentes desnaturalizantes (DMSO o formamida), secuencia, longitud y condiciones de hidridización. La ecuación más simple para calcular la  $T_m$  está dada por la Regla de Wallace:

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

En donde A, G, C, y T corresponden al número de cada nucleótido presentes. Esta ecuación se desarrolló para oligos 'cortos' de 14 a 20 bases que hibridarían con sus correspondientes complementarios unidos a una membrana con una concentración de NaCl 0.9M

Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente. <sup>(45)</sup>

### **Extensión.**

En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de DNA. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del DNA, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional y el tiempo que se utiliza para este paso es de 30 segundos. <sup>(51)</sup> Al final de

la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa.<sup>(46)</sup> La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo.

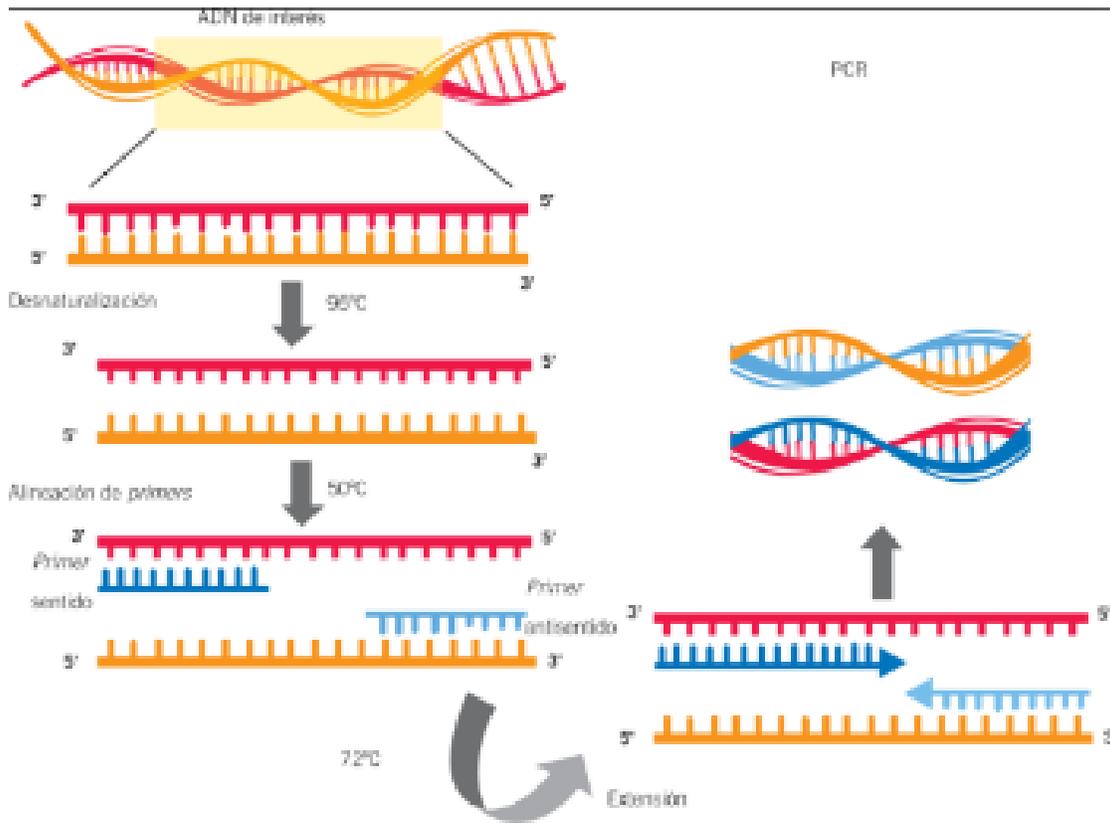


Figura 5. Ciclo completo de la PCR. <sup>(54)</sup>

Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente y posteriormente se vacía a un

recipiente que sirve de base para que solidifique. Generalmente el porcentaje al que se prepara el gel es al 1.2% aunque, dependiendo del tamaño de las moléculas, puede ser de hasta el 2%. Otro reactivo que se agrega al gel es un compuesto conocido como bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al DNA de doble cadena. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Es importante manipular con mucho cuidado este compuesto porque se sabe que es mutagénico y teratógeno.<sup>(47)</sup>

Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador de peso molecular que contenga un número determinado de segmentos de DNA conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón. El marcador de peso molecular es fácilmente adquirido en el mercado, ya que se ofrece una gama de marcadores con distintos pesos moleculares para elegir el de nuestro interés. Finalmente, la visualización de los amplicones se lleva a cabo tomando una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz UV.

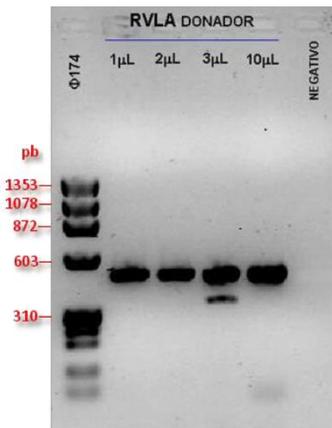


Imagen 1. Electroforesis del ADN extraído de muestras sanguíneas con el método de QIAGEN, en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.<sup>(48)</sup>

La combinación adecuada de los reactivos antes mencionados nos proporciona la capacidad de realizar una síntesis de DNA in vitro, lo que ha servido como un impulso para la investigación de muchos temas, incluidos aquellos relacionados al área de la salud, ya que gracias a esta técnica y otras posteriores los diagnósticos se han podido hacer de manera más específica y en menor tiempo.

Las ventajas de la PCR son muchas, pero una de las principales desventajas que presenta es que se trata de un método cualitativo, ya que el hecho de que se pueda ver el amplicón en el gel no nos proporciona ninguna información sobre la cantidad de DNA existente en la muestra que se está procesando. Para ello se ha modificado y ha dado paso a una técnica mucho más sensible y específica denominada RT-PCR, la cual tiene como principal ventaja, el ser una técnica cuantitativa.

### III.VI PCR EN TIEMPO REAL

Los primeros que sentaron las bases para desarrollar la RT-PCR fueron Higuchi y colaboradores, en 1992, al videograbar en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al DNA durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV.<sup>(49)</sup> Desde entonces, el objetivo de la RT-PCR ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reactivos fluorescentes en la reacción.

El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que

es posible cuantificar la cantidad de DNA en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Estas últimas dos características representan grandes ventajas de la RT-PCR, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción,<sup>(50)</sup> sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final.

Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de la hebra molde, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es para cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del RNAm procedente de células o tejidos. La cantidad de RNAm que puede detectar la reacción puede ser a partir de concentraciones bajas a diferencia de la PCR punto final que necesita una mayor concentración.

Los reactivos en la RT-PCR son los mismos utilizados en la PCR punto final, sólo que generalmente la enzima, dNTP's, Mg<sup>2+</sup>, el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados, se venden juntos en una solución conocida como «Mezcla de reacción», el agua va por separado y también debe ser libre de nucleasas. Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente. Para evitar estos problemas, una alternativa es

diseñar los primers, utilizando programas informáticos disponibles, o comprarlos ya validados de las compañías de Biología Molecular, quienes garantizan resultados altamente eficientes y satisfactorios para los usuarios.

El monitoreo de los productos amplificados conforme transcurre la reacción es un paso importante en la RT-PCR, para ello la estrategia tecnológica que ha dado buenos resultados son los sistemas basados en reporteros fluorescentes. En general, estos sistemas pueden ser clasificados en dos métodos diferentes: específicos y no específicos.<sup>(51)</sup>

Los métodos no específicos se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el DNA de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de DNA de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El intercalante más usado para estos fines se llama SYBR Green,<sup>(52)</sup> la cual es una molécula cargada positivamente que, mientras esté en solución sin unirse al DNA de doble cadena, prácticamente no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une al surco menor del DNA, incrementa hasta 1,000 veces su fluorescencia. Aunque el SYBR Green es uno de los intercalantes fluorescentes más utilizados por los investigadores debido a su bajo costo, la principal desventaja es que puede unirse a cualquier molécula de DNA de doble cadena, incluyendo dímeros de primers. Para evitar esta situación, se puede optimizar la reacción realizando una “curva melting” o “curva de disociación” al final de la reacción, cuya función es la de evaluar si se formó un producto único o si hay presencia de dímeros

de primers. Hoy en día la mayoría de software, en los termocicladores ofrecen esta función que es fácil de aplicar y analizar.

Los métodos específicos parten de principios distintos a diferencia de los no específicos y tienen en común la señal de fluorescencia emitida para detectar los productos amplificados. Estos métodos siguen el principio conocido como “transferencia de energía de resonancia fluorescente” (FRET, por sus siglas en Inglés) para generar la señal; este método consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o “Quencher”. Para ello, existen dos métodos específicos, éstos son: pruebas basadas en hidrólisis y por hibridación. Los primeros se basan en sondas fluorescentes de oligonucleótidos marcados con un reportero fluorescente y un “Quencher”, ambos se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco.

Cuando hibrida, ocurren cambios conformacionales en el reportero y el “Quencher”, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo. Estos métodos son muy seguros, ya que mientras no exista unión de la sonda a su blanco, no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia; es por eso que la especificidad es muy alta. Un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas como TaqMan<sup>®</sup>.<sup>(53)</sup>

Los métodos por hibridación consisten en una sonda unida a un reportero fluorescente que está en estrecha cercanía con un aceptor fluorescente unido a otra sonda. Tanto el reportero como el aceptor presentan un espectro de excitación y de

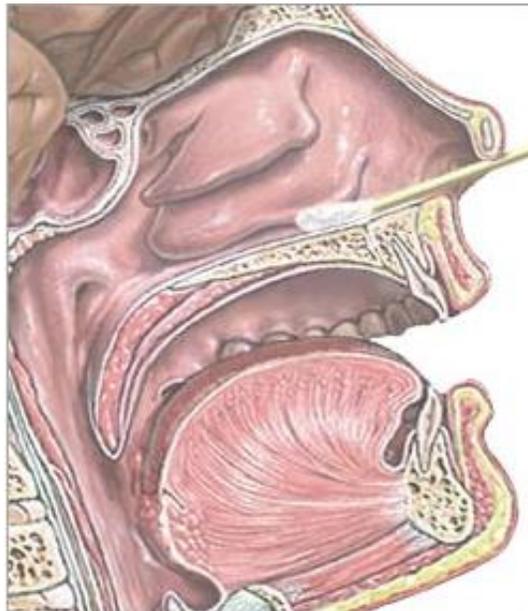
emisión similar, de tal forma que cuando las dos sondas hibriden a su templado blanco, el reportero es excitado y la señal emitida es transferida al aceptor, generando un incremento en la cantidad de fluorescencia. Un ejemplo de este método son las sondas Molecular Beacons.<sup>(54)</sup> Los métodos específicos son más costosos que los no específicos, pero son más eficientes al garantizar la especificidad de la reacción, evitando la formación de productos inespecíficos.

### III.VII EXUDADO NASOFARÍNGEO

Es una técnica mediante la cual se obtiene una muestra de mucosa directamente de la zona superior de la garganta, el método más común en pacientes ambulatorios es el denominado hisopado nasofaríngeo, el cual consiste en colocar al paciente recostado con su cabeza inclinada hacia atrás para que el movimiento natural de las fosas nasales se abra paso hasta llegar a la zona posterior de la garganta, en ella se introduce un hisopo de alginol con el que se frota suavemente en la parte superior de la garganta por detrás de la nariz para obtener la mayor cantidad de muestra mucosa posible, la cual se usa para cultivo en medios específicos o su almacenamiento con solución salina, para la posterior obtención del material genético mediante una extracción de DNA.<sup>(55)</sup>

Esta técnica es útil pero resulta ser un proceso bastante doloroso para el paciente, por lo que en la práctica resulta poco efectivo, en el caso de pacientes hospitalizados sobre todo cuando los pacientes son niños menores de 2 años, la técnica que se utiliza es el aspirado nasofaríngeo, el cual es un método menos doloroso pero requiere de la utilización de un mecanismo de succión y una sonda

que permita llegar hasta la zona de extracción de la muestra, es un proceso mas complejo, pues requiere de una aplicación de solución salina en una de las venas nasales, situación que puede provocar lagrimeo o tos en el paciente, posteriormente y una vez inmobilizada la cabeza del paciente se introduce la sonda hasta la pared posterior de la faringe, una vez ahí se procede a succionar con una jeringa o algún otro mecanismo de succión, hasta obtener la muestra, la cual debe ser colocada en solución salina, se recomienda que esta no exceda el mililitro de volumen ya que de otra manera se diluiría la muestra.<sup>(56)</sup>



*Figura 6. Ilustración de la forma correcta de tomar el exudado mediante hisopado.<sup>(56)</sup>*

## IV. Planteamiento del Problema

HBoV-1 es un patógeno que ha ido tomando relevancia a partir del 2005, año de su descubrimiento, ya que con mayor frecuencia se ha asociado a coinfecciones con otros virus tales como el VSR y el hMPV, que afectan el sistema respiratorio, presentando sibilancias agudas y neumonía como principales cuadros clínicos. Además, se sabe que este virus afecta principalmente a niños menores de 5 años en época de frío donde las infecciones respiratorias son más recurrentes. Se ha descrito también que Bocavirus juega un papel importante en la Patogenicidad de otros virus, ya que al presentarse estas coinfecciones el tratamiento se complica o se vuelve ineficaz, por lo que es indispensable identificar todos aquellos patógenos que se encuentren relacionados a estas infecciones.

En México, solo se tiene registro de un estudio, donde se determinó la frecuencia de infección y coinfección de HBoV1 la cual determina que el porcentaje de infección es de 4.59%, mientras que la media mundial es del 4.9% y que se presenta en México en coinfección en el 1.85% de los casos, mientras que la media mundial para este rubro es del 2.4%. Es por eso que se diseñaron Primers y sonda específicos para HBoV1, mediante programas bioinformaticos, cuyo blanco de amplificación corresponde a la región amino terminal de la proteína NS1 y por lo que se plantea la siguiente pregunta: ¿Cuáles serán las mejores condiciones metodológicas para la identificación y cuantificación del HBoV-1 en muestras de exudados nasofaríngeos mediante la técnica de RT-PCR?.

## V. Hipótesis

Al desarrollar una metodología de identificación para HBoV-1 en la que se utiliza la RT-PCR y donde los iniciadores, así como la sonda a utilizar, son diseñados específicamente para amplificar una región conservada del DNA del virus, que codifica para la proteína NS1, se podrá identificar la presencia de HBoV-1 en muestras de exudados nasofaríngeos, además de cuantificar la carga viral de las muestras que resulten positivas.

