

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad Ciencias de la Vida

Título del trabajo

**Método Multiplex RT-qPCR para detección de virus que
causan infecciones respiratorias agudas graves en el
Ecuador**

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Eduardo Moisés Merejildo Matías

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

A mi familia y a todos quienes me han brindado su apoyo. Especialmente a mis padres, por ser el soporte y fuente motivación en todo lo que soy, por su amor y esfuerzo incondicional en cada etapa de mi vida, incentivando en mí el deseo de superación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente al Laboratorio para Investigaciones Biomédicas de Espol y a todos sus integrantes, con énfasis especial a Msc. Mariuxi Mirabá y a mi tutor Washington B. Cárdenas Ph.D. por brindarme sus conocimientos y un continuo apoyo durante gran parte de mi vida académica.

Agradezco a mis amistades, por todos los momentos, enseñanzas y consejos compartidos que me ayudan a ser mejor cada día.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Merejildo Matías Eduardo Moisés*, y doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

Merejildo Matías
Eduardo Moisés

EVALUADORES

.....
Diego Gallardo Polit, M.Sc.

PROFESOR DE LA MATERIA

.....
Washington B. Cárdenas, Ph.D.

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas graves (IRAG) ocasionan anualmente la muerte de cerca de 4 millones de personas, esto la ubica como la sexta causa principal de mortalidad en todo rango de edad y es la primera causa de muerte en niños menores de 5 años. Por otra parte, la dependencia de Ecuador por tecnología extranjera para implementar pruebas diagnósticas implica elevados costos y un demorado tiempo de importación. Teniendo en cuenta la importancia de la vigilancia epidemiológica y los beneficios de un diagnóstico rápido y seguro, surge la necesidad de desarrollar localmente un método para detección de virus que causan IRAG en el Ecuador. El objetivo de este proyecto es implementar un diagnóstico multiplex local de virus respiratorios mediante la técnica de RT-qPCR para su aplicación en salud pública. Con ese fin, se diseñó iniciadores y sondas para detectar Influenza A/B, RSV y SARS-CoV-2; luego, se realizaron pruebas de optimización en reacciones individuales y en multiplex para finalmente validar la prueba con muestras positivas. En la PCR multiplex se detectó simultáneamente los 3 objetivos en un solo tubo de reacción y los resultados con las muestras positivas coincidieron al 100% con el diagnóstico esperado, demostrando que es factible emplearla como método diagnóstico. El desarrollo local de la multiplex ofrece un mejor acceso hacia un diagnóstico para infecciones respiratorias, además permite aumentar la investigación y mejorar la capacidad tecnológica con el fin de obtener soberanía sanitaria en el Ecuador.

Palabras Clave: Diagnostico, Virus respiratorios, PCR Multiplex, RT-qPCR.

ABSTRACT

Severe acute respiratory infections (SARI) cause the death of nearly 4 million people annually, making it the sixth leading cause of mortality in all age groups and the leading cause of death in children under 5 years of age. On the other hand, Ecuador's dependence on foreign technology to implement diagnostic tests implies high costs and a long import time. Considering the importance of epidemiological surveillance and the benefits of a rapid and safe diagnosis, the need arises to develop locally a method for the detection of viruses that cause SARI in Ecuador. The objective of this project is to implement a local multiplex diagnosis of respiratory viruses using the RT-qPCR technique for its application in public health. To this end, primers and probes were designed to detect Influenza A/B, RSV and SARS-CoV-2; then, optimization tests were performed in individual and multiplex reactions to finally validate the test with positive samples. The multiplex PCR simultaneously detected the 3 targets in a single reaction tube and the results with positive samples coincided 100% with the expected diagnosis, demonstrating that it is feasible to use it as a diagnostic method. The local development of the multiplex offers better access to a diagnosis for respiratory infections, in addition to increasing research and improving technological capacity in order to obtain sanitary sovereignty in Ecuador.

Keywords: Diagnosis, Respiratory viruses, Multiplex PCR, RT-qPCR

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES	5
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE GENERAL	3
ABREVIATURAS.....	5
SIMBOLOGÍA.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
CAPÍTULO 1	9
1. Introducción	9
1.1 Descripción del problema	10
1.2 Justificación del problema	10
1.3 Objetivos	11
1.3.1 Objetivo General.....	11
1.3.2 Objetivos Específicos.....	11
1.4 Marco teórico.....	11
1.4.1 Generalidades de las IRAG	11
1.4.2 Agentes etiológicos que causan IRAG.....	12
1.4.3 IRAG en el Ecuador	14
1.4.4 Métodos diagnósticos	15
CAPÍTULO 2	17
2. Metodología.....	17
2.1 Análisis bioinformático.....	17
2.1.1 Diseño <i>in silico</i> de iniciadores y sondas.....	17
2.1.2 Evaluación <i>in silico</i> de especificidad y sensibilidad.....	17

2.1.3	Evaluación <i>in silico</i> de interacciones entre oligonucleótidos.....	18
2.2	Síntesis de controles positivos	18
2.2.1	Amplificación del fragmento para control y ligación en un vector de clonación.....	18
2.2.2	Transformación y purificación de plásmidos	19
2.2.3	Síntesis de ARN.....	19
2.2.4	Cuantificación	20
2.3	Optimización de detección de cada virus individualmente (monoplex).....	20
2.4	Optimización de detección de los 4 virus en conjunto (multiplex)	21
2.5	Análisis de muestras de hisopado nasal	21
CAPÍTULO 3		22
3.	Resultados Y análisis	22
3.1	Análisis bioinformático.....	22
3.2	Síntesis de controles positivos	22
3.3	Optimización de detección de cada virus individualmente (monoplex).....	23
3.4	Optimización de detección de los 4 virus en conjunto (multiplex)	24
3.5	Análisis de muestras de hisopado nasal	26
CAPÍTULO 4		27
4.	Conclusiones y recomendaciones	27
	Conclusiones.....	27
	Recomendaciones.....	27
BIBLIOGRAFÍA		28

ABREVIATURAS

cDNA	ADN complementario
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
HCov	Coronavirus humanos
IDT	Integrate DNA Technologies
IRAG	Infecciones respiratorias agudas graves
CGE	Copias genómicas equivalentes
MAFFT	Multiple Aligment Using Fast Forier Transform
MERS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase chain reaction
PIBM	Países de ingresos bajos y medianos
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription PCR
SARS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo
VSR	Virus sincitial respiratorio
WHO	World Health Organization

SIMBOLOGÍA

ul	Microlitro
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Porcentajes de casos de IRAG en Ecuador por agente etiológico desde la semana 1 – 30 del 2022. Fuente: (Ministerio de Salud Pública, 2022).....	15
Figura 2-1: Esquema para obtener los plásmidos de control positivo	19
Figura 3-1: Comprobación del inserto con M13 en colonias transformadas. A: Influenza A (1265pb) y B: RSV (987 pb).	23
Figura 3-2: Curva estándar del ensayo monoplex de Influenza B	24
Figura 3-3: Comparación monoplex vs multiplex a dilución alta y baja de Influenza B..	25
Figura 3-4: Multiplex con controles positivos de Influenza A/B, RSV y SARS-CoV-2....	25
Figura 3-5: Validación en muestras clínicas previamente diagnosticadas positivas para A: Influenza A/B, B: SARS-CoV-2 , C: RSV.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1: Características de iniciadores y sondas usados en la multiplex.....	17
Tabla 3-1: número de copias genómicas equivalentes (CGE) de cada control positivo.	23

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas graves (IRAG) son la principal causa de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas en el mundo debido a su amplia transmisibilidad y a su potencial de agravarse. Los pacientes con IRAG registran una infección respiratoria aguda con inicio en los últimos 10 días, con fiebre medida ≥ 38 °C o antecedentes de fiebre, tos y requieren hospitalización; de modo que figuran como una de las causas más habituales de ingreso o consulta a los establecimientos de salud, especialmente en los países en desarrollo y entre los infantes, ancianos y pacientes con afecciones médicas subyacentes (Caini et al., 2019). Cada año mueren cerca de 4 millones de personas por infecciones respiratorias agudas, de estas muertes el 98 % se deben a infecciones del tracto respiratorio inferior (WHO, 2014), lo que convierte a las infecciones de las vías respiratorias inferiores en la sexta causa principal de mortalidad en todo rango de edad y primera causa de muerte en los niños menores de 5 años (Troeger et al., 2018).

