BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Químicas

Diseño de una PCR multiplex para diagnosticar los principales agentes etiológicos causantes de las infecciones respiratorias agudas en México

TESIS

para obtener el título de

LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

Presenta

Julian Hernández Martínez

Directora de tesis

D.C. Nidia Gary Pazos Salazar

Asesor de tesis

QFB. Miguel Ruíz Jiménez

Puebla, Pue., noviembre 2022

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, a quienes les debo todo lo que soy, por estar siempre a mi lado apoyándome en cada decisión de mi vida. Por ser mi luz, mi camino y mi fortaleza en mis momentos de debilidad y sobre todo por todo su esfuerzo y dedicación para forjar en mi la persona que soy hoy en día.

A mis hermanos Héctor, Roberto y Ángeles por ser mis compañeros de vida, por ayudarme a crecer y madurar junto a ustedes. Gracias por sus consejos, paciencia, tiempo y apoyo.

A Liliana, Galilea, Frida, Wendy, Bryam y Alberto por demostrarme su amistad incondicional y ser mi motor de apoyo durante mi estancia universitaria, por hacer de esta etapa una de las mejores aventuras de mi vida.

A mi novia Zachery por estar siempre a mi lado, por motivarme cada día para salir adelante y por estar junto a mí apoyándome en cada uno de mis proyectos. Gracias por ser la persona que eres, sin duda te debo mucho de lo que soy.

A la Dra. Nidia Gary, mi directora de tesis, por creer y confiar en mí. Por darme la oportunidad de realizar este proyecto. Gracias por todo su apoyo y dedicación y por demostrarme que se pueden lograr grandes cosas con el simple hecho de confiar en uno mismo.

A mi comisión revisora, MC. Laura Martínez Pérez, MC. Lorena Guadalupe Cardona Fuentes y D.C. Nora Hilda Rosas Murrieta, por su apoyo en la elaboración de esta tesis.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por brindarme todas las herramientas necesarias para mi formación profesional.

A todos aquellos que en algún momento coincidimos y que dejaron una huella en mi vida… Muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS 1

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS 4

RESUMEN 7

MARCO TEÓRICO 8

1. Definición y clasificación de las infecciones respiratorias agudas (IRAs) 8
2. Panorama epidemiológico de las IRAs 9
3. Principales patógenos responsables de las IRAs en México 10
4. Características taxonómicas y morfológicas de los principales patógenos respiratorios en México 13
   - 4.1 Agentes virales 13
   - 4.2 Agentes bacterianos 15
5. Diagnóstico de las IRAs 16
   - 5.1 Métodos convencionales 16
   - 5.2 Métodos Moleculares 18
6. Rentabilidad de las pruebas utilizadas en el diagnóstico de las IRAs. 19
7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 20
   - 7.1 Fundamento de la PCR 20
   - 7.2 Componentes esenciales de la PCR 21
   - 7.3 Etapas del ciclo de amplificación de la PCR 24
   - 7.4 Variantes de PCR 26
8. Alineamiento de secuencias 27

MARCO DE REFERENCIA 30

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 39

JUSTIFICACIÓN 40

HIPÓTESIS 41

OBJETIVOS 41
MATERIALES Y METODOLOGÍA 44
Materiales 44
Metodología 44
Diagrama general de trabajo 48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 49
Identificación de los principales patógenos responsables de las IRAs en México 49
Elección de los biomarcadores 50
Elección del control positivo de la técnica 58
Elección de bases de datos y alineamiento de las secuencias 58
Diseño de primers 63
Análisis de dímeros y estructuras secundarias de los primers 65
Verificación de la especificidad de los primers en BLAST 66
Diseño del control positivo 69
Protocolo de la PCR multiplex 73
Kit de extracción del material genético 74
Optimización de la PCR multiplex 78
Evaluación de la sensibilidad de la PCR multiplex 80
Comparación entre PCR multiplex de tiempo real y de punto final 81
CONCLUSIONES 84
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 85
ANEXO 1 AMPLIFICADOS 113
ANEXO II ALINEAMIENTOS 119

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Veinte principales causas de enfermedad nacional por fuente de notificación. Estados Unidos Mexicanos 2021 10
Tabla 2. Principales patógenos causantes de las IRAs en México 12
Tabla 3. Diseño óptimo de primers 23
Tabla 4. Diagnóstico de los virus de la influenza A y B 30
Tabla 5. Biomarcadores seleccionados para el diseño de primers 51
Tabla 6. Características fisicoquímicas de los primers diseñados para la PCR multiplex 63
Tabla 7. Enzimas de restricción y sitios de corte añadidos a los primers 70
Tabla 8. Mezcla de reacción propuesta para la PCR multiplex 75
Tabla 9. Propuesta de preparación del mix de primers 76
Tabla 10. Protocolo de amplificación la PCR multiplex en el termociclador 76
Tabla 11. Comparación entre la dosis infectiva 50 de los patógenos respiratorios y la sensibilidad de la PCR 81

Figura 1. Anatomía general del aparato respiratorio. 8
Figura 2. Secuencia de amplificación de la PCR 20
Figura 3. Alineamiento del gen L2 del adenovirus en la plataforma Clustal Omega 45
Figura 4. Vector de clonación pJET1.2 47
Figura 5. Alineamiento de la secuencia del gen L2 del adenovirus 60
Figura 6. Alineamiento de la secuencia de la región 5'UTR del rinovirus 61
Figura 7. Alineamiento de la secuencia del gen L del virus de la parainfluenza humana 1-3. 62
Figura 8. Análisis de dímeros y estructuras secundarias de los primers 66
Figura 9. Verificación de la especificidad del primer sentido del adenovirus 67
Figura 10. Verificación de la especificidad del primers sentido del rinovirus 68
Figura 11. Verificación de la especificidad del primers antisentido del rinovirus. 68
Figura 12. Perfil de restricción de los biomarcadores 69
Figura 13. Constructo generado a partir del ligado de los amplicones de cada patógeno respiratorio. 71
Figura 14. Diseño del control positivo de la prueba y de la técnica 72