## VI. Objetivo General

Establecer las condiciones metodológicas de la técnica de RT-PCR para la identificación del HBoV en muestras de exudado nasofaríngeos de pacientes del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” tomadas entre los años 2009 y 2010.

### VI.I Objetivos Particulares

1. Alinear los primers para usarlos a la misma concentración.
2. Determinar la concentración de sonda a utilizar para la RT-PCR, mediante una curva de concentraciones.
3. Procesar las 350 muestras que se encuentran disponibles.
4. Desarrollar una curva estándar con el método diseñado a partir de una curva realizada con un kit comercial.
5. Cuantificar las muestras que resulten positivas.
6. Determinar la frecuencia de infección de este virus

7. Determinar si la carga viral está relacionada con datos clínicos como edad, sexo, coinfecciones y estacionalidad.

## VII. Diseño Experimental

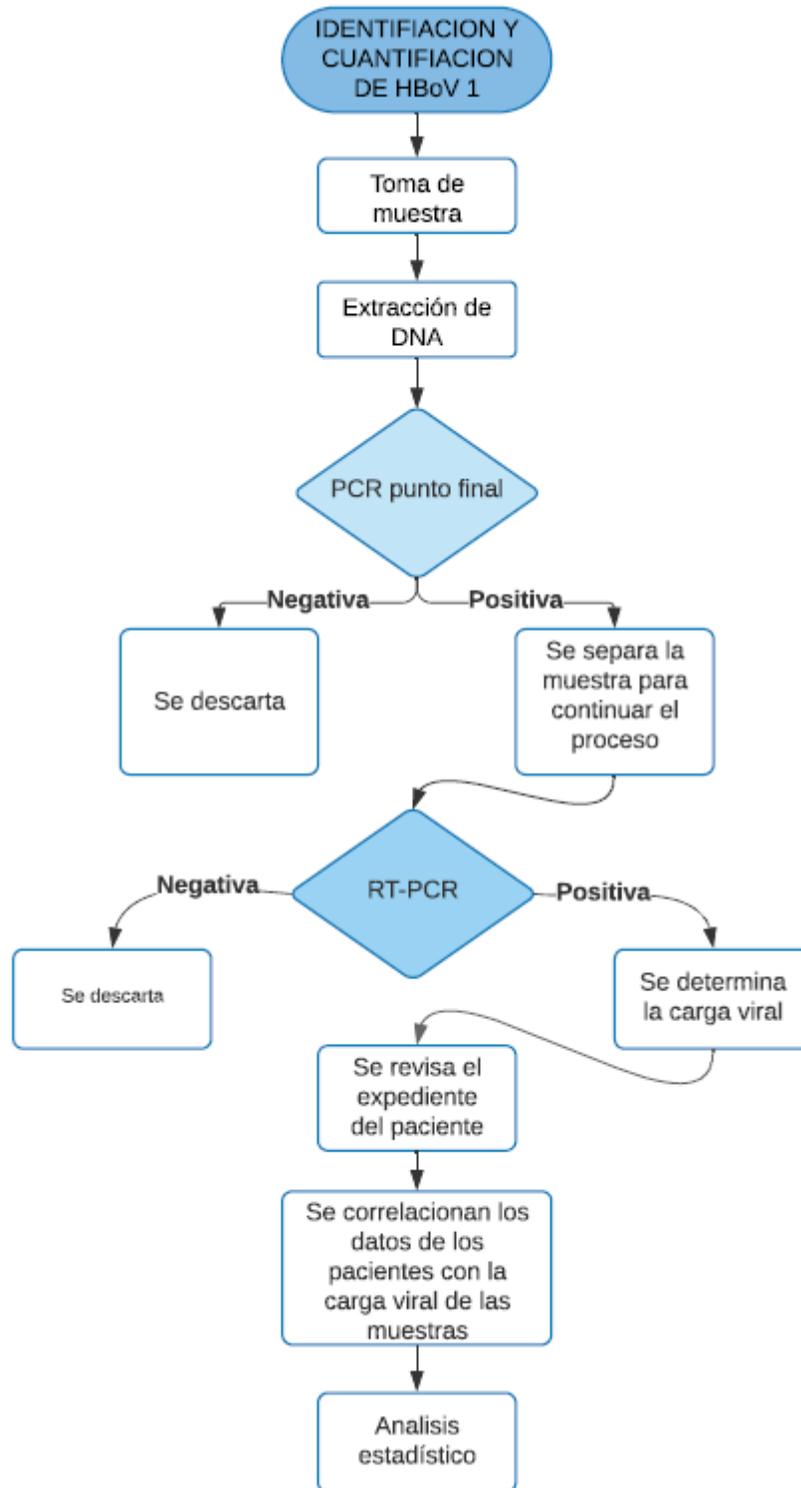
Tipo de Estudio: Experimental, Descriptivo, Transversal y Prospectivo.

Población de estudio: 350 muestras de DNA extraído de muestras nasofaríngeas obtenidas en el Hospital Infantil de México entre los años 2009 y 2010 de niños menores de 9 años.

Criterios de inclusión: muestras de DNA extraído de exudados nasofaríngeos que se le realizaron a niños menores de 9 años entre los años 2009 y 2010 en el Hospital Infantil de México, previamente procesadas mediante la técnica de PCR punto final que resultaron probables positivas.

Criterios de exclusión: muestras de DNA extraído exudados nasofaríngeos que se le realizaron a niños menores de 9 años entre los años 2009 y 2010 en el Hospital Infantil de México previamente procesadas mediante la técnica de PCR punto final que resultaron negativas.

**Estrategia metodológica para la estandarización de la RT-PCR para la identificación y cuantificación de HBoV 1.**



## VII.II Materiales

Cuadro 1. Materiales y métodos

MATERIALES	METODOS
<p>Hisopo de Alginol</p> <p>Medio Escencial Minimo con sales de Hanks</p> <p>Hielera</p>	<p>Toma de Muestras (Exudado Nasofaríngeo)</p>
<p>Muestra (Exudado Nasofaríngeo)</p> <p>Mezcla Fenol-Cloroformo-Isoamílico</p> <p>Acetato sódico</p> <p>Etanol absoluto frío</p> <p>Etanol al 70%</p> <p>Agua bidestilada</p> <p>Vortex</p> <p>Microcentrífuga</p> <p>Refrigerador a -20°C</p> <p>SpeedVac</p> <p>Tubos Eppendorf 1.5 mL</p> <p>Micropipetas 0.5-10µL, 5-20µL, 20-200µL, 200-1000µL</p>	<p>Extracción de DNA</p>

<p><b>Amortiguador 10X</b></p> <p><b>MgCl<sub>2</sub> 20X</b></p> <p><b>dNTP's 10X</b></p> <p><b>DNA control positivo</b></p> <p><b>DNA extraído</b></p> <p><b>Primers (Forward y Reverse) 10X</b></p> <p><b>Enzima Amplicasa®</b></p> <p><b>Agua MiliQ</b></p> <p><b>Tubos Eppendorf 0.5 mL, 1.5 mL</b></p> <p><b>Termociclador</b></p> <p><b>Campana de extracción</b></p> <p><b>Micropipetas 0.5-10µL, 5-20µL, 20-200µL, 200-1000µL</b></p>	<p><b>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Punto Final</b></p>
<p><b>Agarosa</b></p> <p><b>TBE 1X</b></p> <p><b>TBE 10X</b></p> <p><b>Bromuro de Etidio al 10%</b></p>	<p><b>Electroforesis</b></p>
<p><b>Matraz Erlenmeyer 250 mL</b></p>	

<p><b>Probeta 100 mL</b></p> <p><b>Camara de Electroforesis</b></p> <p><b>Base y peines para geles</b></p> <p><b>Transiluminador</b></p> <p><b>Micropipetas 0.5-10µL, 5-20µL, 20-200µL, 200-1000µL</b></p>	
<p><b>TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)</b></p> <p><b>Primer Forward (5´ CCTACTCATTACAGGACTTTA 3´)</b></p> <p><b>Primer Reverse (5´ GCGCGATCAGTGTACATAGA 3´)</b></p> <p><b>Sonda TaqMan</b></p> <p><b>Muestra de DNA</b></p> <p><b>Agua MiliQ</b></p> <p><b>Tubos Eppendorf 0.5 mL, 1.5 mL</b></p> <p><b>Termociclador Cepheid SmartCycler II®</b></p> <p><b>Campana de extracción</b></p> <p><b>Tube Racks de Cepheid ®</b></p> <p><b>Computadora con Software SmartCycler II®</b></p>	<p><b>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real</b></p>
<p><b>Micropipetas 0.5-10µL, 5-20µL, 20-200µL, 200-1000µL</b></p>	

<p><b>Kit Human Bocavirus (HBoV) Real Time PCR de MyBioSource®</b></p> <p><b>Pool DNA</b></p> <p><b>Termociclador Cepheid SmartCycler II®</b></p> <p><b>Campana de extracción</b></p> <p><b>Tube Racks de Cepheid ®</b></p> <p><b>Computadora con Software SmartCycler II®</b></p> <p><b>Micropipetas 0.5-10µL, 5-20µL, 20-200µL, 200-1000µL</b></p>	<p><b>Cuantificación HBoV</b></p>
--	-----------------------------------

### VII.III Métodos

#### A) Toma de muestras (Exudado nasofaríngeo)

- Se utilizó la técnica de aspirado nasofaríngeo.

#### B) Extracción de DNA

- Se añadió un volumen igual al de la muestra de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó con vortex.
- Se centrifugó a temperatura ambiente y se transfirió la parte acuosa.
- Se añadió acetato sódico y etanol frío al 100% para que precipitara.
- Se dejó precipitar a -20°C por 30 minutos.
- Se centrifugó y eliminó el sobrenadante.
- Se lavó con etanol al 70%, para re-precipitar.
- Se centrifugó y eliminó el sobrenadante de nuevo.

- Se resuspendió en agua destilada.

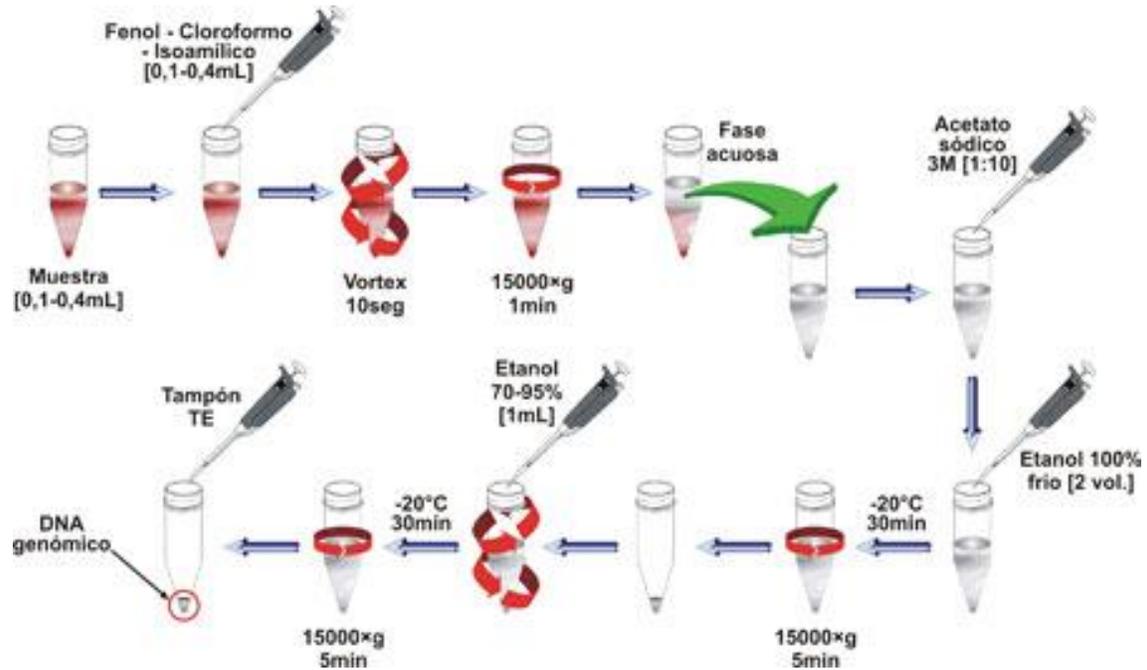


Figura 6. Diagrama de la extracción de DNA de muestras biológicas.<sup>(57)</sup>

### C) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final enzima

#### Amplicasa

- Se preparó Mezcla de reacción, agregando en un tubo Eppendorf de 0.5 mL los siguientes volúmenes por reacción:

Cuadro 2. Concentraciones para la PCR punto final.

<b>Reactivo</b> <b>[Conc. Inic.]</b>	<b>[Conc. final]</b>	<b>Volumen por</b> <b>reacción</b>
Amortiguador 10X	10X	10 µL
MgCl <sub>2</sub> [1.5 mM]	1.5 mM	5 µL
dNTP´s [10 mM]	10 mM	10 µL
Primer Forward [100 µM]	50 pM	4 µL
Primer Reverse [100 µM]	50 pM	3 µL
Amplicasa®		0.5 µL
H2O MiliQ		Cbp 50 µL

\*Al realizar más reacciones se deben hacer de nuevo los cálculos

- Se agregó por cada reacción 2.5 µL de muestra, se mezcló con microcentrífuga, 15 segundos a 3000 rpm y un vortexeo de 5 segundos, 3 ciclos.
- Se colocó en una placa para termociclador los tubos Eppendorf que contenían la mezcla de reacción.
- Se rotularon los tubos Eppendorf según la muestra que se estuviera corriendo.

- Se programó el termociclador bajo las siguientes condiciones:

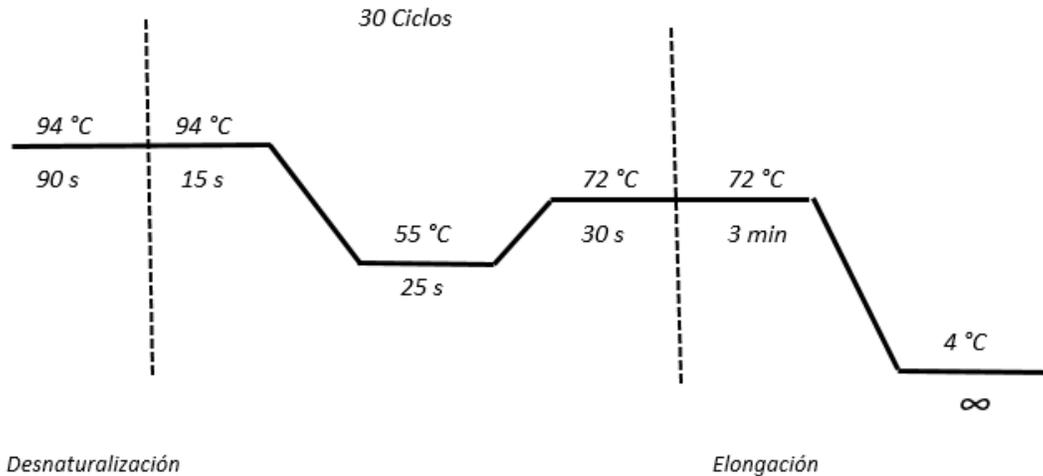


Figura 7. Diagrama de programación del termociclador para la PCR punto final.