Aunque la frecuencia de IRAG por bacterias es significativa, las etiologías más comunes de las IRAG son virales y son causas frecuentes de ingresos hospitalarios, brotes nosocomiales, neumonía y muerte. Entre los principales agentes de origen viral causales de IRAG están el SARS-CoV-2, virus de la influenza, virus sincitial respiratorio (VSR), virus de la Parainfluenza, adenovirus; entre otros. La inversión para prevenir y controlar estos agentes virales corresponde, en parte, en comprender su incidencia y estacionalidad en cada región. En los países templados de altos ingresos se conoce mucho sobre los virus respiratorios; sin embargo en los países tropicales de ingresos bajos y medianos (PIBM), donde se produce la mayor parte de la mortalidad, no hay información suficiente sobre la carga y el momento de las epidemias de virus respiratorios; principalmente a causa de la falta de capacidad de diagnóstico en los laboratorio (Seto et al., 2013).

En Ecuador, al tener 3 zonas geoclimáticas (litoral, interandina y amazónica) se generan epidemias complejas de virus respiratorios y la información sobre la carga de los virus respiratorios es limitada (Azziz-Baumgartner et al., 2022) debido a que Ecuador depende en gran medida del extranjero para implementar los diagnósticos, lo que resulta en un elevado costo al importar las pruebas y limitando de esta manera el número de pruebas que se pueden realizar para la vigilancia epidemiológica de las IRAG.

1.1 Descripción del problema

Ecuador depende de tecnología extranjera para la implementación de pruebas diagnósticas de alta complejidad de importancia para la salud pública. Los costos excesivos y el demorado tiempo de importación dificultan la adquisición de materiales necesarios para el diagnóstico. Durante la pandemia por SARS-CoV-2 se evidenció la dependencia total de la importación de pruebas diagnósticas, impidiendo el seguimiento epidemiológico y la toma de decisiones. Estos mismos escenarios se repitieron durante la pandemia por Influenza A(H1N1)pdm09 en 2009 y la epidemia de Chikungunya en 2015. Teniendo en cuenta la importancia de la vigilancia epidemiológica y la alta probabilidad de que futuras epidemias o pandemias sean causadas por patógenos respiratorios, surge la necesidad de desarrollar localmente un diagnóstico para detección de virus que causan infecciones respiratorias agudas graves en el Ecuador.

1.2 Justificación del problema

Durante el 2018 en Ecuador, la tasa de incidencia de IRAG por agentes bacterianos, virales, o no definido fue de 29000 a 31000 casos anuales que corresponden a 1.8 casos por cada 1000 habitantes. La etiología de las IRAG es amplia y tiende a variar temporal y geográficamente, por esta razón es necesario la identificación de los patógenos respiratorios. Identificar oportunamente la etiología de las IRAG permite iniciar el tratamiento adecuado para el paciente, evitar la transmisión nosocomial y establecer las medidas necesarias para limitar la

propagación de la infección. También, la rápida identificación puede ayudar a vigilar efectivamente los servicios de salud al establecer la circulación del virus respiratorio a nivel local. Por tanto el desarrollo local de un diagnóstico de virus respiratorios puede reducir el costo de las pruebas, facilitando su accesibilidad al público. Por otro lado, disminuyen el tiempo de diagnóstico permitiendo al sector de la salud otorgar el tratamiento oportuno al paciente.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Implementar un diagnóstico multiplex local de virus respiratorios mediante la técnica de RT-qPCR para su aplicación en salud pública

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Diseñar cebadores y sondas mediante herramientas bioinformáticas para la evaluación *in silico* de especificidad e interacciones entre los componentes de la múltiplex de tiempo real.
2. Estandarizar condiciones de la multiplex empleando ARN sintéticos y muestras clínicas para la optimización de las condiciones de la multiplex.
3. Validar el ensayo multiplex de virus respiratorios siguiendo guías internacionales específicas para el desarrollo de RT-qPCR en salud pública

1.4 Marco teórico

1.4.1 Generalidades de las IRAG

Los casos de infecciones respiratorias agudas graves (IRAG) son definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como pacientes que registren infección respiratoria aguda con inicio en los últimos 10 días, con fiebre medida ≥ 38 °C o antecedentes de fiebre, tos y que requieran hospitalización. (Fitzner et al., 2018; World Health Organization, 2022a).

Las IRAG son la causa principal de morbilidad y mortalidad en lo que respecta a enfermedades infecciosas en el mundo. Anualmente mueren alrededor de 4 millones de personas por IRAG; de estas muertes, el 98 % se deben a infecciones del tracto respiratorio inferior (World Health Organization, 2020), lo que convierte a las infecciones de las vías respiratorias inferiores en la sexta causa principal de mortalidad en todo rango de edad, y la primera causa de muerte en niños menores de 5 años (Naghavi et al., 2017; Troeger et al., 2018).

La distribución de la mortalidad y carga de infecciones respiratorias es variable a través del mundo, afectando mayoritariamente a los lactantes, niños y ancianos en países de ingresos bajos y medianos (Caini et al., 2019; World Health Organization, 2020); siendo uno de los motivos más frecuentes de ingreso a establecimientos de salud pública, especialmente en los servicios de pediatría. (Kozinska et al., 2022; World Health Organization, 2020). El riesgo de contraer o morir por infecciones respiratorias aumenta cuando las personas provienen de hogares con un dificultoso acceso a una nutrición adecuada, combustible limpio para cocinar, saneamiento, vacunas, instalaciones de atención médica o poseen una condición inmunocomprometida. (Troeger et al., 2018). Sin embargo, también hay condiciones ambientales que modulan la incidencia y distribución de la enfermedad como contaminantes del aire, humedad, estación y temperatura. (Álvaro-Meca et al., 2022).

1.4.2 Agentes etiológicos que causan IRAG

Los agentes etiológicos que causan estas infecciones incluyen un amplio espectro de patógenos que pueden ser virus, bacterias y hongos. A pesar de que las bacterias son patógenos significantes, las etiologías más comunes son virales (Correia et al., 2021; Kumar et al., 2017; Seto et al., 2013), representando cerca de 80% de las infecciones respiratorias (Kozinska et al., 2022). Los principales patógenos virales incluyen virus de la influenza, coronavirus, virus sincitial respiratorio (VRS), parainfluenza, adenovirus y rinovirus. La mayoría de las infecciones respiratorias virales se presentan con síntomas inespecíficos como fiebre, tos y rinorrea, sin embargo los virus que causan la infección difieren entre sí

en términos epidemiológicos, circulación temporal a lo largo del año, distribución en grupos de edad y gravedad de la enfermedad (Caini et al., 2019; Zimmerman et al., 2014).

1.4.2.1 Coronavirus

Los coronavirus humanos (HCov) son virus de ARN envueltos con genomas grandes. Se ha identificado que son una causa habitual de infecciones del tracto respiratorio, ocasionando desde un simple resfriado hasta enfermedades más complejas llegando a suscitar en algunos casos neumonía, síndrome respiratorio agudo severo y muerte (Trombetta et al., 2016; World Health Organization, 2020). Algunos coronavirus pueden introducirse a los humanos por transmisión zoonótica, es decir que se transmiten entre animales y personas. En este siglo se ha registrado un aumento en los HCoV zoonóticos emergentes que infectan a humanos. En 2002, surgió el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), en 2012, el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) en 2012, y más recientemente en 2019, el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2); este último se ha propagado por todo el mundo llegando a más de 600 millones de casos confirmados y más de 6,4 millones de muertes (World Health Organization, 2022b).