Figura 15. Kit LunaScript Multiplex One-Step RT-PCR. 74
Figura 16. Marcador de peso molecular 50 pb Mini Ladder Fisher Scientific..... 77
Figura 17. Representación gráfica del corrimiento electroforético de la PCR multiplex 77
Figura 18. Amplicón con sitios de restricción del gen L2 del adenovirus 113
Figura 19. Amplicón con sitios de restricción del gen HBB de la subunidad beta de la hemoglobina humana..... 113
Figura 20. Amplicón con sitios de restricción del gen M del SARS-CoV-2 113
Figura 21. Amplicón con sitios de restricción del gen M del virus de la influenza A 114
Figura 22. Amplicón con sitios de restricción del gen mpn372 de *Mycoplasma pneumoniae* 114
Figura 23. Amplicón con sitios de restricción del gen F del metapneumovirus humano 114
Figura 24. Amplicón con sitios de restricción del gen hdp de *Haemophilus influenzae*..... 115
Figura 25. Amplicón con sitios de restricción del gen spy1258 de *Streptococcus pyogenes* 115
Figura 26. Amplicón con sitios de restricción del gen M del virus de la influenza B 115
Figura 27. Amplicón con sitios de restricción de la región 5´UTR del rinovirus 116
Figura 28. Amplicón con sitios de restricción de la región 5'UTR del enterovirus D68 116
Figura 29. Amplicón con sitios de restricción del gen lytA de *Streptococcus pneumoniae* ..116
Figura 30. Amplicón con sitios de restricción del gen N del virus sincitial respiratorio 117
Figura 31. Amplicón con sitios de restricción del gen L del virus de la parainfluenza humana 1-3..... 117
Figura 32. Amplicón con sitios de restricción del gen L del virus de la parainfluenza humana 2 117
Figura 33. Amplicón con sitios de restricción del gen L del virus de la parainfluenza humana 4 118
Figura 34. Alineamiento de la secuencia del gen M del virus de la influenza A. 119
Figura 35. Alineamiento de la secuencia del gen mpn372 de *Mycoplasma pneumoniae.* 120
Figura 36. Alineamiento de la secuencia del gen F del metapneumovirus humano 121
Figura 37. Alineamiento de la secuencia del gen hpd de *Haemophilus influenzae* 121
Figura 38. Alineamiento de la secuencia del gen spy1258 de *Streptococcus pyogenes* 122
Figura 39. Alineamiento de la secuencia del gen M del virus de la influenza B. 124
Figura 40. Alineamiento de la secuencia de la región 5'UTR del enterovirus D68..... 124

Figura 41. Alineamiento de la secuencia del gen lytA de *Streptococcus pneumoniae* 125
Figura 42. Alineamiento de la secuencia del gen N del virus sincitial respiratorio. 126
Figura 43. Alineamiento de la secuencia del gen L del virus de la parainfluenza humana 2.128
Figura 44. Alineamiento de la secuencia del gen L del virus de la parainfluenza humana 4.128
Figura 45. Alineamiento de la secuencia del gen M de SARS-CoV-2. 129
Figura 46. Alineamiento de la secuencia del gen HBB de la subunidad beta de la hemoglobina humana. 130

RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) se consideran el principal motivo de consulta médica en México y el mundo, en algunos casos pueden comprometer la salud de las personas, especialmente cuando se trata de pacientes pediátricos y adultos mayores.

La etiología de las IRAs incluye una amplia variedad de virus y bacterias. Uno de los grandes retos en el diagnóstico actual es identificar específica y oportunamente el agente causal, por ello en el presente trabajo se planteó el diseño de una PCR multiplex capaz de diagnosticar a los principales agentes etiológicos de las IRAs en nuestro país.

Para lograr esto, se hizo uso de herramientas bioinformáticas y bases de datos disponibles que permitieron trabajar con las secuencias de los agentes etiológicos seleccionados. Inicialmente se identificaron biomarcadores para cada uno de los patógenos con base a la bibliografía reportada, se hizo una búsqueda y selección de las secuencias de trabajo en la base de datos del *NCBI* y de la plataforma *GISAID*, y se llevaron a cabo alineamientos múltiples en el programa *Clustal Omega* para identificar regiones conservadas, posteriormente se utilizaron los programas *Oligo Analizer* y *Oligo Explorer* para diseñar primers universales capaces de identificar las regiones seleccionadas anteriormente. Con el fin de ajustar los primers a una reacción simultánea y diferenciar los segmentos en una electroforesis en gel de agarosa, estos se diseñaron para generar amplicones con una diferencia mínima de 20 pb entre cada uno de ellos y con una Tm de entre 56°C y 58°C. A continuación, los primers se analizaron en la plataforma BLAST en donde se aseguró un alineamiento específico con las secuencias de interés y no con secuencias que pudieran interferir con la especificidad de la prueba molecular.

Se diseñó un plásmido recombinante designado como control positivo en el programa *SnapGene*, para ello se utilizó el vector de clonación pJET1.2 al cual le fueron insertadas las secuencias de los segmentos identificados por los primers, así como el gen de la subunidad beta de la hemoglobina humana (secuencia de referencia NCBI: NG_059281.1).

Además, se establecieron los tiempos de amplificación y los reactivos necesarios para la PCR multiplex utilizando el kit comercial *LunaScript® Multiplex One-Step RT-PCR* de *New England Biolabs*®. Finalmente se llevó a cabo una simulación de una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en *SnapGene*, en donde se visualizaron los amplicones generados por la PCR multiplex.

MARCO TEÓRICO

1. Definición y clasificación de las infecciones respiratorias agudas (IRAs)

Las infecciones respiratorias agudas son enfermedades transmisibles del aparato respiratorio que presentan una evolución clínica menor a 15 días en la mayoría de los casos y cuya afección puede ir desde los oídos, nariz y garganta, hasta las estructuras más internas que conforman a los pulmones. Su etiología es multivariable, pudiendo ser de origen viral o bacteriano o bien, una coinfección entre ambos (Ferreira *et al.*, 2013; Secretaría de Salud, 2015). El espectro de afecciones que causan estas enfermedades va desde infecciones asintomáticas o leves hasta cuadros más graves y fatales, dependiendo en gran medida del patógeno responsable, así como de factores ambientales y del propio huésped (Secretaría de Salud, 2012).