- Se utilizaron los siguientes primers que amplifican una región de extremo C-terminal de la proteína NS1:

Cuadro 3. Secuencia de primers utilizados.

Primer	Secuencia	Tm (°C)
<b>Forward</b>	5' CCTACTCATTACAGGACTTTA 3'	54.94
<b>Reverse</b>	5' GCGCGATCAGTGTACATAGA 3'	57.60

\*Tamaño del amplicón: 104 pb.

#### D) Electroforesis

- Se pesaron 0.8 g de agarosa, en un matraz Erlenmeyer, se agregaron 40 mL de amortiguador 1X y se disolvió por calentamiento en horno de microondas por 45 segundos.
- Se trasvaso a otro matraz Erlenmeyer rotulado y se añadieron 5 µL de bromuro de etidio (2 mg/ 100 mL).

- Se vació la agarosa fundida al soporte para gel, se colocó el peine y se dejó solidificar.
- La cámara de electroforesis se llenó con TBE 1X, y se sumergió en la cámara el soporte con el gel.
- Se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  de producto de PCR con 1  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol (reactivo de carga) y se colocó en un pozo del gel. La cámara de electroforesis se tapó y se conectó a la fuente de poder para dejar correr por 45 minutos a 110 volts.
- El gel se observó en el transiluminador.

#### E) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Tiempo Real con SYBR Green de Thermo Scientific®

- Se preparó Mezcla de reacción, agregando en microtubos para PCR de 0.5 mL los siguientes volúmenes por reacción, para un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ :

Cuadro 4. Concentración de los reactivos para la PCR tiempo real con SYBR Green.

<b>Reactivo</b> <b>[Conc. Inic.]</b>	<b>[Conc. final]</b>	<b>Volumen por</b> <b>reacción</b>
Maxima SYBR Green	(2X)	12.5 $\mu\text{L}$
RT-PCR Master Mix (2X)		
Primer Forward [100 $\mu\text{M}$ ]	50 pM	2.4 $\mu\text{L}^*$
Primer Reverse [100 $\mu\text{M}$ ]	50 pM	1.8 $\mu\text{L}^*$
Muestra		2.5 $\mu\text{L}$

Agua libre de nucleasas

Cbp 25  $\mu$ L

*\* Estas cantidades fueron optimizadas conforme a la alineación de los oligos*

- Se agregaron en los microtubos todos los reactivos y al final la muestra con el DNA.
- Se mezcló suavemente y se pasó toda la mezcla con ayuda de una micropipeta a los tube racks de Cepheid®.
- Se metió un control positivo y un control negativo.
- Se programó el termociclador Smart Cycler® bajo las siguientes condiciones:

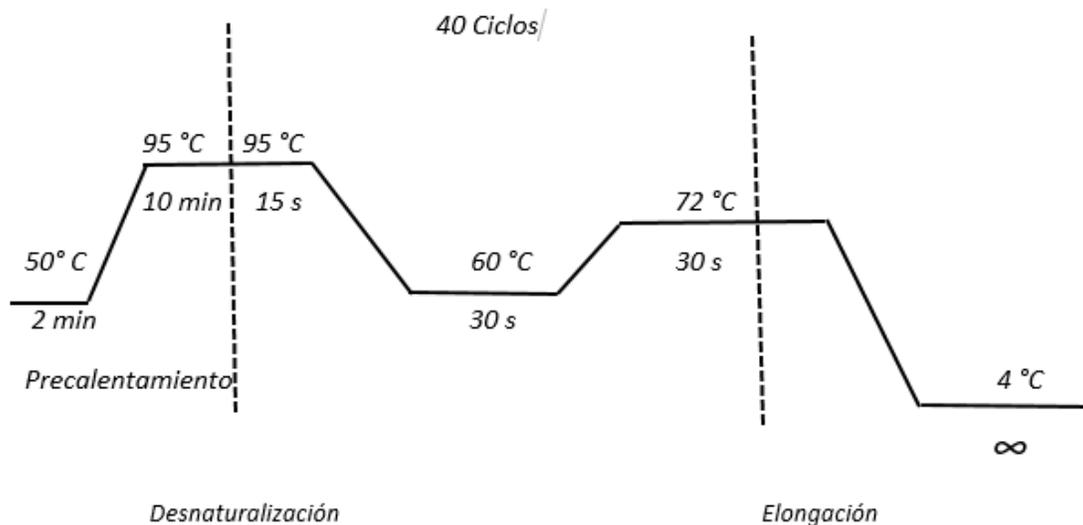


Figura 8. Diagrama con las condiciones con las que se programó el termociclador para la RT-PCR con SYBR Green.

- Se dejó correr el programa hasta que finalizó.
- Se analizó el resultado de las curvas que aparecen en el software Smart Cycler®.

## F) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Tiempo Real con sonda

### TaqMan: Curva de concentración de sonda.

- Se preparó Mezcla de reacción, agregando en microtubos para PCR de 0.5 mL los siguientes volúmenes por reacción, para un volumen final de 25  $\mu$ L:

Cuadro 5. Concentración de reactivos ocupados en la RT-PCR para realizar la curva de concentración de sonda.

<b>Reactivo</b> <b>[Conc. Inic.]</b>	<b>[Conc. final]</b>	<b>Volumen por</b> <b>reacción</b>
TaqMan Universal PCR	(1x)	12.5 $\mu$ L
Master Mix (1X)		
Primer Forward [100 $\mu$ M]	50 pM	2.4 $\mu$ L*
Primer Reverse [100 $\mu$ M]	50 pM	1.8 $\mu$ L*
Muestra		2.5 $\mu$ L
Sonda TaqMan [100 $\mu$ M]	10 $\mu$ M	**
Agua libre de nucleasas		Cbp 25 $\mu$ L

\* Estas cantidades fueron optimizadas conforme a la alineación de los oligos \*\* Se corrió el control positivo con 1, 1.5, 2 y 2.5  $\mu$ L y el control negativo con 2.5  $\mu$ L.

- Se agregaron en los microtubos todos los reactivos y al final la muestra con el DNA. Se mezcló gentilmente y se pasó toda la mezcla con ayuda de una micropipeta a los tube racks de Cepheid®.
- Se metieron 4 controles positivos y un control negativo.

- Se programó el termociclador Smart Cyclor ® bajo las siguientes condiciones:

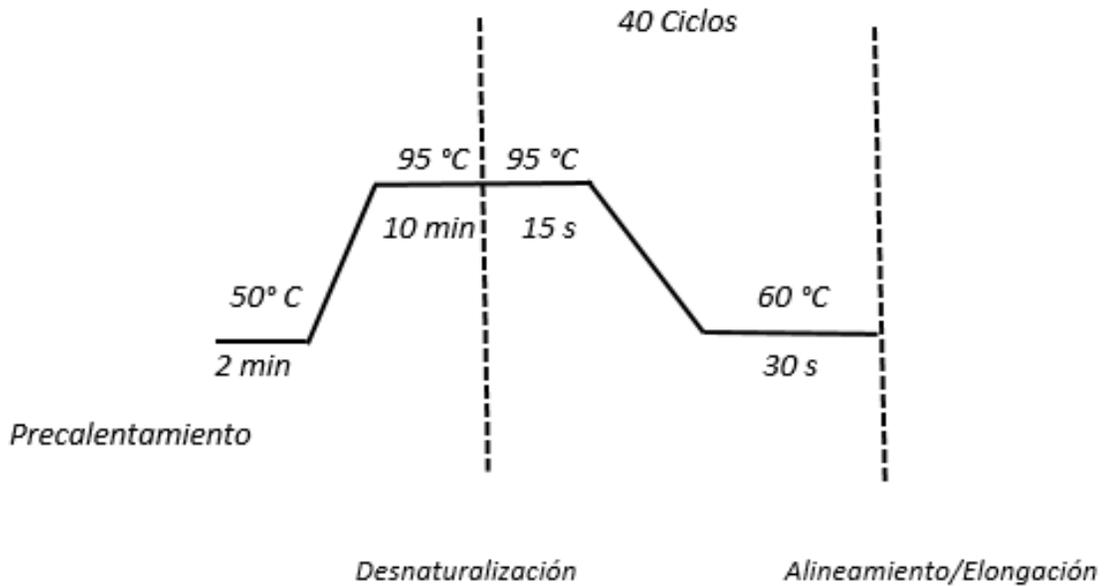


Figura 9. Diagrama con las condiciones del termociclador para la PCR tiempo real con sonda TaqMan. \*Para el correcto funcionamiento de la sonda y el Mix se hace un precalentamiento para no generar un desbalance en la temperatura y evitar que se degraden los dNTP's.

- Se dejó correr el programa hasta que finalizó.
- Se analizó el resultado de las curvas que aparecen en el software Smart Cyclor ®.

### G) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Tiempo Real con sonda

#### TaqMan: Curva de temperatura de alineamiento.

- Se preparó Mezcla de reacción, agregando en microtubos para PCR de 0.5 mL los siguientes volúmenes por reacción, para un volumen final de 25 µL:

Cuadro 6. Concentración de reactivos empleados en la RT-PCR con sonda TaqMan para realizar la curva de temperatura de alineamiento.

<b>Reactivo</b> <b>[Conc. Inic.]</b>	<b>[Conc. final]</b>	<b>Volumen por reacción</b>
TaqMan Universal PCR	(1X)	12.5 µL
Master Mix (1X)		
Primer Forward [100 µM]	50 pM	2.4 µL*
Primer Reverse [100 µM]	50 pM	1.8 µL*
Muestra		2.5 µL
Sonda TaqMan [100 µM]	100 µM	1.5 µL**
Agua libre de nucleasas		Cbp 25 µL

\* Cantidades optimizadas conforme a la alineación de los oligos

\*\* Cantidad optimizada mediante la curva de concentración de sonda.

- Se agregaron en los microtubos todos los reactivos y al final la muestra con el DNA.
- Se mezcló gentilmente y se pasó toda la mezcla con ayuda de una micropipeta a los tube racks de Cepheid®.
- Se metieron 4 controles positivos y un control negativo.

- Se programó el termociclador Smart Cyclor ® bajo las siguientes condiciones:

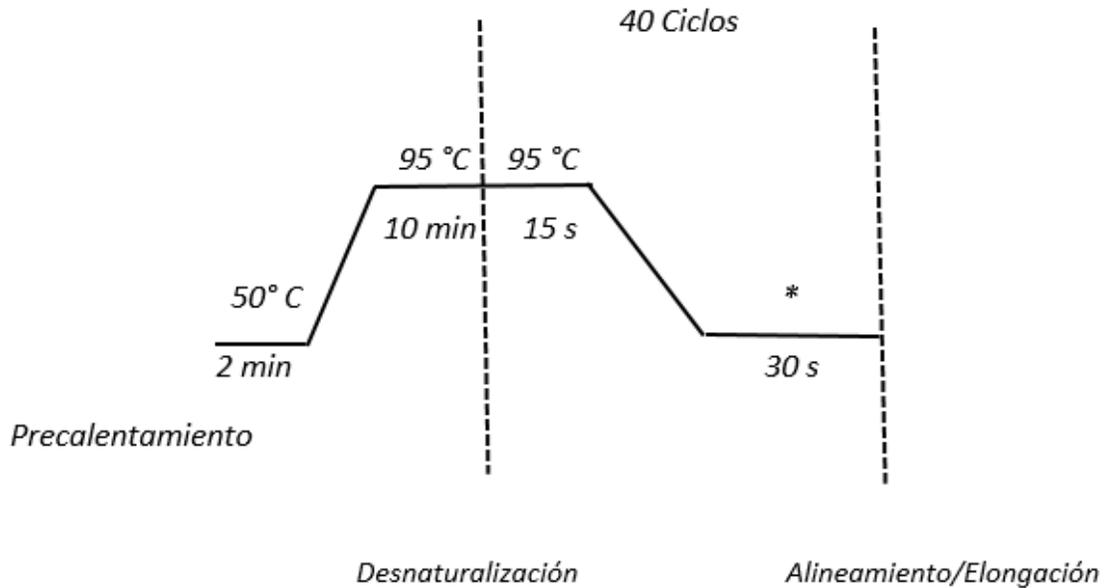


Figura 10. Diagrama de las condiciones del termociclador para la RT-PCR con sonda TaqMan. \* Para hacer la curva de temperaturas se programó el control positivo a 56°C, 58°C, 60°C, 62°C y el control negativo a 60°C.

- Se dejó correr el programa hasta que finalizó.
- Se analizó el resultado de las curvas que aparecen en el software Smart Cyclor ®.

## H) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Tiempo Real con sonda

### TaqMan: Procesamiento de las muestras.

- Se preparó la mezcla de reacción, agregando en microtubos para PCR de 0.5 mL los siguientes volúmenes por reacción, para un volumen final de 25 µL:

Cuadro 7. Concentración de reactivos utilizados para la procesar las muestras por RT-PCR con Sonda TaqMan.

<b>Reactivo</b> <b>[Conc. Inic.]</b>	<b>[Conc. final]</b>	<b>Volumen por</b> <b>reacción</b>
TaqMan Universal PCR	(1X)	12.5 µL
Master Mix (1X)		
Primer Forward [100 µM]	50 pM	2.4 µL*
Primer Reverse [100 µM]	50 pM	1.8 µL*
Muestra		2.5 µL
Sonda TaqMan [100 µM]	100 µM	1.5 µL
Agua libre de nucleasas		Cbp 25 µL

\* Cantidades optimizadas conforme a la alineación de los oligos

\*\* Cantidad optimizada con la curva de concentración de sonda.