1.4.2.2 Influenza

Los virus de la influenza circulan en todas las partes de mundo y contribuyen sustancialmente a las infecciones respiratorias agudas, especialmente entre los grupos con mayor riesgo de complicaciones (Fica et al., 2019). En 2018, la influenza provocó más de 10 millones de infecciones respiratorias agudas en niños menores de 5 años (Azziz-Baumgartner et al., 2022; Wang et al., 2020). Hay 3 tipos de virus de la influenza que infectan humanos:

Virus de la Influenza A: Ha causado pandemias dado que son altamente mutables. Son clasificados en subtipos acorde a las combinaciones de las proteínas hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa

(NA) presente en su superficie. Actualmente los subtipos A(H1N1) y A(H3N2) en circulación ocasionan epidemias estacionales. (Pan American Health Organization, 2014).

Virus de la Influenza B: Han causado brotes esporádicos con mortalidad elevada en el grupo de adultos mayores. Se dividen en dos linajes B/Yamagata o B/Victoria, ambos actualmente circulando (Shu et al., 2021).

Virus de la Influenza C: No es de importancia para la salud pública puesto que provoca infecciones leves y es detectado con menor frecuencia (WHO, 2018).

1.4.2.3 Virus sincitial respiratorio (VSR)

El virus sincitial respiratorio (VSR) es el patógeno más común reportado en lactantes y niños menores de 5 años que padecen de infecciones respiratorias agudas. A nivel mundial, para 2019 se estimó que el VSR causó más de 30 millones de casos en niños de 0 a 60 meses de edad (Azziz-Baumgartner et al., 2022; Li et al., 2022). Las hospitalizaciones por VRS están asociadas a la estacionalidad, con epidemias durante la época fría en las zonas templadas; sin embargo, la estacionalidad aún no está bien caracterizada en las zonas tropicales (Heppe-Montero et al., 2022).

1.4.3 IRAG en el Ecuador

En Ecuador, al tener 3 zonas geoclimáticas (litoral, interandina y amazónica) se generan epidemias complejas de virus respiratorios y el manejo es complicado por la limitada información que se tiene sobre la epidemiología de los virus respiratorios (Azziz-Baumgartner et al., 2022); además, a pesar de que la influenza o Covid-19 puede prevenirse mediante la vacunación, actualmente no existen vacunas o terapias aprobadas para la mayoría de los virus respiratorios lo que dificulta aún más el manejo. (Caini et al., 2019). Durante las primeras 30 semanas del año 2022 (fecha de corte 1/08/22), se han reportado más de 2500 casos de IRAG en el país

según la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Los datos fueron recopilados por hospitales centinela de IRAG, seleccionados estratégicamente en distintos lugares del país para conocer la transmisión de los virus e identificar características epidemiológicas y microbiológicas. Sin embargo solo 901 casos fueron diagnosticados, el virus con mayor frecuencia fue SARS-CoV-2 (44.84%), seguido de virus sincitial respiratorio (29.08%), influenza A/H3N2 (14.43%), entre otros virus respiratorios (Figura 1-1) . (Ministerio de Salud Pública, 2022)

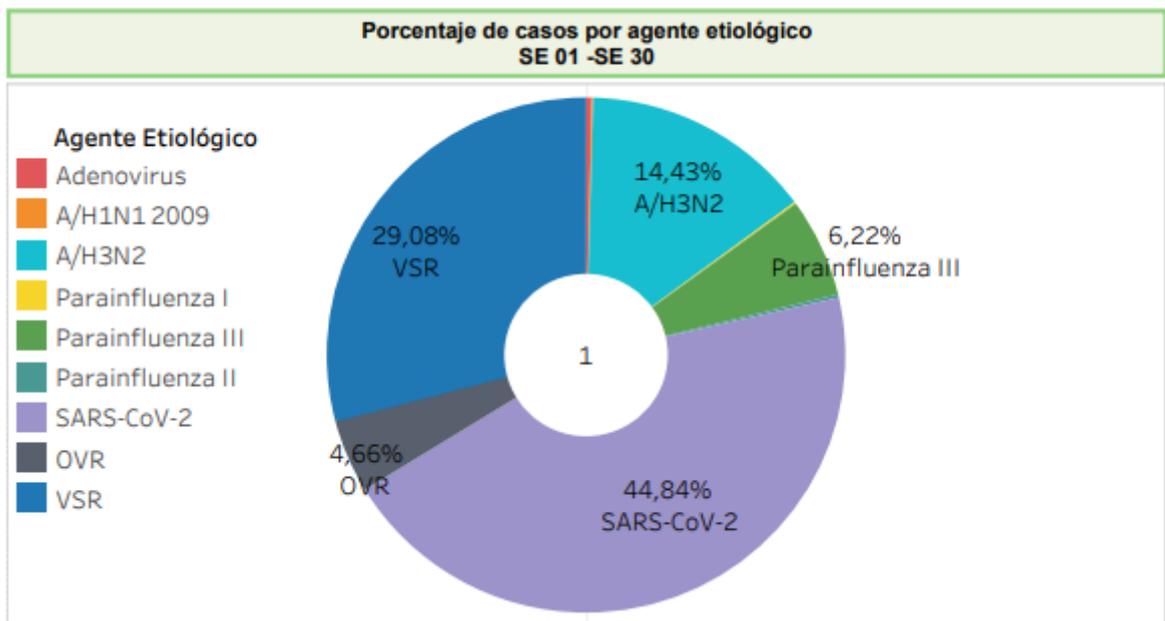


Figura 1-1: Porcentajes de casos de IRAG en Ecuador por agente etiológico desde la semana 1 – 30 del 2022. Fuente: (Ministerio de Salud Pública, 2022)

1.4.4 Métodos diagnósticos

La identificación precisa y temprana de los patógenos virales causales de IRAG es esencial para seleccionar un tratamiento adecuado, ayudar a reducir el uso innecesario de antibióticos y prevenir contagios para detener las epidemias (Correia et al., 2021; Zhang et al., 2020). Un rápido diagnóstico también disminuye el tiempo que permanece el paciente en el hospital, reduciendo los gastos hospitalarios y contribuyendo a la mejora de los servicios de salud.

Existen varios métodos para detectar los virus respiratorios. Los métodos diagnósticos como las pruebas rápidas de antígenos, ensayos de inmunofluorescencia (IFA) directo/indirecto y cultivo viral, requieren mucho tiempo

y trabajo, o tienen sensibilidad limitada; por tanto las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos parecen ser el mejor enfoque (Zhang et al., 2020).

Dada su alta especificidad y sensibilidad, los métodos que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son utilizados en muchas áreas diferentes. En una PCR común, se utiliza un solo par de iniciadores (monoplex), pero al agregar más conjuntos de iniciadores (multiplex), es posible amplificar de forma paralela diferentes secuencias objetivo en una misma reacción. Una PCR multiplex en tiempo real incluye sondas para monitorear la cantidad de producto amplificado por ciclo, ofreciendo mayor velocidad y rentabilidad durante la ejecución las pruebas. Otras ventajas es que requiere menores cantidades de material genético, reduce los errores de pipeteo y reducen el impacto ambiental del análisis al disminuir la cantidad de consumibles y reactivos utilizados ((Grohmann et al., 2021)

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Análisis bioinformático

2.1.1 Diseño *in silico* de iniciadores y sondas.

Se realizó la búsqueda de iniciadores y sondas para Influenza A, Influenza B y Virus sincitial respiratorio (VSR) que hayan sido reportadas en bases de datos científicas, y se modificaron para incluir mutaciones recientes. Para ciertos virus se decidió diseñar desde cero los iniciadores y sondas. Las características de todos los oligonucleótidos se evaluaron en base a las pautas dispuestas en la Guía de PCR en tiempo real de Integrate DNA Technologies (IDT) y Bio-rad. (Ver Tabla 2-1)

Tabla 2-1: Características de iniciadores y sondas usados en la multiplex.