Las IRAs se clasifican en infecciones del tracto respiratorio superior (ITRS) e infecciones del tracto respiratorio inferior (ITRI); las ITRS afectan la nariz, los senos nasales, la faringe, la laringe, el oído medio y las vías respiratorias grandes (Thomas & Bomar, 2020), por lo que las afecciones más comunes son la nasofaringitis (resfriado común), sinusitis, faringitis, amigdalitis, laringitis y epiglotitis (Jang & Chun, 2021). Por otro lado, las ITRI afectan la tráquea, bronquios, bronquiolos y alvéolos (Simoes *et al*., 2006), causando cuadros clínicos que van desde una bronquitis aguda hasta enfermedades más graves como la influenza y la neumonía (Polat & Yucel, 2021; Walter & Wunderink, 2018). La Figura 1 muestra la división anatómica del sistema respiratorio humano.

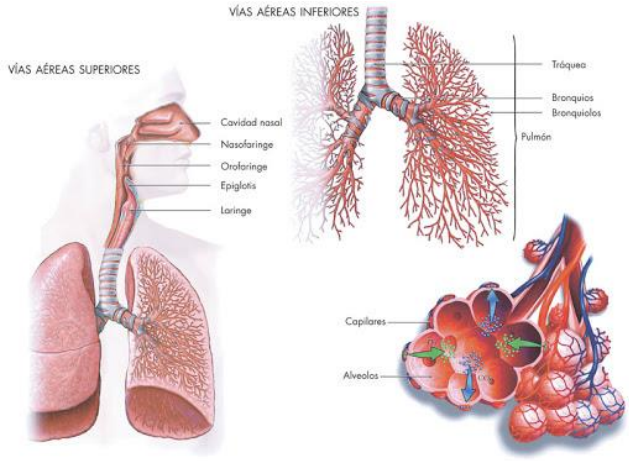


Figura 1. *Anatomía general del aparato respiratorio humano.* Se pueden observar las estructuras anatómicas básicas que conforman el tracto respiratorio superior e inferior. Tomado de *Enciclopedia de Conocimientos Fundamentales UNAM-siglo XXI* (p. 520), por Escamilla *et al*., 2010, UNAM.

2. Panorama epidemiológico de las IRAs

Las IRAs son las enfermedades más comunes en todos los seres humanos (Widhidewi *et al*., 2020). Se encuentran entre las tres primeras causas de morbimortalidad en la población general, y son la primera causa de mortalidad en menores de cinco años en países en vías de desarrollo (Chirinos *et al*., 2021). Las infecciones de las vías respiratorias altas son las de mayor frecuencia. Sin embargo, las infecciones de las vías respiratorias inferiores, son una de las principales causas de muerte en el mundo, con más de 4 millones al año (Foro de las Sociedades Internacionales de Enfermedades Respiratorias, 2017).

Se estima que en el mundo la influenza provoca entre 3 y 5 millones de casos de enfermedad grave y entre 290 000 y 650 000 muertes (World Health Organization, 2018). La actual pandemia de COVID-19 causada por el SARS-CoV-2 ha dejado hasta el momento un total de 628 184 448 de personas infectadas alrededor del mundo y un saldo de 6 580 107 de fallecimientos por dicha causa (Johns Hopkins University, 2022. Consultado el 25 de octubre del 2022).

De acuerdo con los reportes de la Secretaría de Salud en México en el año 2021, las IRAs representaron la primera causa de enfermedad notificada en todo el territorio mexicano, con un total de 10 477 481 casos registrados mediante el Sistema Único de Información para Vigilancia Epidemiológica (SUIVE). La COVID-19 fue la cuarta causa de enfermedad con 2 526 649 casos, mientras que la influenza (213 666 casos), las faringitis y amigdalitis estreptocócicas (138 184 casos) y las neumonías y bronconeumonías (127 194 casos) se ubicaron en los lugares 14, 16 y 18 respectivamente (Secretaría de Salud, 2021). En la Tabla 1 se presentan las veinte principales causas de enfermedad registradas durante el 2021en la población mexicana.

En cuanto a la mortalidad de las enfermedades respiratorias, en la nota técnica sobre las características de las defunciones registradas en el año 2020 del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) se observó que dentro de las 10 principales causas de muerte, la COVID-19 se ubicó como la segunda causa con 200 256 muertes, mientras que la influenza y neumonía ocuparon el lugar número 5 con 58 038 defunciones (INEGI, 2021).

Tabla 1. *Veinte principales causas de enfermedad nacional por fuente de notificación. Estados Unidos Mexicanos 2021*

Número	Padecimiento	Código de la lista detallada CIE10a. Revisión	Fuente de notificación									TOTAL
			SSA	IMSS Ord	ISSSTE	IMSS Bienest.	DIF	PEMEX	SEDENA	SEMAR	OTRAS	
1	Infecciones respiratorias agudas*	J00-J06, J20, J21 excepto J02.0 y J03.0	3 056 232	3 045 896	481 464	603 082	169 299	43 427	41 843	17051	3019 177	10 477 481
2	Infecciones de vías urinarias	N30, N34, N39.0	901 323	1 024 515	159 407	215 197	21 471	19 640	16 382	5 987	523 092	2 886 014
3	Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas	A04, A08-A09 excepto A08.0	681 775	720 007	158 261	116 437	48 870	13 463	17 701	6 109	1 063 112	2 825 735
4	COVID-19	U07.1, U07.2	1 189 745	1 131 759	60 981	17 622	264	11 678	10 370	3 894	100 336	2 526 649
5	Úlceras, gastritis y duodenitis	K25-K29	285 941	213 036	60 223	57 462	7 878	2 532	5 878	1 995	236 230	871 175
6	Gingivitis y enfermedad periodontal	K05	182 327	245 350	33 774	40 540	3 083	5 209	1 556	1 805	66 886	580 530
7	Hipertensión arterial	I10-I15	115 364	185 245	75 473	13 345	2 707	2 033	7 524	2 618	91 684	495 993
8	Obesidad	E66	103 419	250 502	39 989	19 069	1 464	1 810	5 314	2 303	65 851	489 731
9	Vulvovaginitis	N76	232 537	68 139	15 169	76 623	1 637	358	2 999	463	76 929	474 854
10	Conjuntivitis	H10	92 398	188 008	26 789	20 111	4092	4 148	4 382	1 326	114 062	455 316
11	Diabetes mellitus no insulinodependiente (Tipo II)	E11-E14	110 598	133 473	74 864	12 205	1 986	1 490	5 739	2 146	60 472	402 973
12	Otitis media aguda	H65.0-H65.1	126 809	4 7894	26 503	29 027	8 006	852	2 406	1 219	202 010	401 626
13	Intoxicación por picadura de alacrán	T63.2, X22	194 642	32 644	3 115	25 516	73	87	206	100	7 881	264 264
14	Influenza	J09-J11	174 444	15 649	883	72	3	86	19	158	22 352	213 666
15	Insuficiencia venosa periférica	I87.2	21 224	83 387	13 286	3 130	560	583	2 777	362	27 982	153 291
16	Faringitis y amigdalitis estreptocócicas	J02.0-J03.0	51 866	3 918	6 316	4 200	3 473	18	1 112	1 367	65 914	138 184
17	Accidentes de transporte en vehículos con motor	V20-V29, V40-V79	52 390	3 358	3 914	4 911	72	333	482	136	63 695	129 291
18	Neumonías y bronconeumonías	J12-J18 excepto J18.2, J13 Y J14	46 058	38 910	14 843	2 477	319	403	2 150	1 086	20 948	127 194
19	Candidiasis urogenital	B37.3-B37.4	44 690	12 113	4 799	36 994	1 263	150	864	100	17 116	118 089
20	Amebiasis intestinal	A06.0-A06.3, A06.9	42 125	22 848	6 679	19 295	2 224	148	491	203	19 182	113 195
	Total 20 principales causas		7 705 907	7 423 551	1 266 732	1 316 325	278 744	108 448	130 195	50 428	5 864 921	24 145 251
	Otras causas		625 311	390 425	101 460	66 791	7 760	7 350	11 806	4 134	219 500	1 434 537
	Total Global		8 331 218	7 813 976	1 368 192	1 383 116	286 504	115 798	142 001	54 562	6 084 421	25 579 788