- Se agregaron en los microtubos todos los reactivos y al final la muestra con el DNA.
- Se mezcló gentilmente y se pasó toda la mezcla con ayuda de una micropipeta a los tube racks de Cepheid®.
- Se proceso un control positivo, que contenía la mezcla de reacción y DNA positivo para HBoV y dos controles negativos, uno contenía la mezcla de reacción con agua en lugar de DNA y el otro contenía la mezcla de reacción con DNA negativo para HBoV.
- Se programó el termociclador Smart Cycler® bajo las siguientes condiciones:

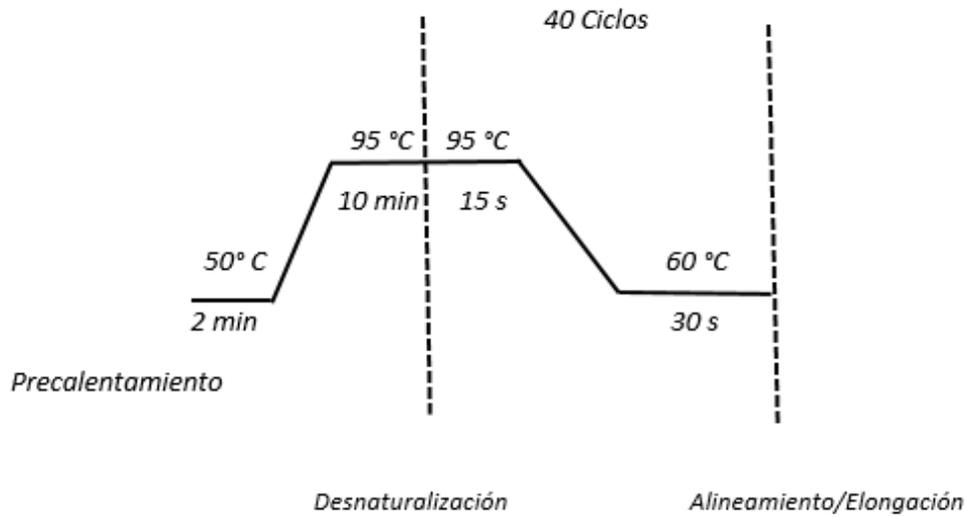


Figura 11. Diagrama de las condiciones del termociclador con las que se corrieron las muestras por PCR tiempo real con sonda TaqMan.

- Se dejó correr el programa hasta que finalizó.
- Se analizó el resultado de las curvas que aparecen en el software Smart Cycler®.

La sonda y los oligos que se utilizaron en cada RT-PCR fueron los siguientes:

Cuadro 8. Secuencia de los primers y la sonda ocupados para procesar las muestras.

Primer	Secuencia	Tm (°C)
<b>Forward</b>	5' CCTACTCATTACAGGACTTTA 3'	55
<b>Reverse</b>	5' GCGCGATCAGTGTACATAGA 3'	58
<b>Sonda</b>	5' FAMCGGATACTGCACTGATTGCGGTGGTTAMRA 3'	63

\* El Amplicón que se forma con estos oligos es de 104 pb y va del par 2029 al 2132 que corresponden a la región del genoma que codifica para la proteína NS1.



Figura 12. Diagrama donde se señala la región que ocupa el amplicón con respecto a la secuencia completa de la proteína NS1.

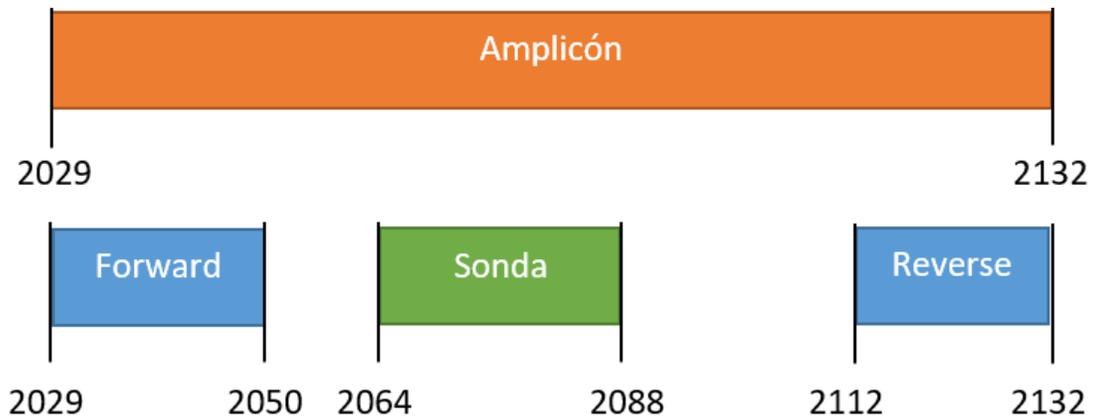


Figura 13. Diagrama que señala la región donde se unen los oligos y la sonda en el fragmento de DNA blanco.

### I) Carga Viral con Kit para HBoV de MyBioSource®

- Se siguieron las especificaciones del fabricante (ver anexo 1).

### J) Carga Viral con el método desarrollado

- Se cuantificó el control positivo con ayuda del Kit para HBoV de MyBioSource®
- Conocida su carga viral, se hicieron diluciones 1:2 del control positivo, con agua grado PCR.

- Se corrieron las diluciones con la mezcla de reacción que se ocupó para procesar las muestras, ocupando el mismo protocolo en el termociclador para tiempo real.
- Se dejó correr el programa SmartCycler®, y se obtuvieron los CT de cada dilución.
- Posteriormente se graficó la concentración contra el CT para obtener la ecuación de la recta y poder extrapolar los CT obtenidos de las muestras, para determinar su carga viral.

## VIII. Resultados

Se exponen los resultados conforme se realizó el experimento, se muestran primero los resultados que se obtuvieron para la optimización del método, se evaluaron los primers para identificar si amplificaban mediante la técnica de PCR, posteriormente se evaluó la funcionalidad de la sonda mediante la RT-PCR para lo que se fueron adecuando las cantidades de las variables para la mezcla de reacción final con la que se procesarían las 350 muestras.

Una vez procesadas las muestras, se evaluaron aquellas que resultaron positivas, tanto la carga viral como una revisión clínica de los pacientes a los que pertenecen las muestras y de esta manera correlacionar los datos para determinar la frecuencia de infección y otros datos relevantes a considerar del HBoV.

## RT-PCR con SYBR Green

Se corrió una muestra positiva con SYBR Green.

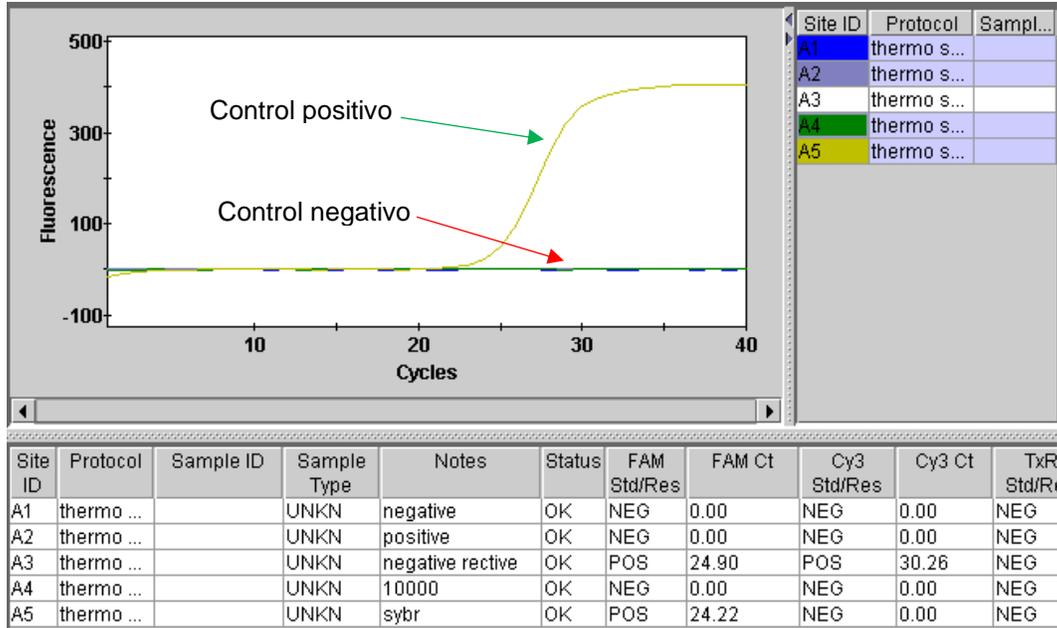


Figura 14. Grafica obtenida del Programa SmartCycler, donde se observa la amplificación del control positivo, mediante la detección de fluerescencia con un Ct de 24.22 y los controles negativos sin señal de fluorescencia.

La figura 14 muestra la curva del control positivo con un CT de 24.22, además se muestran las curvas de Melting, a una sola temperatura de fusión, lo que nos indica que se obtuvo un solo amplicón y que no había formación de dímeros de primer o alguna otra interferencia que se pudiera registrar y se confundiera con el amplicón pues como se sabe, el Sybr Green es un intercalante del DNA y no es específico. Con esto se comprobó que la mezcla de reacción estaba amplificando bien la muestra y se procedió a utilizar la sonda.

### Curva de concentración de sonda TaqMan por RT-PCR

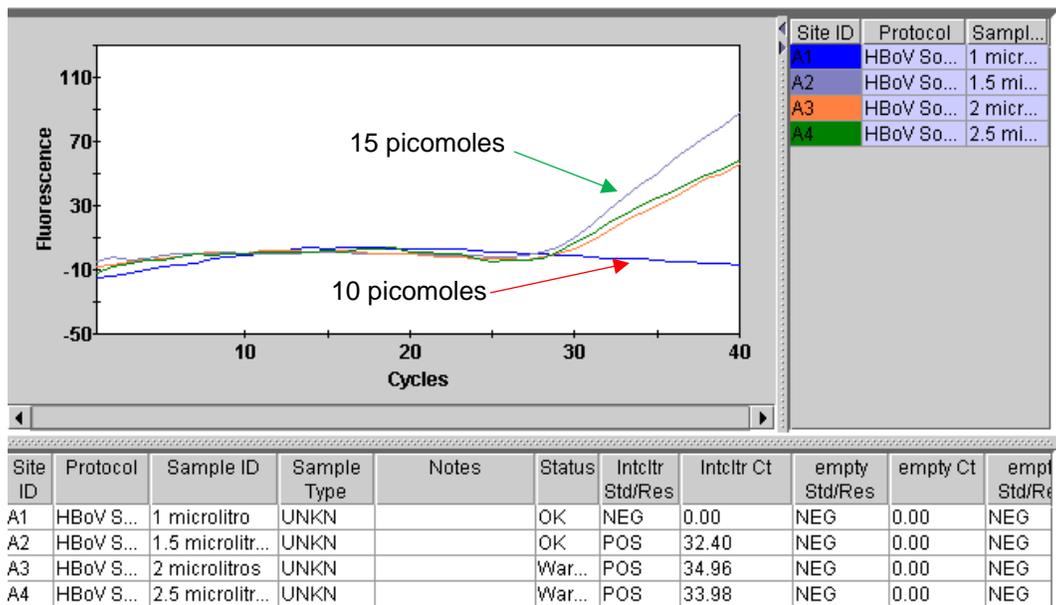


Figura 15. Gráfica obtenida del programa SmartCycler donde se observa que la misma muestra se corrió bajo las mismas condiciones y variando la concentración de sonda.

Para la curva de concentración de sonda se utilizaron volúmenes de 1, 1.5, 2 y 2.5  $\mu\text{L}$  de la sonda Taqman que se encontraba en concentraciones de 10 picomol por  $\mu\text{L}$  de sonda.

En la literatura se recomienda que para la utilización de sondas TaqMan se agregue en concentraciones desde 10 hasta 30 picomoles, por lo que la curva se hizo utilizando concentraciones de 10, 15, 20 y 25 picomoles. La figura 15, muestra que en la primer muestra de 10 picomoles, no se tuvo amplificación, esto sugiere que en esa concentración de sonda no es suficiente para que la detecte el equipo por lo que nos daría resultados erróneos en caso de correr las muestras con esa concentración de sonda. Las otras 3 concentraciones amplificaron la muestra, pero, la reacción con 15 picomoles fue la que obtuvo el CT menor, lo que nos quiere decir que esa es la cantidad en la que el equipo detecta el amplicón en el menor número

de ciclos posible, permitiendo ampliar el rango de detección y de esta manera el equipo detectará concentraciones menores.

### Curva de temperatura de alineamiento con sonda TaqMan por RT-PCR

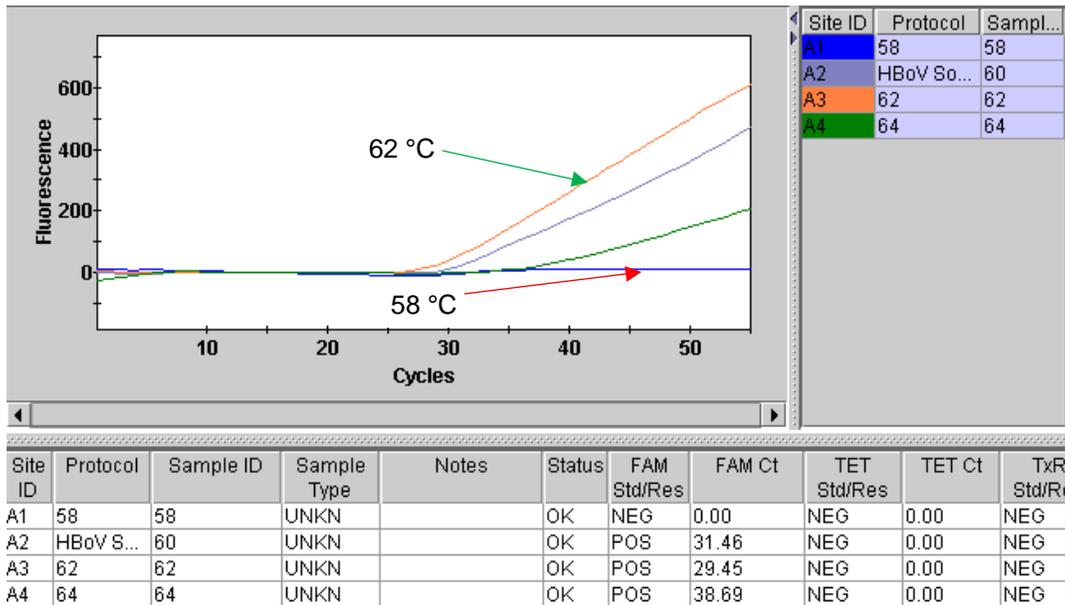


Figura 16. Gráfica obtenida del programa SmartCycler donde la misma muestra se corrió con diferentes temperaturas de alineamiento.