Virus patógeno	Nombre	Tinte fluorescente	Longitud	Amplificación	Tm °C	%GC	Gen objetivo
RSV	RSV-A-B-ESPOL_DIAG_FW2		18		64.3	55%	
	RSV-P-MGB	HEX	19	118	53.1	32%	Nucleoproteína
	RSV-A-B_DIAG_RV		23		62.6	48%	
Influenza B	InfB_DIAG_F2_2022		21		63.1	48%	
	InfB_P2	ROX	27	102	71	54%	Proteína no estructural
	InfB_DIAG_R2		20		62.9	50%	
Influenza A	FLU_A_M_DIAG-F3		21		63.2	52%	
	FLU_A_M-P3	ROX	22	132	71.8	64%	Proteína matriz 1
	FLU_A_M_DIAG_-R3		20		65.4	58%	
SARS-CoV-2	HKU-nsp14F		20		66.3	48%	
	HKU-nsp14P	FAM	21	95	68.3	59%	Proteína no estructural 14
	HKU-nsp14R		24		66.2	50%	

2.1.2 Evaluación *in silico* de especificidad y sensibilidad

Para las pruebas de sensibilidad se descargaron secuencias de Influenza A, Influenza B y VSR desde la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) limitando la búsqueda a secuencias subidas desde el 2018 y con hospedero a "Homo sapiens". Para SARS-CoV-2 se usó la base de datos GISAID y se descargaron secuencias completas de cada variante del virus. Para las secuencias de cada virus, se realizó un alineamiento múltiple en Geneious versión 8.1.8 usando el algoritmo Multiple Alignment Using Fast Fourier Transform (MAFFT

v7.017) con los parámetros por defecto. En cada alineamiento, se examinó el anillamiento de todos los iniciadores y sondas con hasta 4 desajustes como máximo para determinar si existía reacción cruzada (cross-reaction). Además, se evaluó la especificidad de cada iniciador y sonda a través de un análisis Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra la colección de nucleótidos nr/nt del NCBI para comprobar que no existan regiones similares en otro genoma fuera del objetivo viral.

2.1.3 Evaluación *in silico* de interacciones entre oligonucleótidos

La formación de dímeros entre oligonucleótidos puede afectar el rendimiento de la PCR al producir amplificaciones inespecíficas y competir por reactivos. Por otra parte, la formación de estructuras secundarias (horquillas) reducen las probabilidades de anillamiento del oligonucleótido a la plantilla. Debido a esto, se evaluó *in silico* la formación de autodímeros, heterodímeros y horquillas de los oligonucleótidos usando la herramienta de IDT, OligoAnalyzer v3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

2.2 Síntesis de controles positivos

En el laboratorio para Investigaciones Biomédicas de la ESPOL ya existían controles positivos para SARS-CoV-2, por tanto no es incluido en esta etapa.

2.2.1 Amplificación del fragmento para control y ligación en un vector de clonación.

A partir del ARN de muestras confirmadas positivas para Influenza A, Influenza B, y RSV se realizó la síntesis de ADN complementario (cDNA) con la enzima ThermoScript™ RT. Luego se realizó una PCR con iniciadores exteriores a los de diagnóstico con el fin de amplificar una región que abarque el segmento de interés. Esta PCR fue realizada con la enzima Platinum Taq DNA polymerase, que añade una cola de adeninas en el extremo 3' del fragmento amplificado. La reacción se corrió en un gel de agarosa del 1%, se cortó la banda amplificada y se purificó usando el kit Gel Extraction E.Z.N.A. de Omega Bio-Tek. El producto purificado fue ligado al vector pGEM-T usando una ligasa de ADN T4 (Promega) (Ver Figura 2-1).

2.2.2 Transformación y purificación de plásmidos

La producto de ligación fue usado para transformar bacterias competentes DH5 α , que luego se sembraron en placas con IPTG y X-gal e incubando por 16 horas. Se realizó PCR a colonias seleccionadas para comprobar la presencia del inserto de interés, luego las colonias con PCR positiva fueron cultivadas en medio líquido durante toda la noche. La purificación del plásmido se llevó a cabo con el kit E.Z.N.A.[®] Plasmid DNA Mini Kit I y posteriormente se volvió a confirmar el inserto mediante PCR.

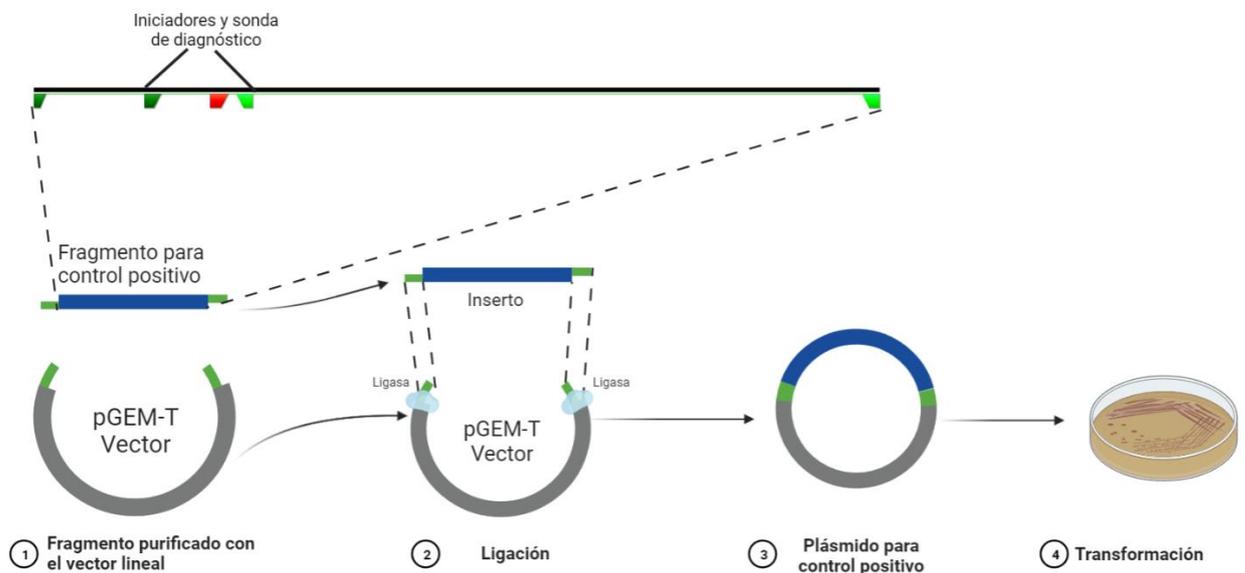


Figura 2-1: Esquema para obtener los plásmidos de control positivo

2.2.3 Síntesis de ARN

A partir de los plásmidos de controles, se realizó una PCR para amplificar la región que incluye el inserto y el promotor T7, luego se corrió en un gel de agarosa para cortar la banda y purificarla. Con el producto purificado, se llevó a cabo la transcripción in vitro de ARN durante toda la noche usando el kit MEGAscript de Thermofisher. Posteriormente, se purificó el ARN por el método fenol/cloroformo.

2.2.4 Cuantificación

Para las pruebas RT-qPCR se requiere saber el número de copias genómicas equivalentes (CGE) de los controles positivos, por lo que, tanto plásmidos como ARN sintéticos, fueron cuantificados en el Quantus™ Fluorometer. Fue necesario realizar diluciones de los controles para no exceder el rango de cuantificación. Para los plásmidos se usó el kit QuantiFluor® dsDNA System y para el ARN sintético, el kit QuantiFluor® RNA System.