Nota. * De acuerdo con la Secretaría de Salud, dentro de la lista de afecciones clínicas que se engloban dentro de las IRAs, se encuentran la rinofaringitis, sinusitis, faringitis, amigdalitis, laringitis, traqueítis, epiglotitis, laringotraqueobronquitis, bronquitis y bronquiolitis. Es importante aclarar que si bien la COVID-19, la influenza, las faringitis y amigdalitis estreptocócicas y las neumonías y bronconeumonías se ubican por separado dentro de la lista, estas afecciones clínicas también forman parte de las IRAs. Modificado de *20 principales causas de enfermedad nacional por fuente de notificación*, por Secretaría de Salud, 2021, https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2021/principales/nacional/institución.pdf

Durante el primer semestre del 2021, la COVID-19 fue la primera causa de muerte en el país con 145 159 defunciones, superando a las muertes ocasionadas por las enfermedades del corazón, mientras que la influenza y neumonía se ubicaron en el quinto lugar con 20 956 fallecimientos (INEGI, 2022). Hasta el día de hoy se han confirmado 7 082 545 casos y 330 048 defunciones por COVID-19 en nuestro país (Secretaría de Salud, 2022, Consultado 27 de septiembre de 2022).

3. Principales patógenos responsables de las IRAs en México

Del 80% al 90% de las IRAs son causadas por agentes virales (Chirinos *et al.*, 2021; Núñez & Landires, 2021). Los virus de mayor frecuencia son: los virus de la influenza A y B, el virus

sincitial respiratorio A y B, los virus de la parainfluenza humana tipos 1-4, el adenovirus, los rinovirus, los enterovirus, el metapneumovirus humano y los coronavirus (Assane *et al*., 2018; Das *et al*., 2018). En general las ITRS son causadas por virus, con algunas notables excepciones causadas por bacterias específicas como *Streptococcus pyogenes* (Murdoch *et al*., 2020). Atendiendo a la presentación clínica, la etiología de las ITRI puede ser de origen bacteriano o viral. (Polat & Yucel, 2021). Los virus son los responsables de la mayoría de los casos de bronquitis y bronquiolitis. Por otra parte, la neumonía, que es la forma más grave de las ITRI es causada comúnmente por bacterias (Guzek *et al*., 2014). En la neumonía adquirida en la comunidad (NAC), *Streptococcus pneumoniae* es el principal responsable, seguido de *Haemophilus influenzae* (European Respiratory Society, 2013; World Health Organization, 2019). El patógeno atípico más común es *Mycoplasma pneumoniae*, seguido de *Chlamydia pneumoniae* y *Legionella pneumophila* (Mandell, 2015).

En México existe escasa información sobre la epidemiología en que se presentan estos agentes infecciosos. Se han realizado diversos estudios para evaluar la incidencia de virus respiratorios en diferentes poblaciones de nuestro país. A pesar de que su tasa de aparición varía dependiendo la edad y la época del año, se ha observado que los virus de mayor frecuencia son el virus sincitial respiratorio y el rinovirus, seguidos de los virus de la influenza A y B, enterovirus, virus de la parainfluenza humana, adenovirus y metapneumovirus humano, mientras que los bocavirus y coronavirus (a excepción del SARS-CoV-2) son los agentes virales menos identificados (Fernandes *et al.*, 2017; Ojeda *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2017).

Por otro lado, la información respecto a la incidencia de las bacterias respiratorias es aún más limitada. Por ejemplo, en las cifras emitidas por la Secretaría de Salud sobre los casos y muertes ocasionadas por neumonía (enfermedad causada principalmente por bacterias) solo se realiza un registro general sin especificar el agente etiológico, además de acuerdo con datos de los boletines epidemiológicos sobre las enfermedades de notificación inmediata, desde el 2020 hasta lo que va de este año solo se había reportado un caso de infección por *S. pneumoniae* mientras que de *H. influenzae* no se tiene reporte, lo cual puede obedecer al subregistro ocasionado por la pandemia de COVID-19. Los datos anteriores contrastan con los datos emitidos por el Instituto Nacional de Salud Pública, en los cuales durante el 2018 se registraron 29 casos de neumonía asociada a *H. influenzae* y 91 casos asociados a *S. pneumoniae*. Para el

año 2019, solo se tomó en cuenta la incidencia de neumonía por *S. pneumoniae* con 129 casos (Instituto Nacional de Salud Pública, 2018-2019; Consultado el 14 de julio del 2021). Cabe recalcar que estos datos no obedecen a un registro nacional, si no a un estudio llevado a cabo en ciertas instituciones de salud de la República Mexicana.