Para la curva de temperatura se utilizó el mismo protocolo variando la temperatura de alineamiento, usando 58°C, 60°C, 62°C y 64°C como temperaturas.

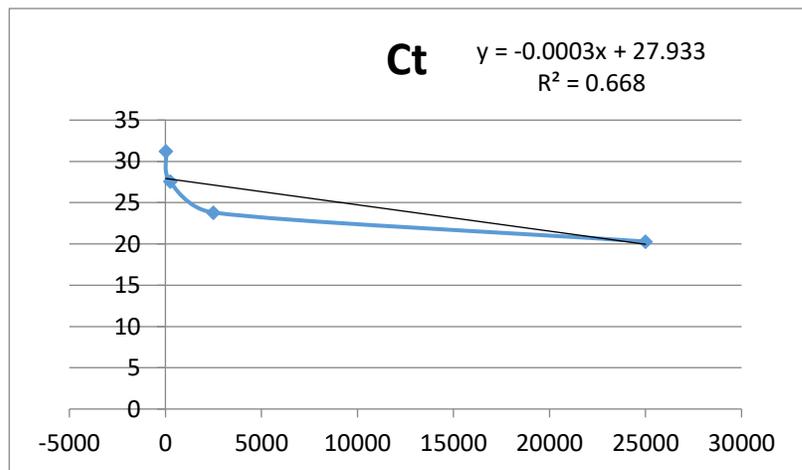
Para hacer la curva se eligieron las temperaturas de alineamiento de 58°C, 60°C, 62°C y 64°C debido a que la temperatura de alineamiento de los primers está cercana a 58°C y la de la sonda es de 64°C, y para determinar cuál daba la lectura óptima se corrió el mismo control positivo con la misma mezcla de reacción y el protocolo fue el mismo solo se varió la temperatura de alineamiento. La figura 16, muestra que a 58°C no se registró amplificación de la muestra, la probable explicación es que en las instrucciones de uso del Universal PCR Master Mix® se menciona que la temperatura óptima de trabajo para la enzima se localiza entre 60

y 62°C, lo que también se confirma con la lectura que dio a 64°C pues aunque si registró la amplificación de la muestra su CT es elevado con relación a la registrada a 60 y 62°C. La temperatura que mejor lectura registró fue a 62°C ya que dio un CT de 29.45, que es más bajo con respecto al Ct de 31.46 que se registró a 60°C, por lo que se determina que la temperatura de alineamiento óptima de trabajo de la enzima es a 62°C.

### Curva estándar del Kit para cuantificación de Bocavirus

Se utilizó el kit comercial para HBoV de MyBioSource ®

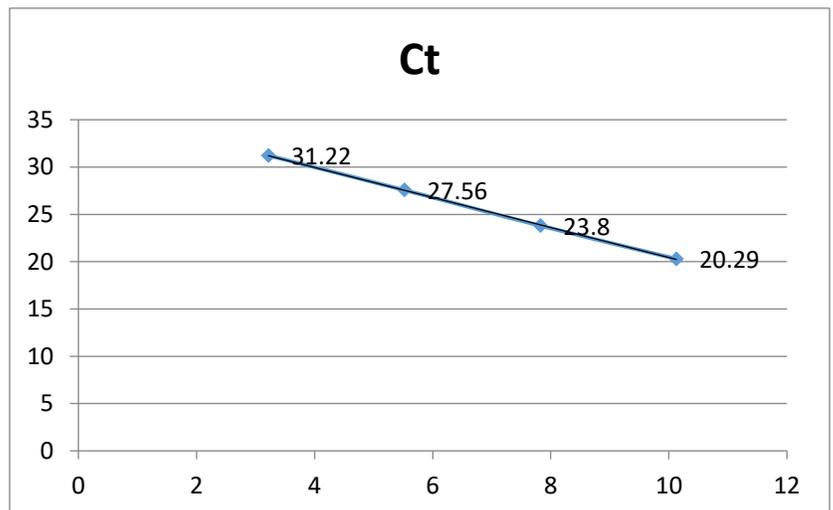
Concentración (copias totales)	Ct
25000	20.29
2500	23.80
250	27.56
25	31.22



Se pasaron los datos de concentración a logaritmo natural para poder linealizar la gráfica y obtener la ecuación de ésta.

Linealización

Ln(Concentración)	Ct
10.12	20.29
7.82	23.80
5.52	27.56
3.21	31.22



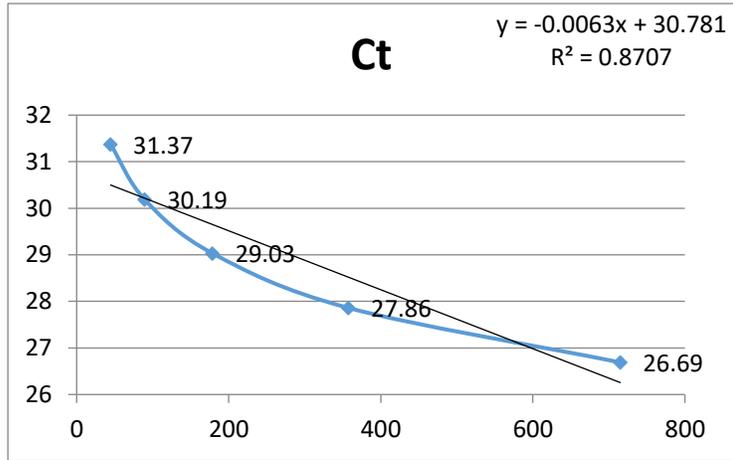
$$y = -1.5873x + 36.309$$

$$R^2 = 0.9998$$

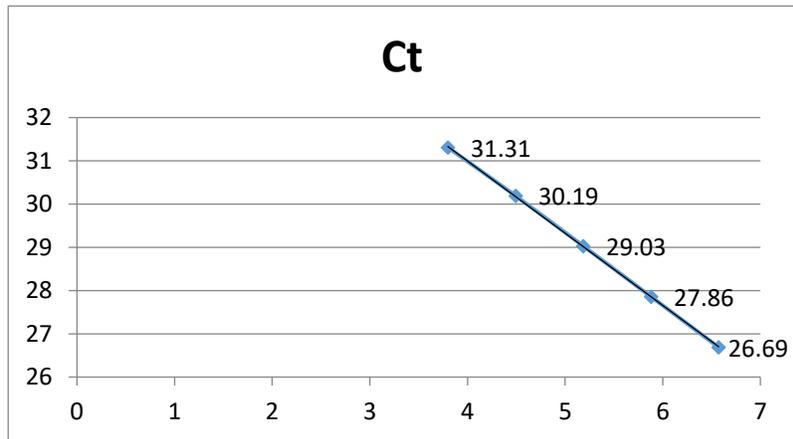
Para realizar esta curva se siguieron las especificaciones del fabricante MyBioSource® y se obtuvieron diferentes CT dependiendo la concentración del control cuantificado que incluía el kit, con esto se construyó la gráfica, la cual, presentó un comportamiento exponencial y al sacar la ecuación y su línea de tendencia, el valor de  $R^2$  era muy bajo, apenas de 0.6680 lo que indica que la ecuación obtenida no nos proporcionaría datos exactos al momento de extrapolar los valores de CT. Se procedió a linealizar la gráfica, esto se hizo aplicando logaritmo natural a los valores de la concentración, para poder reducir la escala y mantener los puntos más cercanos, de esta manera se obtuvo una gráfica con un comportamiento lineal y con valor de  $R^2$  de 0.9998, lo que nos indica que la ecuación obtenida, dará datos más exactos al extrapolar los CT obtenidos en las muestras. La ecuación de la curva obtenida con el Kit comercial es:  $y = -1.5873x + 36.309$ , la cual al sustituir “Y” por un valor de CT, el resultado que nos dé será el logaritmo natural de la concentración al cual se le aplicara el inverso de logaritmo natural para poder tener la concentración real de la muestra. En este caso el control positivo se metió bajo las mismas condiciones que el control cuantificado del kit que ocupamos para procesar las muestras con el método diseñado, dando un CT de 25.88 y al extrapolarlo en la gráfica dio una concentración de 714.9 copias.

**Curva estándar del método diseñado para cuantificación de Bocavirus**

Concentración (copias totales)	Ct
714.9	26.69
357.45	27.86
178.73	29.03
89.36	30.19
44.68	31.37



LN(Conc)	Ct
6.57	26.69
5.87	27.86
5.18	29.03
4.49	30.19
3.79	31.31



$y = -1.6692x + 37.672$   
 $R^2 = 0.9999$

Una vez conocida la concentración del control positivo, se realizaron diluciones seriadas 1:2 de éste, las concentraciones para la curva quedaron de 714.9, 357.45, 178.73, 89.36, y 44.68 copias. Las diluciones del control positivo se procesaron bajo las mismas condiciones que las muestras, utilizando la sonda TaqMan y con los CT

obtenidos se construyó la gráfica, que mostró un comportamiento exponencial, con una  $R^2$  de 0.8707, lo cual es un valor aceptable ya que la literatura menciona que los valores superiores a 0.85 para el coeficiente de determinación, proporcionan datos precisos del comportamiento de un modelo y se pudiera extrapolar los datos de CT de las muestras para determinar su concentración, sin embargo, la ecuación que obtuvimos de la gráfica nos presenta una ordenada al origen de 30.78, lo que sugiere que para valores de CT superiores, la concentración dará un valor negativo, por lo que de esta manera no se podrían determinar las concentraciones más bajas, y dado que más de 6 muestras procesadas dieron un CT mayor a 30, se optó por linealizar la gráfica, de la misma manera que se hizo con la curva del kit, aplicando logaritmo natural a las concentraciones para reducir la escala, de esta manera la gráfica adquirió un comportamiento lineal, con un coeficiente de determinación de 0.9999 y con la ecuación:  $y = -1.6692x + 37.672$ . De esta manera, mejoramos el valor de  $R^2$  lo que nos indica que la ecuación obtenida es precisa, para explicar el comportamiento de nuestro modelo, además en la ecuación obtenida la ordenada al origen es de 37.67, lo que amplía el rango de detección de la concentración.

### **Muestras procesadas**

Una vez obtenida la curva del método diseñado, se procesaron las muestras bajo las mismas condiciones que el control positivo con el que se construyó la curva estándar.

Cuadro 9. Carga viral de las muestras que resultaron positivas, acomodadas por año.

AÑO	FOLIO MUESTRA	CT	CARGA VIRAL (COPIAS/ ML DE MUESTRA)
2009	1075	37.72	$9.71 \times 10^1$
	1197	31.17	$4.91 \times 10^3$
	1384	25.34	$1.61 \times 10^5$
	245	21.34	$1.77 \times 10^6$
	676	35.44	$3.80 \times 10^2$
	708	34.98	$5.01 \times 10^2$
	737	31.99	$3.00 \times 10^3$
	770	33.65	$1.11 \times 10^3$
	994	33.72	$1.06 \times 10^3$
2010	1030	31.3	$4.54 \times 10^3$
	1043	29.43	$1.39 \times 10^4$
	153	22.33	$9.81 \times 10^5$
	299	36.9	$1.58 \times 10^2$
	441	30.72	$6.43 \times 10^3$
	87	16.9	$2.53 \times 10^7$
	975	34.96	$5.07 \times 10^2$
	978	26.46	$8.26 \times 10^4$

Se procesaron 350 muestras que previamente se habían corrido en PCR punto final y resultaron probables positivas. Ya que este es un método cualitativo, las muestras se tenían que confirmar con un método cuantitativo, más preciso y específico como lo es la RT-PCR con sonda Taqman, se obtuvieron 17 muestras positivas, esto corresponde al 4.86% de las muestras procesadas.

### Carga viral

Una vez que se procesaron las muestras y se obtuvieron los CT, estos se extrapolaron mediante la ecuación de la curva estándar, de manera que el valor de

CT se sustituía por Y en la fórmula y se despejó X, dando como resultado el logaritmo natural de la concentración de las muestras. Un ejemplo de los cálculos que se hicieron es, en la muestra con el folio 245-2009, el CT obtenido fue de 21.34, al sustituirlo en la fórmula queda de la siguiente manera:

$$21.34 = -1.6692x + 37.672$$

Despejando X: 
$$x = \frac{21.34 - 37.672}{-1.6692}$$

Lo que nos da como resultado:  $X = 9.7843$

Este resultado corresponde al logaritmo natural de la concentración, por lo que, para obtener la concentración en número de copias, se aplica el inverso del logaritmo natural:

$$e^X = e^{9.7843}$$

Obteniendo como resultado: 17752.8261 copias de DNA en la muestra, para determinar la carga viral que está dada por copias/mL de muestra se hicieron los siguientes cálculos:

Considerando que a cada reacción se le agregaron 2.5  $\mu$ L de la muestra de DNA la cantidad de copias obtenida corresponde solo a esos 2.5  $\mu$ L, cada muestra estaba resuspendida en 50  $\mu$ L, por lo que si en 2.5  $\mu$ L había 17752.8261 copias, entonces en 50  $\mu$ L, se tenían 355066.401 copias. Esta cantidad es el número de copias totales obtenidas en la muestra, la literatura señala que en un exudado nasofaríngeo

se obtienen alrededor de 200  $\mu\text{L}$  de muestra. Si se considera que el número total de copias corresponden a 200  $\mu\text{L}$  del exudado, para obtener el número de copias por mL de muestra, se hizo una operación con la regla de proporción y se obtuvo que la muestra con folio 245-2009 tiene una cantidad de  $1.77 \times 10^6$  copias / mL de muestra. Estas operaciones se realizaron a las cantidades que se obtuvieron de cada muestra positiva.

Con esto se construyó un gráfico de barras donde se visualizaron las cargas virales de cada muestra, en la cual, la de mayor carga viral, tiene  $2.53 \times 10^7$  copias / mL de muestra y la de menor carga viral, fue de 9.71 copias / mL de muestra.