El número de copias genómicas equivalentes (CGE) para cada ARN sintético fue calculado usando fórmula 2.1, y para los plásmidos la fórmula 2.2.

$$CGE = \frac{\text{Cantidad de ARN (g)} \times \text{Número de Avogadro}}{\text{Longitud del ARN} \times \text{masa promedio de bp de ARN}} \quad (2.1)$$

$$CGE = 2 \times \frac{\text{Cantidad de ADN (g)} \times \text{Número de Avogadro}}{\text{Longitud del plásmido} \times \text{masa promedio de bp de ADN}} \quad (2.2)$$

2.3 Optimización de detección de cada virus individualmente (monoplex)

Se realizaron 9 diluciones seriadas de 1:10 de cada plásmido para realizar las pruebas RT-qPCR. Las reacciones se realizaron con la TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix, en el equipo QuantStudio™ 1 Real-Time PCR System y los resultados se analizaron con el software QuantStudio™ Design and Analysis. Para calibrar las concentraciones y llegar a las condiciones óptimas de los ensayos individuales (monoplex), se empleó la dilución 2 de cada control positivo. Posteriormente se realizó una curva estándar abarcando las 9 diluciones seriadas para verificar que la optimización del ensayo se mantenía. La especificidad de cada monoplex fue evaluada colocando cada uno de los 4 controles positivos como template.

2.4 Optimización de detección de los 4 virus en conjunto (multiplex)

En la multiplex, se combinaron los iniciadores y sondas para cada virus evaluando la detección de cada control positivo en una dilución alta (dilución 5) y una baja (dilución 7), con el fin de analizar el comportamiento de las curvas. Se probaron distintas condiciones de termociclado (temperaturas y tiempo) como parámetro de optimización. También se evaluó la detección simultánea de los 4 controles positivos combinados.

2.5 Análisis de muestras de hisopado nasal

Las muestras de hisopados nasales empleadas fueron diagnosticadas previamente por PCR para Influenza A, SARS-CoV-2 o virus sincitial respiratorio. Se realizó la extracción de ARN por columnas usando el kit E.Z.N.A. ® de ARN Total I. Posteriormente con 5uL de la extracción se realizó el diagnóstico mediante la multiplex RT-qPCR desarrollada.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Análisis bioinformático

Los iniciadores y sondas cumplieron con las pautas dispuestas en las guías internacionales, tanto los que fueron escogidos directamente de las publicaciones como los que fueron modificados o propuestos en este proyecto. El análisis a partir del alineamiento múltiple de las secuencias demostró la sensibilidad de los iniciadores y sondas para detectar todas las secuencias del virus objetivo. A pesar de la variación de linajes que tiene SARS-CoV-2 y de la tendencia a mutar que tiene el virus de influenza A, los oligonucleótidos siguen anillándose sin ocasionar algún desajuste (mismatch) en secuencias actuales (desde el 2018). Por otra parte, en el análisis Blast se observó que todos oligonucleótidos se anillan al virus objetivo y a nada más, demostrando su especificidad. El análisis de interacciones entre oligonucleótidos sugirió la formación de autodímero en el iniciador reverse de influenza A, sin embargo debido a la ubicación de los nucleótidos complementarios no tiene potencial de ocasionar problemas de amplificación indeseada. El resto de los oligonucleótidos no reúne las condiciones para formar autodímeros, heterodímeros u horquillas, por tanto según el análisis *in silico* pueden ser usados en una multiplex.

3.2 Síntesis de controles positivos

Se comprobó que los fragmentos usados como controles positivos, están ligados al vector pGEM-T y son del tamaño esperado (Figura 3-1). La concentración de los plásmidos purificados fue de 7.8, 15, 23 y 18 ng/ul para Influenza A, Influenza B, VSR y SARS-CoV-2, respectivamente. El número de copias genómicas equivalentes (CGE) se detallan en la Tabla 3-1 para cada plásmido. De igual manera, se evidenció que el ARN sintético de cada control tenía un alto grado de pureza (Curva en el nanodrop) y amplificaba el tamaño esperado, por lo que pudo ser usado en las pruebas de optimización.

Para poder entrar en el rango de cuantificación del ARN se realizó una dilución de 1:50, obteniendo una concentración de ARN de 45 ng/ul para FluA, 30 ng/uL para FluB y 31.8 ng/ul para RSV.

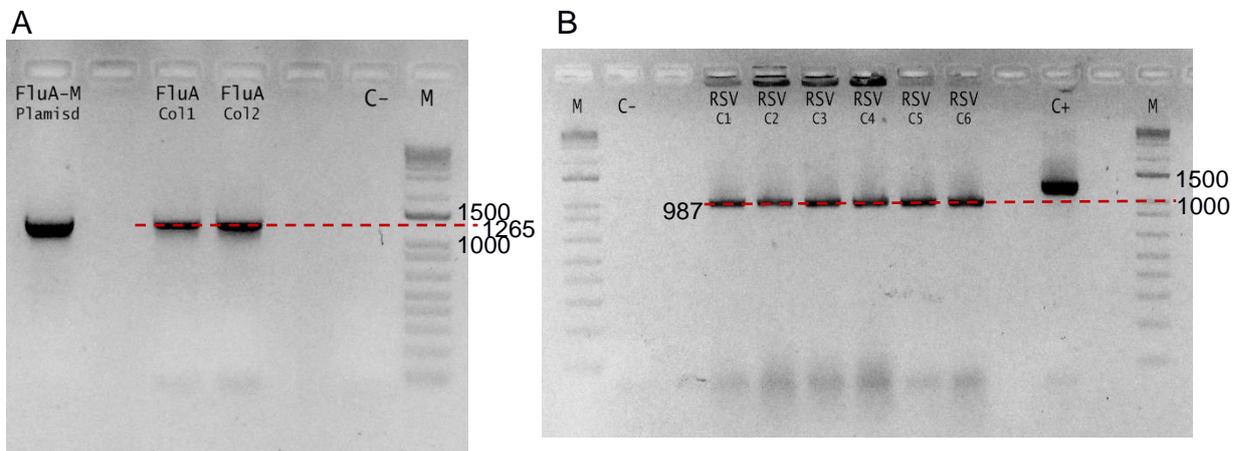


Figura 3-1: Comprobación del inserto con M13 en colonias transformadas. A: Influenza A (1265pb) y B: RSV (987 pb).

Tabla 3-1: número de copias genómicas equivalentes (CGE) de cada control positivo.

Plásmido	Concentración (ng/uL)	Longitud (bp)	CGE/ul	Diluciones (CGE/uL)								
				D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
FluA_M	7.8	4048	3516501254	351650125	35165013	3516501	351650	35165.0	3516.50	351.65	35.17	3.52
FluB_NS	15	4103	6671852244	667185224	66718522	6671852	667185	66718.5	6671.85	667.19	66.72	6.67
RSV	23	3769	11136747580	1113674758	111367476	11136748	1113675	111367.5	11136.75	1113.67	111.37	11.14
SARS-CoV-2	18	4000	8212382928	821238293	82123829	8212383	821238	82123.8	8212.38	821.24	82.12	8.21

3.3 Optimización de detección de cada virus individualmente (monoplex)

Por cada ensayo monoplex se realizó una curva estándar con las condiciones y concentraciones optimizadas. La eficiencia de la PCR fue de 90.09%, 100.4% y 109.37%, para Influenza A, Influenza B y VSR, valores que están dentro del rango de aceptación (90%-110%). En todos los ensayos individuales se pudo detectar hasta la dilución 8 (Figura 3-2), que corresponde a un orden de 10^2 GCE por reacción; sin embargo en el ensayo de Influenza A también se logró detectar la dilución 9 que contiene un orden de 10^1 GCE por reacción. Al evaluar cada monoplex con cada uno de los controles positivos no se encontró amplificaciones indeseadas, demostrando que no existe reacción cruzada con los otros virus siendo específico para el virus objetivo.