Respecto a *M. pneumoniae* en México no existe información oficial que documente la implicación de esta bacteria en la NAC, sin embargo en los últimos años ha tomado relevancia debido a la alta frecuencia en aislamientos de pacientes pediátricos y su implicación en la aparición de complicaciones de la salud (Merida *et al.*, 2017; Merida *et al.*, 2019). En cuanto *S. pyogenes*, se ha visto que este patógeno es el responsable de las faringitis y amigdalitis estreptocócicas, infecciones ubicadas dentro de las 20 principales enfermedades en México (Secretaría de Salud, 2021).

En la Tabla 2 se muestran los agentes etiológicos de mayor frecuencia en nuestro país, de acuerdo con estudios y boletines epidemiológicos consultados.

Tabla 2. *Principales patógenos causantes de las IRAs en México*

Agente Etiológico	Frecuencia (%)	Referencia bibliográfica
Virus sincitial respiratorio	17.4 - 33.5	(Fernandes *et al*., 2017; Galindo *et al.*, 2013; Moreno *et al.*, 2015; Ojeda *et al.*, 2016; Ortiz *et al.*, 2019; Wong *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2017)
Rinovirus	17.5 - 33.0	
Virus de la influenza A	2.9 – 13.3	
Virus de la influenza B	0.7 – 10.7	
Virus de la parainfluenza humana (1-4)	3.5 - 14.4	
Metapneumovirus humano	3.5 - 10.6	
Adenovirus	2.2 - 9.6	
Enterovirus D68	5.8 -5.9	
SARS-CoV-2	7 082 545*	(Secretaría de Salud, 2022)
Streptococcus pneumoniae	129*	(Instituto Nacional de Salud Pública, 2019)
Haemophilus influenzae	29*	(Instituto Nacional de Salud Pública, 2018)
Mycoplasma pneumoniae	1.2-26.6	(Galindo *et al.*, 2013; Merida *et al.*, 2019)
Streptococcus pyogenes	163 595*	(Secretaría de Salud, 2021)

Nota. *No se dispone de la frecuencia de estos agentes, en su lugar se colocan las cifras registradas en los boletines e informes epidemiológicos de la Secretaría de Salud y el Instituto Nacional de Salud Pública.

4. Características taxonómicas y morfológicas de los principales patógenos respiratorios en México

4.1 Agentes virales

- Virus de la influenza A y B

Los virus de la influenza A y B son los miembros más importantes de la familia de los *Orthomyxoviridae*. Son virus pleomórficos, esféricos, de 80 a 120 nm con un genoma viral de ARN de cadena sencilla de polaridad negativa. Los virus de la influenza A y B causan una enfermedad significativa en los seres humanos. Se considera que el virus de la influenza A es una zoonosis y es clasificado en diferentes subtipos por sus variaciones en la hemaglutinina y neuraminidasa (Murray *et al*., 2017; Romero & Feregrino, 2014).

- Adenovirus

Los adenovirus (AdV) son virus de ADN bicatenario con un genoma compuesto por unos 36000 pares de bases cuyo tamaño es suficiente para codificar entre 30 y 40 genes. Pertenecen a la familia *Adenoviridae* y se han identificado aproximadamente 100 serotipos, de los cuales 52 son capaces de infectar al ser humano. Estos serotipos han sido agrupados en siete especies (A-G) (Murray *et al*., 2017; Romero & Feregrino, 2014).

- Virus sincitial respiratorio

El virus sincitial respiratorio (VSR) pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, al género *Pneumovirus,* es un virus pleomórfico de 150 a 300 nm y su genoma es de ARN monocatenario de sentido negativo (Murray *et al*., 2017; Romero & Feregrino, 2014). Sobre la base de las diferencias en la antigenicidad y el análisis de las secuencias de nucleótidos, las cepas del VSR se han clasificado en dos subgrupos antigénicos principales, denominados VSR-A y VSR-B. (Do *et al*., 2012)

- Virus de la parainfluenza humana

Los virus de la parainfluenza humana (HPIV) se agrupan en la familia *Paramyxoviridae,* son virus esféricos o pleomórficos, de 160 a 300 nm, su genoma es de ARN de cadena sencilla con polaridad negativa. Existen cuatro especies patógenas para el ser humano; HPIV 1-4 (Murray *et al*., 2017; Romero & Feregrino, 2014). HPIV-1 y HPIV-3 son miembros del género *Respirovirus*

mientras que HPIV-2 y HPIV-4 pertenecen al género *Orthorubulavirus* (Branche & Falsey, 2016). Actualmente el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) ha designado al HPVI-1 y HPVI-3 con los nombres de *Respirovirus humano 1* y *3*, mientras que HPVI-2 y HPVI-4 ahora son nombrados como *Ortorubulavirus humano 2* y *4*.

- Metapneumovirus humano

El metapneumovirus humano (MPVH) pertenece a la familia *Paramyxoviridae*. Es un virus de ARN monocatenario, no segmentado y de polaridad negativa, con un tamaño que oscila entre 150 y 600 nm. El MPVH se ha dividido en dos genotipos principales, A y B (Murray *et al*., 2017; Romero & Feregrino, 2014; Williams & Shafagati, 2018).

- SARS-CoV-2

Los coronavirus pertenecen a la familia *Coronaviridae*, son virus esféricos de 60 a 200 nm y presentan un genoma de ARN de cadena simple y polaridad positiva (Murray *et al*., 2017; Romero & Feregrino, 2014). Se conocen hasta ahora cuatro géneros y se distinguen por el huésped al que infectan*; Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Deltacoronavirus y Gammacoronavirus*. El SARS-CoV-2 pertenece al género de los *Betacoronavirus* (Aguilar *et al.*, 2020).

- Rinovirus

Los rinovirus (RV) pertenecen a la familia *Picornaviridae* y al género *Enterovirus*, son virus de tamaño pequeño con un genoma de ARN de una sola cadena y de polaridad positiva. Los RV abarcan por lo menos 100 serotipos y constituyen la principal causa de resfriado común (Murray *et al*., 2017; Romero & Feregrino, 2014). Los avances recientes han llevado a la caracterización de los serotipos existentes en tres especies de RV genéticamente distintas, denominadas por las letras A, B y C (Jacobs *et al*., 2013).