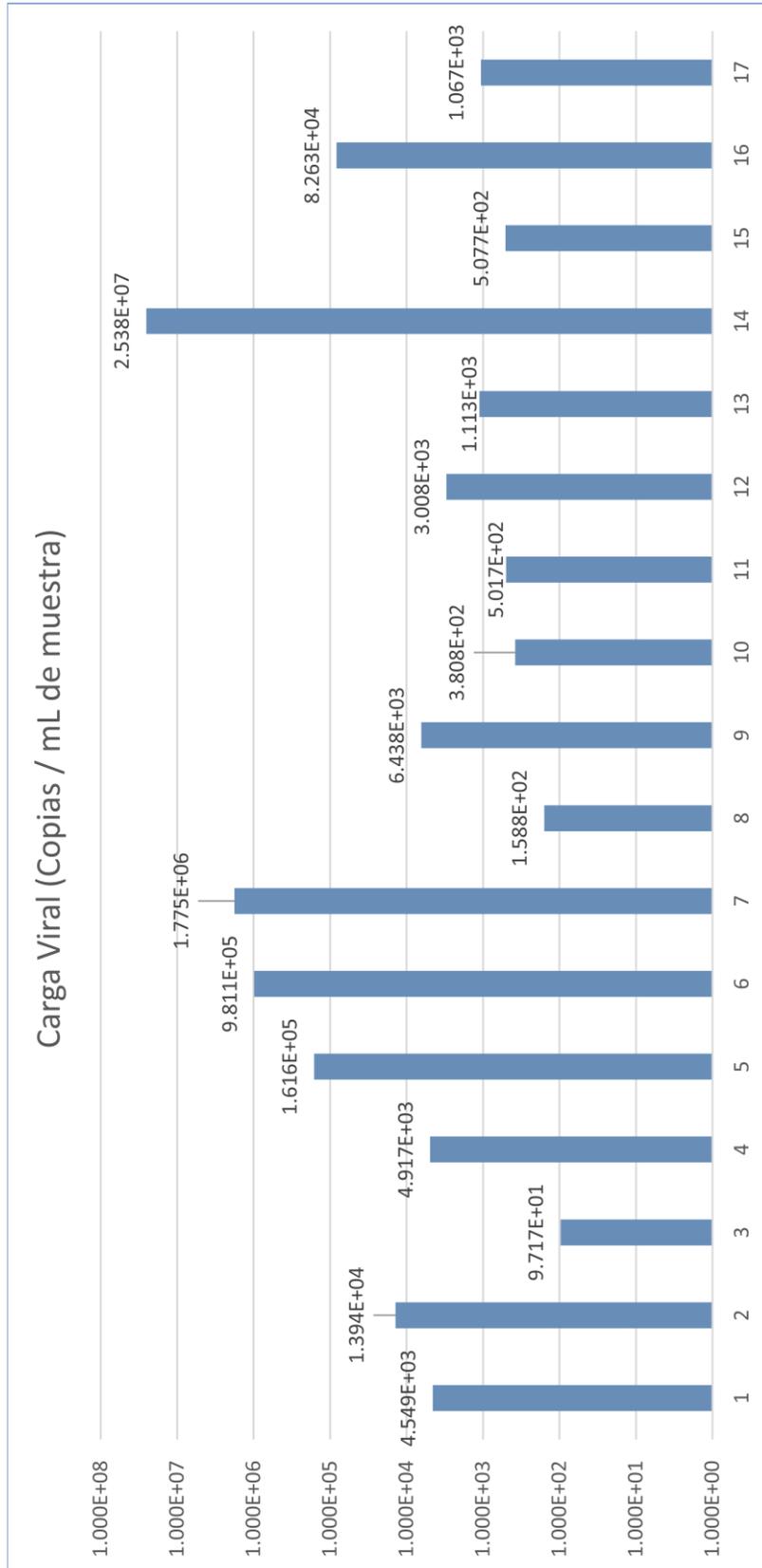


Figura 17. Gráfica de barras con las cargas virales de las muestras positivas.

### Cuadro de datos

Cuadro 10. Datos clínicos de los pacientes cuyas muestras resultaron positivas.

Muestra	Sexo*	Edad (meses)	Estacionalidad	Situación clínica**	Coinfecciones	Carga viral (copias / mL de muestra)	Rango de edad (Años)	Rango de Carga Viral (copias / mL de muestra)
1	M	17	Verano	H	Chlam	4.55x10 <sup>3</sup>	0 a 2	1001-10000
2	M	24	Verano	A	VSR	1.39 x10 <sup>4</sup>	0 a 2	10001-100000
3	M	76	Otoño	H	Flu A	9.70 x10 <sup>1</sup>	más de 4	≤100
4	M	23	Otoño	H	PI 3	4.92 x10 <sup>3</sup>	0 a 2	1001-10000
5	M	24	Otoño	H	VSR	1.62 x10 <sup>5</sup>	0 a 2	>100000
6	M	5	Invierno	H	VSR	9.81 x10 <sup>5</sup>	0 a 2	>100000
7	M	3	Invierno	H	PI 2	1.78 x10 <sup>6</sup>	0 a 2	>100000
8	M	9	Invierno	H	Ning	1.59 x10 <sup>2</sup>	0 a 2	101-1000
9	M	11	Primavera	H	VSR	6.44 x10 <sup>3</sup>	0 a 2	1001-10000
10	M	22	Primavera	H	PI 2	3.81 x10 <sup>2</sup>	0 a 2	101-1000
11	M	0.5	Primavera	H	PI 2	5.02 x10 <sup>2</sup>	0 a 2	101-1000
12	F	17	Primavera	A	Ning	3.01 x10 <sup>3</sup>	0 a 2	1001-10000
13	F	0.5	Verano	H	PI 2	1.11 x10 <sup>3</sup>	0 a 2	1001-10000
14	M	8	Invierno	H	VSR	2.54 x10 <sup>7</sup>	0 a 2	>100000
15	M	60	Otoño	H	Ning	5.08 x10 <sup>2</sup>	más de 4	101-1000
16	F	24	Otoño	A	Ning	8.26 x10 <sup>4</sup>	0 a 2	10001-100000
17	M	12	Otoño	H	Flu A	1.07 x10 <sup>3</sup>	0 a 2	1001-10000

\* M: masculino, F: femenino; \*\* H: hospitalizado, A: ambulatorio.

El cuadro 10 muestra datos de los pacientes cuyas muestras resultaron positivas, tales como: edad, sexo, estacionalidad, situación clínica y coinfecciones para esto se utilizó el programa IBM® SPSS® Statistics versión 24 con el cual se hicieron varios análisis estadísticos, en primera instancia se le realizó una prueba de T de Student a los valores de la carga viral, obteniendo una media de  $1.671 \times 10^6$  y una desviación estándar  $6.127 \times 10^5$ , con un valor de t de 1.125 y con una significancia de 0.277, lo cual no nos permite rechazar la hipótesis nula y esto nos dice que la carga viral obtenida de las muestras positivas no fue significativa para explicar un comportamiento dentro de la población, lo cual nos indica que la diferencia de carga viral puede estar relacionada a otras variables, por lo que se recodificaron las variables de la edad y la carga viral en grupos como datos nominales para poder realizar estadísticos descriptivos mediante el uso de tablas cruzadas donde las variables se correlacionaron con el rango de carga viral, con esto se determinó si existía relación entre la carga viral y las otras variables obtenidas.

Para determinar la relación entre variables se realizó una prueba de Chi cuadrada, donde la hipótesis nula indica que no existe relación entre las variables y se descarta si el valor de  $p \leq 0.05$ .

Cuadro 11. Correlación entre el sexo y el rango de carga viral

		Sexo		Total	
		Masculino	Femenino		
Rango de Carga	≤100 copias/mL	Recuento	1	0	1
		% del total	5.9%	0.0%	5.9%
	101-1000 copias/mL	Recuento	4	0	4
		% del total	23.5%	0.0%	23.5%
	1001-10000 copias/mL	Recuento	4	2	6
		% del total	23.5%	11.8%	35.3%
	10001-100000 copias/mL	Recuento	1	1	2
		% del total	5.9%	5.9%	11.8%
	>100000 copias/mL	Recuento	4	0	4
		% del total	23.5%	0.0%	23.5%
	Total	Recuento	14*	3	17
		% del total	82.4%	17.6%	100.0%

$\chi^2$ ,  $p=0.356$ .

*T de student*,  $p < 0.05$ .

La prueba de chi cuadrada que se muestra en el cuadro 11, permite afirmar que no existe relación, ya que no se descartó la hipótesis nula; sin embargo, se observa que en la mayoría de los casos, los pacientes corresponden al sexo masculino, al realizar una prueba de T de Student, se determinó que  $p < 0.05$ , por lo que este dato es estadísticamente significativo y podemos afirmar que una infección por Bocavirus está relacionada con el sexo, más no determina su carga viral.

Cuadro 12. Estacionalidad de los pacientes frente a el rango de carga viral.

		Estacionalidad				Total	
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno		
Rango de Carga	≤100 copias/mL	Recuento	0	0	1	0	1
		% del total	0.0%	0.0%	5.9%	0.0%	5.9%
	101-1000 copias/mL	Recuento	2	0	1	1	4
		% del total	11.8%	0.0%	5.9%	5.9%	23.5%
	1001-10000 copias/mL	Recuento	2	2	2	0	6
		% del total	11.8%	11.8%	11.8%	0.0%	35.3%
	10001-100000 copias/mL	Recuento	0	1	1	0	2
		% del total	0.0%	5.9%	5.9%	0.0%	11.8%
	>100000 copias/mL	Recuento	0	0	1	3	4
		% del total	0.0%	0.0%	5.9%	17.6%	23.5%
	Total	Recuento	4	3	6	4	17
		% del total	23.5%	17.6%	35.3%	23.5%	100.0%

$\chi^2, p=0.248$

El valor de la significancia en la prueba de Chi cuadrada del cuadro 12, es superior a 0.05 por lo que se considera que la estacionalidad de los pacientes y su carga viral no está relacionada.

Cuadro 13. Correlación ente la situación Clínica y el rango de Carga viral.

		Situación		Total	
		Ambulatorio	Hospitalizado		
Rango de Carga	≤100 copias/mL	Recuento	0	1	1
		% del total	0.0%	5.9%	5.9%
	101-1000 copias/mL	Recuento	0	4	4
		% del total	0.0%	23.5%	23.5%
	1001-10000 copias/mL	Recuento	1	5	6
		% del total	5.9%	29.4%	35.3%
	10001-100000 copias/mL	Recuento	2	0	2
		% del total	11.8%	0.0%	11.8%
	>100000 copias/mL	Recuento	0	4	4
		% del total	0.0%	23.5%	23.5%
	Total	Recuento	3	14*	17
		% del total	17.6%	82.4%	100.0%

$\chi^2, p=0.024$ .

El cuadro 13 muestra que, existe correlación entre la situación clínica de los pacientes y la carga viral que presentan, ya que  $p < 0.05$  y nos permite descartar la hipótesis nula, de esta manera podemos atribuir que los pacientes que se encuentran hospitalizados son los que mayor riesgo de infección presentan y a su vez los que mayor carga viral registran.

Cuadro 14. Correlación entre el rango de edad y el rango de carga viral.

		Rango de edad		Total	
		0 a 2 años	más de 4 años		
Rango de Carga	≤100 copias/mL	Recuento	0	1	
		% del total	0.0%	5.9%	
	101-1000 copias/mL	Recuento	3	1	4
		% del total	17.6%	5.9%	23.5%
	1001-10000 copias/mL	Recuento	6	0	6
		% del total	35.3%	0.0%	35.3%
	10001-100000 copias/mL	Recuento	2	0	2
		% del total	11.8%	0.0%	11.8%
	>100000 copias/mL	Recuento	4	0	4
		% del total	23.5%	0.0%	23.5%
Total	Recuento	15*	2	17	
	% del total	88.2%	11.8%	100.0%	

$\chi^2$ ,  $p=0.044$ .

T de student,  $p < 0.05$

Se comprobó mediante un análisis estadístico de correlación en el cuadro 14, que el rango de carga viral está relacionado con el rango de edad de los pacientes, en este caso, los pacientes de entre 0-2 años son los que presentan el nivel de carga viral más alto y a su vez son los que mayor riesgo de infección presentan, esto se comprobó mediante una prueba de T de Student utilizando la edad de los pacientes (en meses), obteniendo una media de 19.765 con una desviación estándar de 20.1534 con un valor de t de 4.044 y un valor de significancia de  $p= 0.001$ . de esta

manera se afirma que la edad es un factor predisponente a una infección por HBoV y una alta carga viral.

Cuadro 15. Correlación entre coinfección y el rango de carga viral.

		Coinfección		Total	
		No	Si		
Rango de Carga	≤100 copias/mL	Recuento	0	1	1
		% del total	0.0%	5.9%	5.9%
	101-1000 copias/mL	Recuento	2	2	4
		% del total	11.8%	11.8%	23.5%
	1001-10000 copias/mL	Recuento	1	5	6
		% del total	5.9%	29.4%	35.3%
	10001-100000 copias/mL	Recuento	1	1	2
		% del total	5.9%	5.9%	11.8%
	>100000 copias/mL	Recuento	0	4	4
		% del total	0.0%	23.5%	23.5%
	Total	Recuento	4	13	17
		% del total	23.5%	76.5%	100.0%

$\chi^2$ ,  $p=0.402$ .

La prueba de Chi cuadrada realizada en el cuadro 15, determinó que la coinfección no es un factor determinante en el rango de carga viral, ya que tuvo un valor de  $p < 0.05$ , de esta manera se descarta que el rango de carga viral sea dependiente de un estado de coinfección, sin embargo, se observó que las coinfecciones están presentes en el mayor número de casos (76.5%), lo que nos permite afirmar que la infección por HBoV está relacionada principalmente a coinfecciones sin embargo esto no determina su carga viral.

## IX. Discusión

### **Amplificación de muestras**

Los oligos utilizados en el proyecto que fueron diseñados en el laboratorio de virología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, amplifican la región C-terminal de la proteína NS1, debido a que es una región altamente conservada, las secuencias utilizadas no se encuentran registradas en la literatura, sin embargo, la mayoría de los artículos donde se realiza RT-PCR para identificar HBoV 1, utilizan oligos que tienen la región de la proteína NS1 como blanco. Ligozzi M. y colaboradores <sup>(58)</sup>, Diseñaron 2 pares de oligos que amplifican regiones diferentes de la proteína NS1 (N-terminal y C-terminal), en ese experimento, se demostró que, el par de oligos que amplifican la región C-terminal, puede identificar muestras de HBoV 1,2,3 y 4, mientras que el par de oligos de la región N-terminal solo amplifica muestras de HBoV 2, de esta manera demostraron que aunque la proteína NS1 es altamente conservada, la región C-terminal es la más conservada de todas, debido a que se encuentra a un lado de región que amplifica la proteína NP1, caso contrario a la región N-terminal que se localiza, en el extremo de la cadena de DNA. De esta manera podemos afirmar que los oligos utilizados, podrían usarse como prueba de rutina de identificación de HBoV.