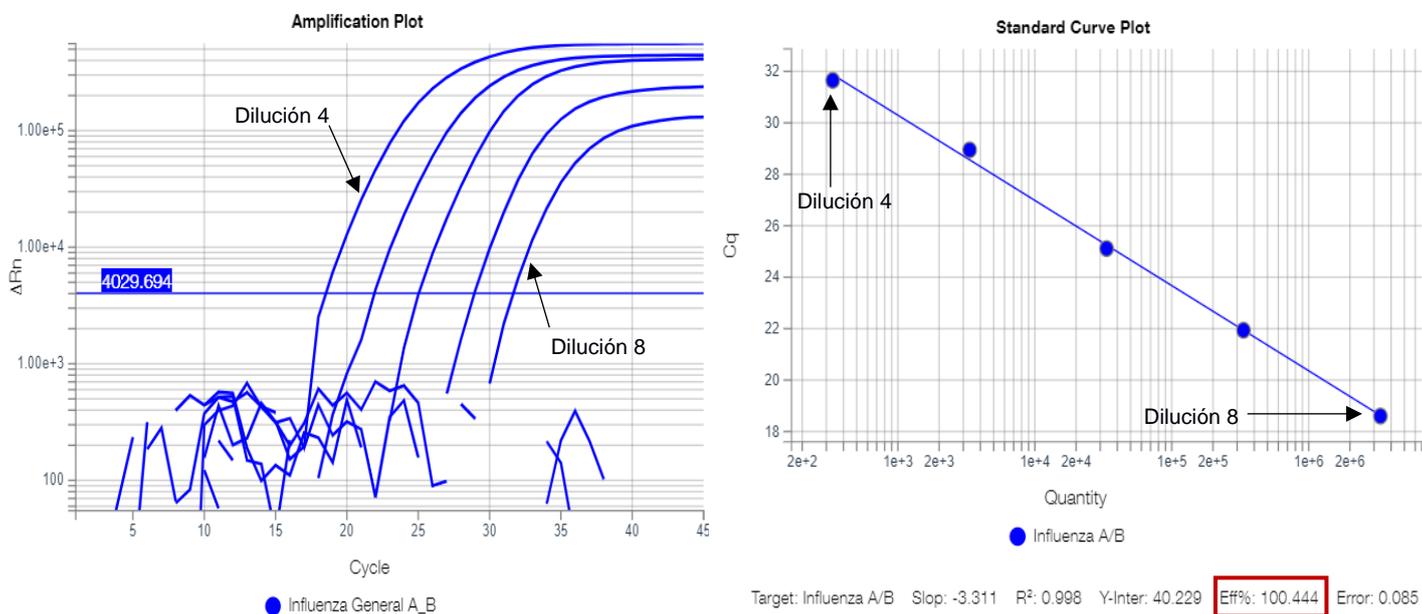


Figura 3-2: Curva estándar del ensayo monoplex de Influenza B

3.4 Optimización de detección de los 4 virus en conjunto (multiplex)

Al combinar todos los oligonucleótidos en una reacción multiplex no se observó amplificaciones indeseadas en los controles. Usando las mismas concentraciones de iniciadores y sondas que los ensayos individuales, fue posible detectar los controles positivos a diluciones altas (dilución 5) sin variación significativa de su ciclo umbral en comparación al ensayo individual (Figura 3-3). Sin embargo, a diluciones bajas (dilución 7) de los controles positivos no fue posible observar la amplificación; a excepción de Influenza B donde se observó una pequeña curva deformada (Figura 3-2 B). Este comportamiento se puede deber al agotamiento, competencia o interacciones de reactivos, por lo que se requiere optimizar la reacción. Se realizaron ensayos variando la temperatura y el tiempo de termociclado, así como también se aumentó la cantidad de enzima para optimizar la reacción. Sin embargo, no fue posible detectar diluciones bajas en la reacción multiplex.

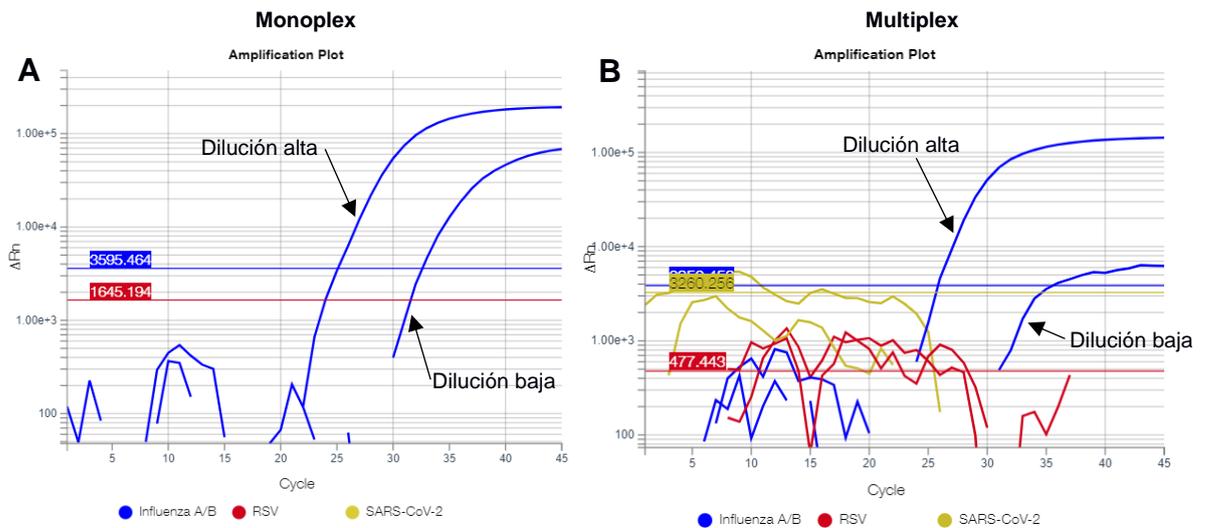


Figura 3-3: Comparación monoplex vs multiplex a dilución alta y baja de Influenza B

Al combinar los controles positivos en una reacción multiplex se visualizaron todas las curvas, demostrando que es posible amplificar simultáneamente todos objetivos virales en un solo tubo de reacción (Figura 3-4).

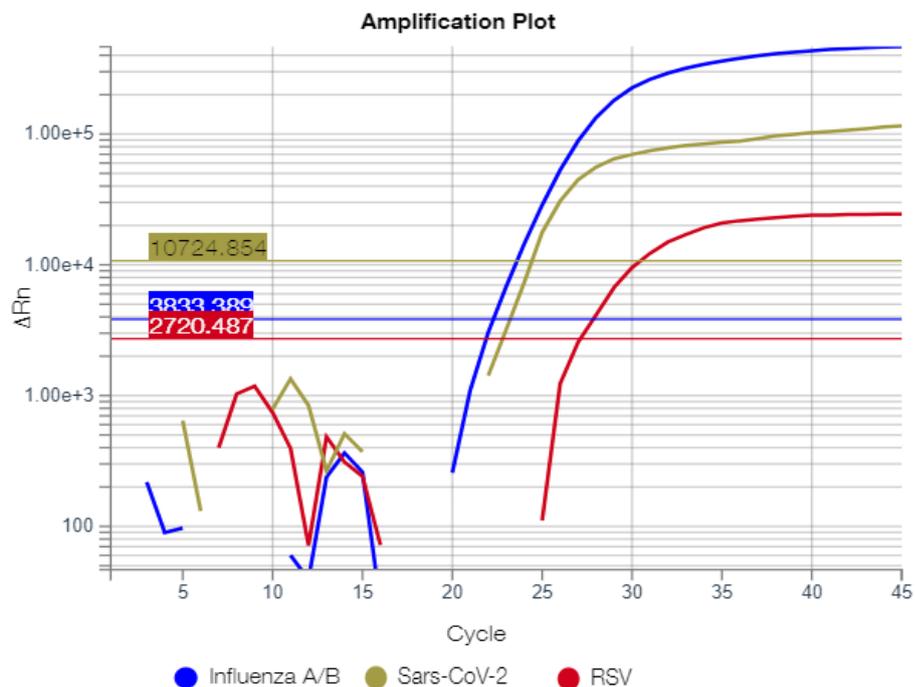


Figura 3-4: Multiplex con controles positivos de Influenza A/B, RSV y SARS-CoV-2.