- Enterovirus

Los enterovirus (EV) pertenecen al género *Enterovirus* dentro de la familia *Picornaviridae*, son un género de virus de ARN monocatenario de cadena positiva. Sobre la base de las características antigénicas y genéticas se han descrito 4 especies de EV (A, B, C, D), más específicamente EV-A, -B, -C y -D, tienen 25, 63, 23, y 5 serotipos diferentes (Andrés *et al*.,

2019; Murray *et al*., 2017; Nikolaidis *et al*., 2019; Romero & Feregrino, 2014). Ciertos tipos de enterovirus, en particular el enterovirus D68, se ha asociado con brotes de enfermedades respiratorias graves en Europa y América del Norte, lo que ocasionalmente ha resultado en una morbilidad y mortalidad significativa (Harvala *et al*., 2018).

4.2 Agentes bacterianos

- *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae pertenece al género *Streptococcus* de la familia *Streptococcaceae*. Es un coco gram positivo, encapsulado, agrupado en pares o cadenas cortas. Las células tienen un diámetro de 0.5 a 1.2 μm. Esta bacteria es inmóvil, anaerobia facultativa, produce α-hemólisis y crece formando colonias redondas con un elevamiento en el centro (Murray *et al*., 2017; Romero & Feregrino, 2014).

- *Haemophilus influenzae*

H. influenzae es una bacteria en forma de bacilo o cocobacilo gram negativa, microaerofílica que puede ser aerobia o anaerobia. Esta bacteria ha sido clasificada en dos grupos principales basados en la presencia o ausencia de la cápsula. Las cepas capsuladas se han dividido en seis serotipos antigénicos (a-f) mientras que las cepas no capsuladas se incluyen en el grupo de *H. influenzae* no tipificable. Esta bacteria requiere de los factores X (Hemina) y V (Nucleótido de nicotinamida y adenida) para crecer en los medios de cultivo (Murray *et al*., 2017; Romero & Feregrino, 2014).

- *Mycoplasma pneumoniae*

M. pneumoniae pertenece al género *Mycoplasma,* de la clase *Mollicutes.* Es una bacteria pleomórfica, aerobia estricta, que carece de pared celular y que, por lo tanto, no entra dentro de la clasificación de Gram. Su tamaño es de aproximadamente 1 μm de longitud y 0.1-0.2 μm de ancho, lo que la ubica como la bacteria más pequeña (Merida *et al.*, 2017; Murray *et al*., 2017; Romero & Feregrino, 2014).

- *Streptococcus pyogenes*

Las cepas de *S. pyogenes* pertenecen al Género *Streptococcus* y pertenecen al grupo A de la clasificación de Lancefield. Son cocos esféricos de diámetro comprendido entre 1 y 2 μm que

forman cadenas cortas en las muestras clínicas y cadenas de mayor longitud cuando crecen en medios de cultivo. Su crecimiento es óptimo en el medio agar sangre enriquecido. Después de 24 horas de incubación se observan colonias blancas de 1 a 2 mm con grandes zonas de B-hemólisis (Murray *et al*., 2017).

5. Diagnóstico de las IRAs

La presentación clínica inespecífica de las infecciones respiratorias plantea un desafío considerable para el diagnóstico diferencial de patógenos. Actualmente existe una amplia gama de métodos de diagnóstico para la identificación de los agentes causantes de estas infecciones, sin embargo, varios de ellos presentan desventajas en cuanto a la rapidez, sensibilidad y especificidad de los resultados. Por ello, resulta importante la búsqueda e implementación de nuevos métodos que garanticen resultados rápidos y confiables que permitan la instauración de una terapia adecuada para el paciente y con ello se reduzca el número de complicaciones y muertes derivado de estas infecciones.

5.1 Métodos convencionales

- Cultivo bacteriano y celular.

Durante décadas el cultivo celular se consideró el estándar de oro para la detección de virus respiratorios (Virus de la influenza A y B, VSR, AdV, HPIV) mediante la observación del efecto citopático. Este método es ventajoso para aislar una amplia variedad de virus, incluyendo aquellos que son nuevos o desconocidos, sin embargo, toma días e incluso semanas en obtenerse un resultado, ya que después del aislamiento hay que aplicar métodos serológicos o moleculares para identificar al virus. Se han hecho modificaciones a esta técnica, como el cultivo en Shell-vial, el cual ha incrementado la sensibilidad del método (73 % - 87 %) y ha reducido los tiempos de respuesta a 24 horas, pero a pesar de estas ventajas existen virus respiratorios como los coronavirus y rinovirus que son difíciles de cultivar y por lo tanto presenta una gran variabilidad en la obtención de los resultados (Das *et al*., 2018; Murdoch *et al*., 2020).

El cultivo bacteriano se considera una herramienta fundamental para los laboratorios de diagnóstico microbiológico (Murdoch *et al*., 2020). Sin embargo, su sensibilidad se ve reducida cuando la muestra ha sido tomada después de la instauración de la terapia antibiótica o no se ha realizado un correcto cribado con la tinción de Gram, además, el cultivo bacteriano requiere mucha mano de obra, experiencia técnica y sobre todo los tiempos de respuesta pueden ser muy

largos (48 a 96 horas), lo que lo convierte en algunos casos en un método inadecuado para una terapia médica óptima (Das *et al*., 2018).

- Ensayos serológicos
    I. Pruebas de detección de antígenos

Ensayos de anticuerpos fluorescentes directos (DFA) y ensayos de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA).

Estas pruebas se basan en la detección de antígenos mediante el uso de anticuerpos fluorescentes. Se consideran métodos rápidos y confiables para detectar infecciones respiratorias virales (Das *et al*., 2018). No requieren virus viables y los tiempos de entrega son cortos (<4 horas), sin embargo presentan varias desventajas ya que son muy laboriosos, requieren de una persona calificada, necesitan un microscopio de fluorescencia y puede existir errores de lectura, sin olvidar que sus valores de especificidad y sensibilidad aunque suelen ser altos, son muy variables para cada patógeno y están sujetos a la calidad de la muestra (Charlton *et al*., 2019).

Técnicas de detección rápida de antígenos (Inmunoensayos rápidos).

Proporcionan resultados de la prueba en menos de 30 minutos y generalmente se utilizan en entornos fuera de un laboratorio. La ventaja de estas pruebas es que se pueden realizar por operadores sin formación y sin experiencia en el laboratorio y son relativamente económicos. Actualmente están dirigidos para el diagnóstico de los virus de la influenza A y B y el VSR y de manera más reciente para el diagnóstico de *S. pneumoniae* y *L. pneumophila*. Su uso ha sido muy controversial debido a los niveles bajos de sensibilidad, ya que se ha demostrado que varían en cuanto al tipo de paciente, muestra y la época del año en que se apliquen para el diagnóstico (Charlton *et al*., 2019; Das *et al*., 2018; Murdoch *et al*., 2020).