### **Optimización de la RT-PCR**

Debido a que en la literatura no había registro de experimentos realizados con los oligos y la sonda utilizados, se tuvieron que optimizar las condiciones de la reacción de RT-PCR, lo cual se logró modificando las variables de: concentración de sonda

y temperatura de alineamiento. Dos puntos críticos en la amplificación e identificación del HBoV 1, la concentración de sonda que mejores resultados dio fue de 15  $\mu$ M y la temperatura de alineamiento óptima fue de 62 °C, de esta manera se establecen las condiciones de reacción de RT-PCR para identificación de HBoV 1, con los oligos y la sonda diseñados en el laboratorio de virología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

### **Frecuencia de infección y coinfección de HBoV 1**

Se procesaron las 350 muestras de DNA extraído de exudados nasofaríngeos que se encontraban disponibles en el laboratorio de virología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, las cuales fueron tomadas entre los años 2009-2010 a niños menores de 9 años y se obtuvieron que 17 de estas muestras fueron positivas para HBoV, dando así una frecuencia de 4.86%. En el año de 2015, Díaz y col. <sup>(58)</sup>, determinaron mediante un screening viral que: de 162 muestras procesadas, 8 resultaron positivas para Bocavirus, obteniendo así una frecuencia de 4.9%. Según un estudio realizado por Guido y colaboradores, se estimó que, la frecuencia de infección a nivel mundial es de 4.59%, según lo publicado en Medline desde el 6 de septiembre de 2005 (el año del descubrimiento de HBoV) hasta el 15 de marzo de 2016. De esta manera podemos afirmar que los resultados obtenidos se asemejan a lo reportado en la literatura. Hablando del porcentaje de coinfección, se obtuvo que de 17 muestras positivas, 12 fueron positivas para otros patógenos, lo que nos da un 3.08% de coinfección mientras que el reportado en el estudio de Díaz y col. menciona que la coinfección encontrada es del 1.85%, frente al 2.4% reportado a

nivel mundial, de esta manera podemos ver que el virus se encuentra en mayor medida relacionado a otros virus.

### **Carga viral**

La media de la carga viral encontrada en los aspirados nasofaríngeos de pacientes con infecciones respiratorias es de  $4.9 \times 10^3$  copias / mL, según un estudio realizado en Alemania en el año 2007.<sup>(32)</sup> La media de la carga viral que se obtuvo en este experimento fue de  $1.67 \times 10^6$  copias / mL, la cual es mucho más alta que lo reportado por Neske F. y colaboradores, esto podría deberse a la diferencia de zonas donde fueron obtenidas las muestras y a la diferencia de años, pues se sabe que las infecciones por Bocavirus han ido en aumento desde el año de su descubrimiento (2005).

### **Correlación de datos clínicos con la carga viral**

En México no se había realizado un estudio donde se correlacionarán algunos datos clínicos con la carga viral de las muestras positivas para HBoV, en este caso se determinó que sólo la situación clínica y el rango de edad, son factores relacionados directamente con la carga viral, como se puede ver en los cuadros 14 y 15. Recientemente, Sun y colaboradores <sup>(59)</sup>, determinaron en un estudio donde el objetivo fue evaluar las características epidemiológicas y clínicas de la coinfección por HBoV con otros virus, que los pacientes entre 6 y 23 meses de edad son los que mayor riesgo de infección presentan, así mismo, es el grupo que registró la mayor carga viral, lo cual se observa en el estudio realizado, pues los pacientes menores de 24 meses son los que mayor carga viral presentaron y los de mayor

frecuencia de infección. Sun y colaboradores <sup>(59)</sup>, también determinaron que la coinfección HBoV-VSR es la que se encuentra con mayor frecuencia, lo cual se determinó con estudio realizado pues el VSR fue el virus que más estuvo presente en las coinfecciones con HBoV como se puede observar en el cuadro 11.

## X. Conclusiones

- Se logró establecer las condiciones metodológicas para optimizar la identificación de HBoV mediante la técnica de RT-PCR, con oligos diseñados en el Hospital Infantil Federico Gómez en el Laboratorio de Infectología en el área de Virología, que amplifican la región C-terminal de la proteína NS1.
- Se logró optimizar la reacción para la RT-PCR, encontrando la mejor concentración de sonda y la temperatura óptima de alineamiento.
- Se desarrolló una curva estándar para la cuantificación de HBoV 1 con el método diseñado a partir del Kit para HBoV de MyBioSource®.
- Se obtuvo una frecuencia de infección del 4.86% entre los años 2009 y 2010 en niños menores de 9 años.
- Se determinó que la carga viral está asociada a la situación clínica de los pacientes y al rango de edad de éstos, además de que en su mayoría, los pacientes que resultaron positivos para HBoV fueron pacientes varones y que se encontraban hospitalizados, lo que sugiere hay una alta probabilidad de que la infección se adquiriera dentro del mismo hospital.

## XI. Propuesta

Se estima que el método diseñado se emplee en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” como una prueba de rutina dentro del panel viral convencional, puesto que es de suma importancia determinar si una infección respiratoria es causada por un solo agente patógeno o se trata de una coinfección, sobre todo analizando que las coinfecciones con HBoV hacen ineficientes algunos tratamientos.

Así mismo este estudio reveló que la infección por HBoV se presenta principalmente en varones y que existe una alta probabilidad de que los pacientes adquirieran la infección dentro del mismo hospital, esto sin duda debería ser motivo de un estudio más profundo analizando datos clínicos de pacientes de años más recientes y de esta manera comprobar si dentro de los métodos de sanitización y esterilización del hospital, las técnicas empleadas están cubriendo los requisitos indispensables para reducir al mínimo las infecciones intrahospitalarias de este y otros patógenos. Como se abordó en el planteamiento del problema, las coinfecciones con HBoV 1 hacen que los tratamientos no sean tan eficientes; además, aumentan el riesgo de una infección mayor causada por el efecto sinérgico de Bocavirus con algunos otros virus patógenos, de esta manera el método desarrollado fue optimizado para aprovechar al máximo los reactivos y de esta manera disminuir el costo del análisis de las muestras.

XII. Anexos

ANEXO I

Revision No.: ZH0008  
Issue Date: Jul 17, 2015  
(For Research Use Only In USA & China)  
**Human Bocavirus (HBoV) Real Time PCR Kit User Manual**  
MBS598173 - Instrument III, IV

For use with ABI Prism™ 7000/7300/7500/7900 Step One Plus; iCycler IQ™ 4IQ™ 5; Smart Cycler II; Bio-Rad CFX 96; Rotor Gene™ 6000; Mx3000P/305P-MJ-Opton2/Chrom4; LightCycler™ 480 instrument

**Intended Use**  
Human Bocavirus real time PCR kit is used for the detection of human Bocavirus in samples like serum, plasma, nasal and pharyngeal secretions, C.S.F., sputum, blood, and etc.

**2. Principle of Real-Time PCR**  
The principle of the real-time detection is based on the fluorogenic 5' nuclease assay. During the PCR reaction, the DNA polymerase cleaves the probe at the 5' end and separates the reporter dye from the quencher dye only when the probe hybridizes to the target DNA. This cleavage results in the fluorescent signal generated by the cleaved reporter dye, which is monitored real-time by the PCR detection system. The PCR cycle at which an increase in the fluorescence signal is detected initially (Ct) is proportional to the amount of the specific PCR product. Monitoring the fluorescence intensities during Real Time allows the detection of the accumulating product without having to re-open the reaction tube after the amplification.

**3. Product Description**  
Human Bocavirus (HBoV) was first identified in respiratory samples from children and was proposed to be pathogenic in humans. It was first described in 2005 and has since been detected in respiratory tract secretions worldwide. HBoV is a positive member of the family Parvoviridae (subfamily Parvovirinae, genus Bocavirus). They have isometric nucleocapsids with diameters of 18 to 26 nm that contain a single molecule of linear, negative-sense or positive-sense, single-stranded DNA. At least 5299 nt were identified in one of HBoV reference strains. It can be assumed from the genome structure of other parvoviruses that the genomic DNA of bocavirus is flanked by hairpin structures.  
Human Bocavirus real time PCR kit contains a specific ready-to-use system for the detection of human Bocavirus by polymerase chain reaction (PCR) in the real-time PCR system. The master contains reagents and enzymes for the specific amplification of the human Bocavirus DNA. Fluorescence is emitted and measured by the real time systems' optical unit during PCR. The detection of amplified human Bocavirus DNA fragment is performed in fluorescence channel FAM with the fluorescent quencher BHQ1. DNA extraction buffer is available in the kit. In addition, the kit contains a system to identify possible PCR inhibition by measuring the HEX/VIC/JOE fluorescence of the internal control (IC). An external positive control (1-10 copies/ml) contained, allows the determination of the gene load. For further information, please refer to section 9.3 Quantitation.

**4. Kit Contents**

Ref.	Type of Reagent	Pre-estimation	25rxns.
1	DNA Extraction Buffer	1 vial, 1.5ml	
2	HBoV Reaction Mix	1 vial, 250µl	
3	PCR Enzyme Mix	1 vial, 12µl	
4	Molecular Grade Water	1 vial, 400µl	
5	Internal Control (IC)	1 vial, 300µl	
6	HBoV Positive Control (1-10 copies/ml)	1 vial, 300µl	

**Analysis sensitivity:**  $1 \times 10^3$  copies/ml; **LOQ:**  $2 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$  copies/ml  
Note: Analysis sensitivity depends on the sample volume, elution volume, method used, and detection methods and other factors. If you use the DNA extraction buffer in the kit, the analysis sensitivity is the same as it declares. However, when the sample volume is dozens or even hundreds of times greater than elution volume by some concentrating method, it can be much higher.

**5. Storage**  
• All reagents should be stored at -20°C. Storage at -4°C is not recommended.  
• All reagents can be used until the expiration date indicated on the kit label.  
• Repeated thawing and freezing (>3x) should be avoided, as this may reduce the sensitivity of the assay.  
• Cool all reagents during the working steps.  
• Reaction Mix should be stored in the dark.

**6. Additionally Required Materials and Devices**  
• Biological cabinet  
• Real time PCR system  
• Vortex mixer  
• Trypsin digestive Solution  
• Cryo-container  
• Real time PCR reaction tubes/plates  
• Pipette (0.5 µl – 1000 µl)  
• Sterile microtubes  
• Biohazard waste container  
• Disposable gloves, powderless  
• Refrigerator and Freezer  
• Desktop microcentrifuge for "eppendorf" type tubes (RCF max. 16,000 x g)  
• Tube racks

**7. Warnings and Precaution**  
Carefully read this instruction before starting the procedure.  
• For in vitro diagnostic use only.  
• This assay needs to be carried out by skilled personnel.  
• Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and should be prepared in a laminar flow hood.  
• This assay needs to be run according to Good Laboratory Practice.  
• Do not use the kit after its expiration date.  
• Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may reduce the sensitivity of the test.  
• Once the reagents have been thawed, vortex and centrifuge briefly the tubes before use.  
• Prepare quickly the Reaction mix on ice or in the cooling block.  
• Set up two separate working areas: 1) Isolation of the RNA/DNA and 2) Amplification/detection of amplification products.  
• Pipets, vials and other working materials should not circulate among working units.  
• Use always sterile pipette tips with filters.  
• Wear separate coats and gloves in each area.  
• Avoid aerosols.

**8. Sample Collection, Storage and transport**  
• Collect samples in sterile tubes.  
• Specimens can be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.  
• Transportation of clinical specimens must comply with local regulations for the transport of etiologic agents.

**9. Procedure**  
**9.1. DNA-Extraction**  
DNA extraction buffer is supplied in the kit, please thaw the buffer thoroughly and spin down briefly in the centrifuge before use. It's better to use commercial kits for nucleic acid extraction.  
**9.1.1. Sputum sample**  
1) Trypsin digestive Solution preparation  
Add 10µg trypsin to 200ml sterile purified water and mix thoroughly. Adjust the PH value to 8.0 with

**9.1.2. Nasal and pharyngeal secretions or C.S.F. samples**  
1) Take 1ml sample in a tube, centrifuge the tube at 1300g for 2min, and remove the supernatant, and keep the pellet. 2) Add 50µl DNA extraction buffer to the pellet, close the tube then vortex for 30 seconds. Spin down briefly in a table centrifuge. 3) Incubate the tube for 10 minutes at 100°C. 4) Centrifuge the tube at 1300g for 10 minutes. The supernatant contains the DNA extracted and can be used for PCR template.  
2) Take 50µl serum or plasma, add 50µl DNA extraction buffer, and close the tube then vortex for 10 seconds. Spin down briefly in a table centrifuge. 3) Incubate the tube for 10 minutes at 100°C. 4) Centrifuge the tube at 1300g for 10 minutes. The supernatant contains the DNA extracted and can be used for PCR template.

**9.1.3. Serum or plasma samples**  
1) Take 50µl serum or plasma, add 50µl DNA extraction buffer, and close the tube then vortex for 10 seconds. Spin down briefly in a table centrifuge. 2) Incubate the tube for 10 minutes at 100°C. 3) Centrifuge the tube at 1300g for 10 minutes. The supernatant contains the DNA extracted and can be used for PCR template.

**Attention:**  
A. During the incubation, make sure the tube is not open. Since the vapor will volatilize into the air and may cause contamination if the samples are positive.  
B. The extraction buffer should be used in 3 hours or stored at -20°C for 6 months.  
C. DNA extraction kits are available from various manufacturers. You may use your own extraction systems or the commercial kit based on the yield. For the DNA extraction, please comply with the manufacturer's instructions.

**9.2. Internal Control**  
It is necessary to add internal control (IC) in the reaction mix. Internal Control (IC) allows the user to determine and control the possibility of PCR inhibition.  
Add the internal control (IC) Iq1ren and the result will be shown in the HEX/VIC/JOE.

**9.3. Quantitation**  
The kit can be used for quantitative or qualitative real-time PCR.  
For performance of quantitative real-time PCR, standard dilutions must be prepared first as follows: Molecular Grade Water based dilution.  
Dilution is not needed for performing of qualitative real-time PCR detection.  
Take positive control (1-10 copies/ml) as the starting high standard in the first tube. The following pipette 50µl of Molecular Grade Water into next three tubes. Do three dilutions as the following figure.

**Dilution of Standards**

To generate a standard curve on the real-time system, all four dilution standards should be used and defined as standard with specification of the corresponding concentrations.  
**Attention:**  
A. Mix thoroughly before next transfer.  
B. The positive control (1-10 copies/ml) copies with concentration of the target DNA. Therefore, be careful during the dilution in order to avoid contamination.

**9.4. PCR Plate Setup**  
The Master Mix volume for each reaction should be pipetted as follows:

OR

PCR system without HEX/VIC/JOE channel can be mixed with 1µl Molecular Grade Water instead of Iq1 IC.