3.5 Análisis de muestras de hisopado nasal

Finalmente, se evaluó el rendimiento clínico de la multiplex mediante el ARN extraído de muestras positivas. Un total de 6 muestras fueron empleadas: 2 positivas para Influenza A, 2 positivas para VSR (subtipo A y B) y 2 para SARS-CoV-2 (Ómicron y variante antes de ómicron). Los resultados coincidieron al 100% con el diagnóstico esperado para cada muestra (Figura 3-5), demostrando que el contenido de la extracción no inhibió la reacción de PCR y por tanto, es factible usar la multiplex como método diagnóstico.

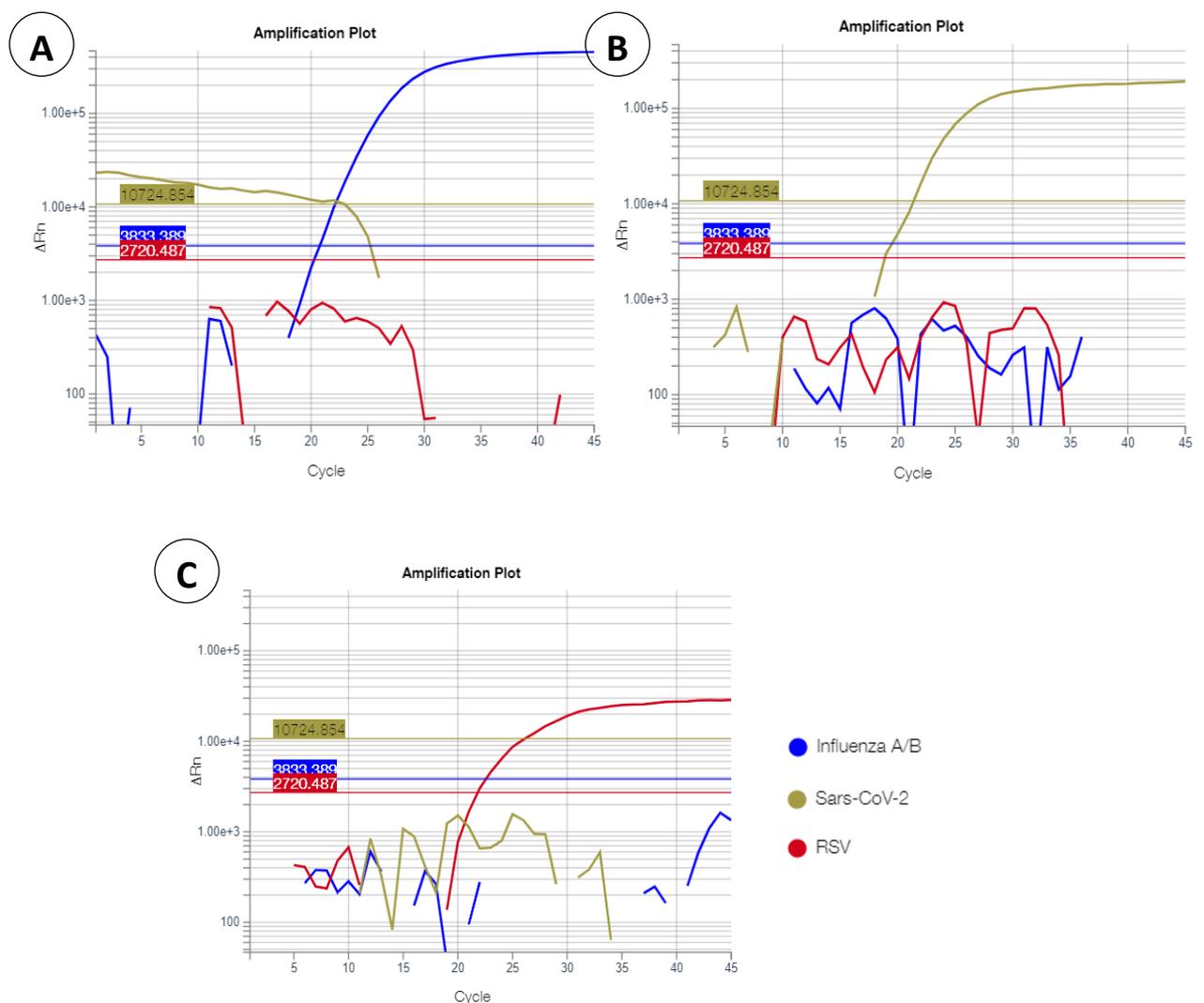


Figura 3-5: Validación en muestras clínicas previamente diagnosticadas positivas para A: Influenza A/B, B: SARS-CoV-2 , C: RSV.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. La evaluación *in silico* de los iniciadores y sondas indicó que los oligonucleótidos usados en la reacción multiplex son específicos para detectar los virus propuestos y no forman estructuras que afecten la reacción de PCR.
2. En los ensayos individuales se obtuvo una eficiencia que cumple con el criterio de aceptación (90 – 100%) dispuesto por las guías internacionales para el desarrollo de RT-qPCR.
3. La validación del ensayo multiplex con muestras clínicas corroboró analíticamente su especificidad para detectar el material genético de cada virus, demostrando su factibilidad para ser usado como método diagnóstico.

Recomendaciones

1. La detección a diluciones bajas mejora la sensibilidad del ensayo, por tanto se recomienda variar las condiciones del ensayo multiplex para aumentar la capacidad de detección. Los parámetros que pueden probarse son aumentar la concentración de magnesio, agregar un aditivo como DMSO o BSA o quitar un set de oligonucleótidos.
2. Realizar diluciones exactas son un paso crítico durante la calibración de los ensayos, por tanto se debe asegurar la correcta calibración de las pipetas y un adecuado manejo de los tubos.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvaro-Meca, A., Goez, M. del C., Resino, R., Matías, V., Sepúlveda-Crespo, D., Martínez, I., & Resino, S. (2022). Environmental factors linked to hospital admissions in young children due to acute viral lower respiratory infections: A bidirectional case-crossover study. *Environmental Research*, 212, 113319. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113319>
- Azziz-Baumgartner, E., Bruno, A., Daugherty, M., Chico, M. E., Lopez, A., Arriola, C. S., de Mora, D., Roperio, A. M., Davis, W. W., McMorro, M., & Cooper, P. J. (2022). Incidence and seasonality of respiratory viruses among medically attended children with acute respiratory infections in an Ecuador birth cohort, 2011–2014. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 16(1), 24-33. <https://doi.org/10.1111/irv.12887>
- Caini, S., de Mora, D., Olmedo, M., Portugal, D., Becerra, M. A., Mejía, M., Pacurucu, M. C., Ojeda, J., Bonaccorsi, G., Lorini, C., Paget, J., & Bruno, A. (2019). The epidemiology and severity of respiratory viral infections in a tropical country: Ecuador, 2009–2016. *Journal of Infection and Public Health*, 12(3), 357-363. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.12.003>
- Correia, W., Dorta-Guerra, R., Sanches, M., Almeida Semedo, C. de J. B., Valladares, B., de Pina-Araújo, I. I. M., & Carmelo, E. (2021). Study of the Etiology of Acute Respiratory Infections in Children Under 5 Years at the Dr. Agostinho Neto Hospital, Praia, Santiago Island, Cabo Verde. *Frontiers in Pediatrics*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2021.716351>
- Fica, A., Sotomayor, V., Fasce, R., Dabanch, J., Soto, A., Charpentier, P., Guerrero, G., Olivares, F., Triantafilo, V., El Omeiri, N., & Gaínza-Lein, M. (2019). Severe acute respiratory infections (SARI) from influenza in adult patients in Chile: The

experience of a sentinel hospital. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 43, 1-11. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.1>