II. Pruebas de detección de anticuerpos.

Estas pruebas permiten detectar los anticuerpos contra la mayoría de los virus respiratorios, no obstante, presentan una menor sensibilidad respecto a otros métodos de diagnóstico y sobre todo en la identificación de bacterias respiratorias donde se puede dar el caso de reacciones cruzadas, además requieren el uso de sueros de pacientes en la etapa aguda de la enfermedad o en estado

convaleciente y su relevancia es limitada en aquellas infecciones respiratorias causadas por patógenos frecuentes (Das *et al*., 2018; Murdoch *et al*., 2020).

5.2 Métodos Moleculares

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos se han convertido en el estándar de referencia en el diagnóstico viral y actualmente han hecho lo mismo para el diagnóstico bacteriano, lo cual representa un enorme avance en la medicina respiratoria. Mas recientemente, los diagnósticos moleculares han jugado un papel esencial en la respuesta de salud global a la pandemia del nuevo SARS-CoV-2 causante de la ya tan conocida COVID-19 (Hanson *et al*., 2020).

Cada vez son más los estudios de la literatura biomédica que describen la utilidad de los métodos moleculares sobre los métodos de detección convencionales de virus respiratorios en términos de su sensibilidad y especificidad (Budnik *et al*., 2016).

Se ha informado que las pruebas moleculares presentan un mayor rendimiento diagnóstico, y una especificidad (80 % - 100 %) y sensibilidad (82 % - 100 %), considerablemente más altas en comparación con los métodos de diagnóstico convencionales. Existe una amplia gama de pruebas moleculares en la actualidad, la elección de una u otra debe tener en cuenta diversos factores antes de ser implementadas en el laboratorio como lo es el tipo de población al que va dirigida, el tamaño del laboratorio, el propósito de las pruebas (atención de rutina o urgente) y la relación costo / beneficio (Das *et al*., 2018).

Debido al tiempo de respuesta rápida, a la detección simultánea de una variedad de patógenos y a la sensibilidad superior de los ensayos moleculares, se ha logrado una disminución de la duración del paciente en la estancia hospitalaria, se ha reducido el número de pruebas de diagnóstico utilizadas y se ha permitido un acortamiento en la duración de la administración de antibióticos intravenosos cuando no son necesarios (Ling *et al*., 2018). Además, existe la posibilidad de que las pruebas moleculares permitan la rápida implementación de una cohorte para evitar la transmisión nosocomial de estos patógenos potencialmente pandémicos (Marimón & Navarro, 2017).

Actualmente existen diferentes pruebas moleculares basadas en la detección de ácidos nucleicos, estas se han desarrollado a lo largo de estos últimos años y se han utilizado en el diagnóstico microbiológico. Dentro de estas pruebas se encuentran los ensayos por

microarreglos (Ma *et al.*, 2020; XH *et al*., 2015), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Zhang *et al.*, 2015), la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA) (Guinocchio, 2016; Xing *et al.*, 2020), la hibridación de ácidos nucleicos usando northern blot o southern blot (Modrow *et al*., 2013) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siendo esta última la técnica molecular más empleada en el diagnóstico de las enfermedades respiratorias. La PCR normalmente está diseñada para la identificación y amplificación de secuencias conservadas dentro del genoma de los agentes infecciosos (Kabir, 2018), lo cual permite la identificación de un amplio número de microrganismos que presentan variaciones genéticas aun dentro del mismo género o especie.

6. Rentabilidad de las pruebas utilizadas en el diagnóstico de las IRAs.

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos se han convertido en la actualidad en el estándar de oro del diagnóstico virológico, y de manera más reciente lo están haciendo en el diagnóstico bacteriológico (Hanson *et al*., 2020). Se han realizado diversos estudios sobre la confiabilidad de las pruebas rápidas de antígenos, sobre todo aquellas dirigidas al diagnóstico de influenza por ser las más utilizadas. Se ha encontrado que los límites de detección por lo general son más bajos que las pruebas de detección de ácidos nucleicos y por lo tanto la sensibilidad es menor, además su aplicación no resulta ser óptima a la hora de la identificación de las diferentes cepas circulantes de la influenza (Sakai *et al*., 2010). Debido a su baja sensibilidad, los CDC recomiendan que las muestras que dan un resultado negativo a influenza, se confirmen con un método más sensible como la RT-PCR (Green & George, 2018). Para el diagnóstico viral de las infecciones respiratorias, las pruebas moleculares resultan ser más sensibles que el cultivo celular y más específicos que los ensayos de inmunofluorescencia e inmunocromatografía (Somerville *et al*., 2015).

De lo anterior, resulta importante mencionar que cuando se lleva a cabo un análisis de rentabilidad de las pruebas utilizadas para el diagnóstico clínico, se deben tomar en cuenta el costo de los reactivos e instrumentos, los costos de mano de obra que implica realizar el estudio, así como la confiabilidad de los resultados obtenidos. Una prueba rápida de antígenos con menor sensibilidad y especificidad similar, en comparación con una prueba molecular, puede ser menos rentable a pesar de los menores costos de reactivos, equipo y mano de obra. Es por ello que las pruebas moleculares se han convertido en el método de referencia para el

diagnóstico de infecciones por virus respiratorios, ya que demuestran una sensibilidad superior sin pérdida de especificidad, en comparación con las pruebas rápidas de antígenos (Pinsky & Hayden, 2019). Por lo tanto la implementación de las pruebas moleculares permiten reducir la incertidumbre del diagnóstico, orientar decisiones de manejo tempranas así como reducir el uso de medicamentos potencialmente innecesarios (Hanson *et al*., 2020).

7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

De todos los avances tecnológicos de la biología molecular, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas más usadas debido a que es lo suficientemente sensible como para amplificar el ADN de una sola célula y obtener cantidades suficientes para un análisis o diagnóstico. La PCR fue desarrollada por Kary Mullis en 1983. La idea surgió mientras él viajaba en su auto. Mullis recordó haber imaginado una PCR tan clara como si estuviera una pizarra dentro de su cabeza, en ese momento se detuvo y comenzó a realizar sus bosquejos. Diez años después recibió el premio nobel de química (Clark *et al*., 2019).