1) The volumes of Reaction Mix and Enzyme Mix per reaction multiply with the number of samples, which includes the number of controls, standards, and sample prepared. Molecular Grade Water is used as the negative control. For reasons of unprecise pipetting, always add an extra vial sample. Mix completely then spin down briefly in a centrifuge.  
2) Pipet 36µl (22.5µl for Smart Cycler II) Master Mix with micropipettes of sterile filter tips to each sample, positive and negative controls to different reaction plate/tubes. Immediately close the plate/tubes to avoid contamination.  
3) Spin down briefly in order to collect the Master Mix in the bottom of the reaction tubes.  
4) Perform the following protocol in the instrument:

37°C for 2min	1cycle	Selection of fluorescence channels
94°C for 2min	1cycle	FAM Target Nucleic Acid
95°C for 15sec, 60°C for 1 min	40cycles	HEX/VIC/JOE IC

(Fluorescence measured at 60°C)

5) If you use ABI Prism™ system, please choose "none" as passive reference and quencher.

**10. Threshold setting:** just above the maximum level of molecular grade water.  
**11. Calibration for quantitative detection:** Input each concentration of standard controls at the end of run, and a standard curve will be automatically formed.  
**12. Quality control:** Negative control, positive control, internal control and QS curve must be performed correctly, otherwise the sample results is invalid.

Channel	Ct value
Control	FAM HEX/VIC/JOE
Molecular Grade Water	UNDET
Positive Control (qualitative assay)	<35
QS (quantitative detection)	Correlation coefficient of QS curves: >=0.98

**13. Data Analysis and Interpretation:** The following sample results are possible:

Channel	Ct value	Result Analysis
FAM	HEX/VIC/JOE	
1#	UNDET	25-35
2#	< 35	Below the detection limit or negative
3#	—	Positive, and the software displays the quantitative value
4#	18-40	Re-test, If it is still 18-40, report as 1#
5#	UNDET	PCR Inhibition. No diagnosis can be concluded

For further questions or problems, please contact our technical support.

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

### XIII. Glosario

Amplicon	Conjunto de moléculas de ADN idénticas, resultado de una reacción en Cadena de la Polimerasa.
Ensayos multiplex	Tipo de ensayo que mide simultáneamente múltiples analitos en un solo ciclo del ensayo.
Carcinógenos	Cuando numerosas mutaciones causan el cáncer adquieren la denominación de carcinógenos.
Hibridación	Es el proceso de unir dos hebras complementarias de ADN.
Morbilidad	Cantidad de personas que enferman en un lugar y un período de tiempo determinados en relación con el total de la población.
Mutagénico	Es un agente físico, químico o biológico que altera o cambia la información genética (usualmente ADN) de un organismo y ello incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural
Quencher	hace referencia a cualquier proceso que produzca una disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida por una determinada sustancia.
Secuencias palindrómicas	Es una secuencia de ácido nucleico (ADN o ARN) la cual es idéntica si se lee de 5' a 3' en una hebra o de 5' a 3' en la hebra complementaria de la doble hélice.
Seroprevalencia	Manifestación general de una enfermedad o una afección dentro de una población definida en un momento dado, medida con análisis de sangre (pruebas serológicas).

## XIV. Referencias

1. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep; 102 (36):12891-6. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(43):15712.
2. Martin E, Kuypers J, McRoberts J, Englund J, Zerr D. Human Bocavirus 1 Primary Infection and Shedding in Infants. JID 2015; (212): 516-524.
3. Kafetzis D, Astra H, Tsofia M, Liapi G, Mathioudakis J, Kallergi K. Otitis and respiratory distress episodes following a respiratory syncycial virus infection. CMI 2003; (9):1006-1010.
4. Aldana V RS, Coria L JJ, Bustos CE, Espinosa MLE, Karam BJ. Infecciones Respiratorias agudas en menores de 5 años. Práctica médica efectiva. 2001;3(7). Disponible en: <http://bvs.insp.mx/articulos/1/17/v3n7.pdf> Consultado Julio 2017.
5. Ferreira E, Báez R, Trejo B, Ferreyra L, Delgado G, Lingdao O, et al. Infecciones respiratorias agudas en niños y signos de alarma identificados por padres y cuidadores en México. Salud Publica Mex. 2013; (55): S307-S313.
6. Dirección General de Epidemiología. Anuario Estadístico 2010. México, D.F.2011. [Consultado Julio 2017]. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>.

7. Dirección General de Epidemiología. Perfil epidemiológico de la Infancia en México 2010. México, D.F 2011. [Consultado Julio 2017]. Disponible en: [www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/2011/MONOGRAFIAS/P\\_EPI\\_DE\\_LA\\_INFANCIA\\_EN\\_MEXICO\\_2010.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/2011/MONOGRAFIAS/P_EPI_DE_LA_INFANCIA_EN_MEXICO_2010.pdf).
8. Kaio A, Alencar W, Cordeiro M, Madeiros R. La aparición de Bocavirus Humano asociado con las infecciones respiratorias agudas en niños de 0 a 2 años de edad en Belém (Estado de Pará, Brasil). Rev Pan-Amaz Saude. 2010; 1 (1):87-92.
9. Budnik I, Ferrés M, Pardo T, Edwards J, et al. Aporte de la biología molecular en el diagnóstico de infecciones respiratorias agudas. Rev Chil Enferm Respir. 2016; 32: 224-232.
10. Vera M, Rudi J, Gómez A, Molina F, Viotti M, Ortellao L, et al. Detección de Bocavirus Humano en la población infantil de Tucumán y Santa Fe, Argentina. Rev Chilena Infectol. 2016; 33(2): 135-140.
11. Xu L, He X, Zhang D M, Feng F S, Wang Z, Guan L L, et al. Surveillance and genome analysis of human bocavirus in patients with respiratory infection in Guangzhou, China. PLoS One 2012; 7 (9): e44876
12. Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HGM, Lehtinen P, Osterback R, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. Clin Infect Dis. 2007 Apr; 44(7):904-10.
13. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus index database [Internet]. 2009. [Consultado Julio 2017]. Disponible en: <http://www.danforthcenter.org/iltab/ictvnet/asp/iVirusIndex.asp>

14. Zhao B, Yu X, Wang C, Teng Z, Wang C, Shen J, et al. High human bocavirus viral load is associated with disease severity in children under five years of age. *PLoS One* 2013; 8 (4):e62318
15. Babkin I V, Tyumentsev A I, Tikunov A Y, Zhirakovskaia E V, Netesov S V, Tikunova N V. A study of the human bocavirus replicative genome structures. *Virus Res* 2015; 195:196-202
16. Estructura 3D de Bocavirus Humano. Imagen disponible en: <https://es.123rf.com> [Consultado el 22 de septiembre de 2017].
17. Huang Q, Deng X, Yan Z, Cheng F, Luo Y, Shen W, Lei-Butters DC, Chen AY, Li Y, Tang L, Söderlund-Venermo M, Engelhardt JF, Qiu J. Establishment of a reverse genetics system for studying human bocavirus in human airway epithelia. *PLoS Pathog.* 2012; 8: e1002899.
18. Schildgen V, Lüsebrink J, Tillmann RL, Wulfert M, Gattermann N, Schildgen O. Human bocavirus is not detectable in bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. *Influenza Other Respir Viruses.* 2011; 5: 221-222.
19. Lüsebrink J, Schildgen V, Tillmann RL, Wittleben F, Böhmer A, Müller A, Schildgen O. Detection of head-to-tail DNA sequences of human bocavirus in clinical samples. *PLoS One* 2011; 6: e19457,
20. Kapoor A, Hornig M, Asokan A, Williams B, Henriquez JA, Lipkin WI. Bocavirus episome in infected human tissue contains non-identical termini. *PLoS One* 2011; 6: e21362,

21. Babkin IV, Tyumentsev AI, Tikunov AY, Zhirakovskaia EV, Netesov SV, Tikunova NV. A study of the human bocavirus replicative genome structures. *Virus Res* 2015; 195: 196-202.
22. Zhao H, Zhao L, Sun Y, Qian Y, Liu L, Jia L, Zhang Y, Dong H. Detection of a bocavirus circular genome in fecal specimens from children with acute diarrhea in Beijing, China. *PLoS One* 2012; 7: e48980
23. Proença-Modena J L, Gagliardi T B, Paula F E, Iwamoto M A, Criado M F, Camara A A, et al. Detection of human bocavirus mRNA in respiratory secretions correlates with high viral load and concurrent diarrhea. *PLoS One* 2011;6 (6): e21083
24. Zhao M, Zhu R, Qian Y, Deng J, Wang F, Sun Y, et al. Prevalence analysis of different human bocavirus genotypes in pediatric patients revealed intra-genotype recombination. *Infect Genet Evol* 2014; 27: 382-8
25. Zhang Z, Et al. Human Bocavirus NP1 Inhibits INF- $\gamma$  Production by Blocking Association of INF Regulatory Factor 3 with INFB Promoter. *J Immunol* 2012; 189:1144-1153.
26. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de la RT-PCR. *Investigación Discapacidad* 2013;2(2):70-78.
27. Kapoor A, Hornig M, Asokan A, Williams B, Henriquez JA, Lipkin WI. Bocavirus episome in infected human tissue contains non-identical termini. *PLoS One* 2011; 6: e21362.

28. Tewary SK, Zhao H, Shen W, Qiu J, Tang L. Structure of the NS1 protein N-terminal origin recognition/nickase domain from the emerging human bocavirus. *J Virol* 2013; 87: 11487-11493.
29. Hsu TC, Tzang BS, Huang CN, Lee YJ, Liu GY, Chen MC, Tsay GJ. Increased expression and secretion of interleukin-6 in human parvovirus B19 non-structural protein (NS1) transfected COS-7 epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2006; 144: 152-157.
30. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, Triki H, Bahri O, Oderinde BS, Baba MM, Bukbuk DN, Besser J, Bartkus J, Delwart E. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis* 2010; 201: 1633-1643.
31. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol* 2012; 22: 46-64.
32. Proenca-Modena JL, Martinez M, Amarilla AA, Espínola EE, Galeano ME, Fariña N, Russomando G, Aquino VH, Parra GI, Arruda E. Viral load of human bocavirus-1 in stools from children with viral diarrhoea in Paraguay. *Epidemiol Infect* 2013; 141: 2576-2580.
33. Neske F, Blessing K, Tollmann F, Schubert J, Rethwilm A, Kreth HW, Weissbrich B. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2116-2122.
34. Kumar A, Filippone C, Lahtinen A, Hedman L, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Franssila R. Comparison of T cell immunity against human bocavirus and parvovirus B19: proliferation and cytokine responses are

similar in magnitude but more closely interrelated with human bocavirus.

Scand J Immunol 2011; 73: 135-140.

35. Guido M, Tumolo M, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, et al. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. World J Gastroenterol. 2016; 22(39): 8684-8697.

36. Kantola K, Hedman L, Arthur J, Alibeto A, Delwart E, Jartti T, Ruuskanen O, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Seroepidemiology of human bocaviruses 1-4. J Infect Dis 2011; 204: 1403-1412.

37. Hustedt JW, Christie C, Hustedt MM, Esposito D, Vazquez M. Seroepidemiology of human bocavirus infection in Jamaica. PLoS One 2012; 7: e38206.

38. Lee JI, Chung JY, Han TH, Song MO, Hwang ES. Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. J Infect Dis 2007; 196: 994-997.

39. Babady NE, Mead P, Stiles J, Brennan C, Li H, Shuptar S, Stratton CW, Tang YW, Kamboj M. Comparison of the Luminex xTAG RVP Fast assay and the Idaho Technology FilmArray RP assay for detection of respiratory viruses in pediatric patients at a cancer hospital. J Clin Microbiol 2012; 50: 2282-2288.

40. Balada-Llasat JM, LaRue H, Kamboj K, Rigali L, Smith D, Thomas K, Pancholi P. Detection of yeasts in blood cultures by the Luminex xTAG fungal assay. J Clin Microbiol 2012; 50: 492-494.

41. Kantola K, Hedman L, Arthur J, Alibeto A, Delwart E, Jartti T, Ruuskanen O, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Seroepidemiology of human bocaviruses 1-4. *J Infect Dis* 2011; 204: 1403-1412.
42. Saiki RK et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
43. Mollinedo M. Diseño de un ensayo de RT-PCR para el estudio de la expresión de los genes reguladores de la apoptosis [Tesis]. Cantabria: Hospital Universitario Marques de Valdecilla: 2013.
44. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* 1996; 14: 303-308.
45. Carriço, J. A., Sabat, A. J., Friedrich, A. W., & Ramirez, M. Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: databases, tools and the next-generation sequencing revolution on behalf of the ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESGEM). *Eurosurveillance*, 2013; 18: 1–9.
46. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 2012; 62: 3923.
47. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de la RT-PCR. *Investigación en Discapacidad.* 2013; 2(2): 70-78.
48. Diagrama de la extracción de DNA de muestras biológicas. Disponible en: [http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion\\_AN\\_Purificacion&opc=tecnicas&idap=34](http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_AN_Purificacion&opc=tecnicas&idap=34). [Consultado el 1 de febrero de 2018].

49. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 1992; 10: 413-417.
50. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 1993; 11: 1026-1030.
51. Foy CA, Parkes HC. Emerging homogeneous DNA based technologies in the clinical laboratory. *Clin Chem*. 2001; 47: 990-1000.
52. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and Surface binding by SYBR green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: 103.
53. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*. 1995; 4: 357-362.
54. Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies [Internet]. *Journal of Visualized Experiments*. 2012. [Consultado septiembre 2018]. Disponible en: <http://www.jove.com/video/3998/>.
55. Salazar AM, Sandoval AS, Armendáriz JS. *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. México: McGraw Hill Interamericana; 2013.

56. Briones Peña SJ. Secuenciación del genoma completo del virus de la hepatitis B en México [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, 2013.
57. Ilustración de la forma correcta de tomar el exudado. Imagen disponible en: <http://www.adamimages.com> [Consultado el 25 de octubre de 2017].
58. Diaz J, Morales-Romero J, Pérez-Gil G, Bedolla-Barajas M, Delgado-Figueroa N, García-Román R, et al. Viral coinfection in acute respiratory infection in Mexican children treated by the emergency service: A cross-sectional study. *Ital J Pediatr.* 2015;41(1):1–8.
59. Sun H, Sun J, Ji W, Hao C, Yan Y, Chen Z, et al. Impact of RSV Coinfection on Human Bocavirus in Children with Acute Respiratory Infections. *J Trop Pediatr.* 2018;1–10.