Fitzner, J., Qasmieh, S., Mounts, A. W., Alexander, B., Besselaar, T., Briand, S., Brown, C., Clark, S., Dueger, E., Gross, D., Hauge, S., Hirve, S., Jorgensen, P., Katz, M. A., Mafi, A., Malik, M., McCarron, M., Meerhoff, T., Mori, Y., ... Vandemaele, K. (2018). Revision of clinical case definitions: Influenza-like illness and severe acute respiratory infection. *Bulletin of the World Health Organization*, 96(2), 122-128. <https://doi.org/10.2471/BLT.17.194514>

Grohmann, L., Barbante, A., Eriksson, R., Gatto, F., Georgieva, T., Huber, I., Hulin, J., Köppel, R., Marchesi, U., Marmin, L., Mazzara, M., Narendja, F., Owen, H., Perri, E., Scholtens, I., Sovová, T., Sowa, S., Stebih, D., Weidner, C., & Zdeňková, K. (2021, agosto 13). *Guidance document on multiplex real-time PCR methods*. JRC Publications Repository. <https://doi.org/10.2760/243914>

Heppe-Montero, M., Walter, S., Hernández-Barrera, V., Gil-Prieto, R., & Gil-de-Miguel, Á. (2022). Burden of respiratory syncytial virus-associated lower respiratory infections in children in Spain from 2012 to 2018. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 315. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07261-1>

Kozinska, A., Wegrzynska, K., Komiazyk, M., Walory, J., Wasko, I., & Baraniak, A. (2022). Viral Etiological Agent(s) of Respiratory Tract Infections in Symptomatic Individuals during the Second Wave of COVID-19 Pandemic: A Single Drive-Thru Mobile Collection Site Study. *Pathogens*, 11(4), 475. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040475>

Kumar, P., Medigeshi, G. R., Mishra, V. S., Islam, M., Randev, S., Mukherjee, A., Chaudhry, R., Kapil, A., Ram Jat, K., Lodha, R., & Kabra, S. K. (2017). Etiology of

Acute Respiratory Infections in Infants: A Prospective Birth Cohort Study. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(1), 25-30.
<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001359>

Li, Y., Wang, X., Blau, D. M., Caballero, M. T., Feikin, D. R., Gill, C. J., Madhi, S. A., Omer, S. B., Simões, E. A. F., Campbell, H., Pariente, A. B., Bardach, D., Bassat, Q., Casalegno, J.-S., Chakhunashvili, G., Crawford, N., Danilenko, D., Do, L. A. H., Echavarria, M., ... Nair, H. (2022). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10340), 2047-2064. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00478-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00478-0)

Ministerio de Salud Pública. (2022). *Infecciones respiratorias agudas graves (IRAG). Semana epidemiológica 0 a 30. Ecuador 2022*. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2022/08/IRAG-SE-30.pdf>

Naghavi, M., Abajobir, A. A., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abd-Allah, F., Abera, S. F., Aboyans, V., Adetokunboh, O., Afshin, A., Agrawal, A., Ahmadi, A., Ahmed, M. B., Aichour, A. N., Aichour, M. T. E., Aichour, I., Aiyar, S., Alahdab, F., Al-Aly, Z., Alam, K., ... Murray, C. J. L. (2017). Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, 390(10100), 1151-1210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32152-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32152-9)

Pan American Health Organization. (2014). *Operational Guidelines for Sentinel Severe Acute Respiratory Infection (SARI) Surveillance*. <https://www3.paho.org/revelaci/wp-content/uploads/2015/10/2015-cha-operational-guidelines-sentinel-sari.pdf>

- Seto, W. H., Conly, J. M., Pessoa Silva, C. L., Malik, M., & Eremin, S. (2013). *Infection prevention and control measures for acute respiratory infections in healthcare settings: An update*. S39-S47.
- Shu, B., Kirby, M. K., Davis, W. G., Warnes, C., Liddell, J., Liu, J., Wu, K.-H., Hassell, N., Benitez, A. J., Wilson, M. M., Keller, M. W., Rambo-Martin, B. L., Camara, Y., Winter, J., Kondor, R. J., Zhou, B., Spies, S., Rose, L. E., Winchell, J. M., ... Barnes, J. R. (2021). Multiplex Real-Time Reverse Transcription PCR for Influenza A Virus, Influenza B Virus, and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerging Infectious Diseases*, 27(7), 1821-1830. <https://doi.org/10.3201/eid2707.210462>
- Troeger, C., Blacker, B., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, J., Zimsen, S. R. M., Albertson, S. B., Deshpande, A., Farag, T., Abebe, Z., Adetifa, I. M. O., Adhikari, T. B., Akibu, M., Al Lami, F. H., Al-Eyadhy, A., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Amoako, Y. A., Antonio, C. A. T., ... Reiner, R. C. (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(11), 1191-1210. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30310-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30310-4)
- Trombetta, H., Faggion, H. Z., Leotte, J., Nogueira, M. B., Vidal, L. R. R., & Raboni, S. M. (2016). Human coronavirus and severe acute respiratory infection in Southern Brazil. *Pathogens and Global Health*, 110(3), 113-118. <https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1181294>
- Wang, X., Li, Y., O'Brien, K. L., Madhi, S. A., Widdowson, M.-A., Byass, P., Omer, S. B., Abbas, Q., Ali, A., Amu, A., Azziz-Baumgartner, E., Bassat, Q., Abdullah Brooks,

- W., Chaves, S. S., Chung, A., Cohen, C., Echavarria, M., Fasce, R. A., Gentile, A., ... Schweiger, B. (2020). Global burden of respiratory infections associated with seasonal influenza in children under 5 years in 2018: A systematic review and modelling study. *The Lancet Global Health*, 8(4), e497-e510. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30545-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30545-5)
- WHO. (2014). *Infection prevention and control of epidemic-and pandemic prone acute respiratory infections in health care*. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/infection-prevention-and-control-of-epidemic-and-pandemic-prone-acute-respiratory-infections-in-health-care>
- WHO. (2018, noviembre 6). *Influenza (Seasonal)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- World Health Organization. (2020). *Severe Acute Respiratory Infections Treatment Centre*. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/10665-331603>
- World Health Organization. (2022a). *End-to-end integration of SARS-CoV-2 and influenza sentinel surveillance: Revised interim guidance*. https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-2019-nCoV-Integrated_sentinel_surveillance-2022.1
- World Health Organization. (2022b, septiembre 7). *Weekly epidemiological update on COVID-19—7 September 2022*. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---7-september-2022>
- Xiu, L., Binder, R. A., Alarja, N. A., Kochev, K., Coleman, K. K., Than, S. T., Bailey, E. S., Bui, V. N., Toh, T.-H., Erdman, D. D., & Gray, G. C. (2020). A RT-PCR assay for the detection of coronaviruses from four genera. *Journal of Clinical Virology*, 128, 104391. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104391>

Zhang, N., Wang, L., Deng, X., Liang, R., Su, M., He, C., Hu, L., Su, Y., Ren, J., Yu, F., Du, L., & Jiang, S. (2020). Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 408-417. <https://doi.org/10.1002/jmv.25674>

Zimmerman, R. K., Rinaldo, C. R., Nowalk, M. P., Gk, B., Thompson, M. G., Moehling, K. K., Bullotta, A., & Wisniewski, S. (2014). Influenza and other respiratory virus infections in outpatients with medically attended acute respiratory infection during the 2011-12 influenza season. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 8(4), 397-405. <https://doi.org/10.1111/irv.12247>