7.1 Fundamento de la PCR

El principio de la PCR consiste en obtener, mediante replicación in vitro, múltiples copias de una región de interés a partir de una plantilla de ADN. La PCR se divide en tres fases: una fase de desnaturalización, una fase de alineamiento con primers y una fase de elongación (Figura 2). Los productos de cada ciclo de síntesis sirven como plantilla para las siguientes etapas, por lo que se logra una amplificación exponencial (Ghannam & Varacallo, 2021; Kadri, 2019).

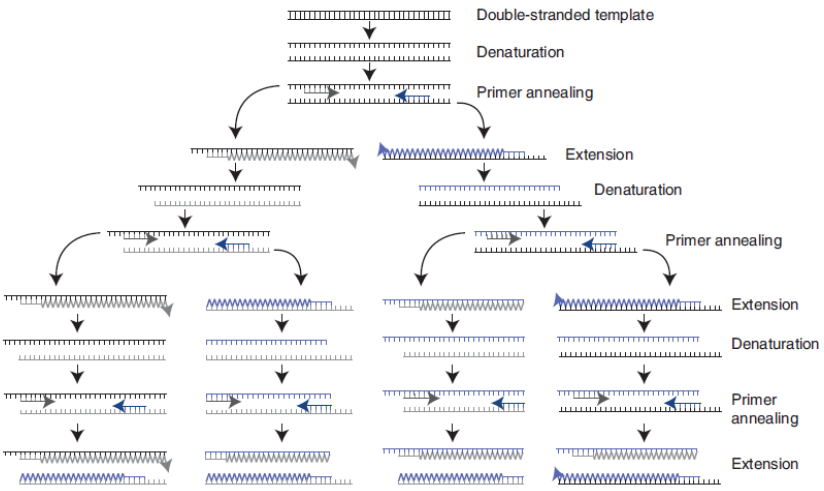


Figura 2. *Secuencia de amplificación de la PCR*. El diagrama muestra los pasos de las primeras rondas de la PCR. El molde original (arriba) es ADN de doble cadena, y los primers de la izquierda y la derecha se muestran como ← y →,

respectivamente. Los productos de las primeras rondas de la reacción de amplificación son de tamaño heterogéneo; sin embargo, el tramo de ADN situado entre los dos primers se amplifica preferentemente y se convierte rápidamente en el producto dominante de la reacción de amplificación. Tomado de: *Molecular Cloning* (p. 445) por Green y Sambrook, 2019, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

7.2 Componentes esenciales de la PCR

ADN polimerasa

Durante la fase de elongación es necesaria una ADN polimerasa termoestable para catalizar la síntesis de ADN. Actualmente existe una amplia gama de enzimas que varían en cuanto a su fidelidad, eficiencia, capacidad de sintetizar productos de ADN de gran tamaño y objetivo del experimento. Para las PCR rutinarias, la *Taq polimerasa* (0,5 - 2,5 unidades por reacción estándar de 25 µL – 50 µL), aislada originalmente de *Thermus aquaticus (Taq)*, sigue siendo la enzima más utilizada. Hasta hace poco, la elección de una enzima u otra implicaban a menudo un compromiso por parte del investigador. Sin embargo, las mezclas de dos o más ADN polimerasas han aumentado significativamente el rendimiento y mejorado la amplificación, en particular de los ADN objetivo más largos. Esta mejora se debe a la capacidad de una enzima para complementar la incapacidad de otra para extender un primer a través de posibles obstrucciones en la cadena molde. Varios fabricantes venden ahora cócteles de polimerasas termoestables que permiten reunir las características deseables en una mezcla de reacción. Por ejemplo, los cócteles de las polimerasas *Thermus brockianus* (*Tbr*) y *Taq* (que se venden bajo el nombre comercial de *DyNAzyme*) muestran una alta fidelidad debido a la función correctora de *Tbr* y a la alta eficiencia característica de *Taq*. Del mismo modo, una mezcla de *Taq* y polimerasas de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) (por ejemplo, el sistema de PCR *Expand Long Template* de Roche) genera altos rendimientos de objetivos largos de hasta 35 kb (Green & Sambrook, 2019).

Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)

La ADN polimerasa necesita un suministro de nucleótidos, o bloques de construcción de ADN, para hacer las nuevas copias de ADN. Éstos se suministran en forma de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) (Clark *et al*., 2019). La PCR estándar contiene cantidades equimolares de dATP, dTTP, dCTP y dGTP. Se recomiendan concentraciones de 200-250 µM de cada dNTP para la *Taq polimerasa* en reacciones que contengan 1,5 mM de $MgCl_2$, en una reacción de 50 µL (Green & Sambrook, 2019).

Cationes divalentes

Todas las ADN polimerasas termoestables requieren cationes divalentes libres, normalmente Mg^{2+}, para su actividad. Los iones de magnesio tienen dos funciones en la PCR: reaccionar con los dNTPs para formar complejos que son los sustratos de la *Taq polimerasa,* y estabilizar los complejos primer-plantilla. Cuando la concentración de Mg^{2+} es demasiado baja, los primers se unen de forma ineficaz al ADN molde. Cuando la concentración de Mg^{2+} es demasiado alta, el emparejamiento de bases se estabiliza hasta tal punto que los dúplex formados durante la amplificación se desnaturalizan de forma ineficaz por el calentamiento. Habitualmente se utiliza una concentración de 1,5 mM de Mg^{2+} y se ha observado que aumentar la concentración de Mg^{2+} a 4,5 mM o 6 mM disminuye el cebado inespecífico en algunos casos (Green & Sambrook, 2019).

Tampón para mantener el pH

El Tris-Cl, ajustado a un pH entre 8,3 y 8,8 a temperatura ambiente, se incluye en las PCR estándar en una concentración tan baja como 10 mM o tan alta como 66 mM. Cuando se incuba a 72˚C (la temperatura comúnmente utilizada para la fase de extensión de la PCR), el pH de la mezcla de reacción desciende más de una unidad completa, produciendo un tampón cuyo pH es de ~7,2 (Green & Sambrook, 2019).

Cationes monovalentes

El tampón de PCR estándar contiene 50 mM de KCl y funciona bien para la amplificación de segmentos de ADN de más de 500 pb de longitud. Aumentar la concentración de KCl a ~70 mM - 100 mM suele mejorar el rendimiento de los segmentos de ADN más cortos (Green & Sambrook, 2019).

ADN molde

El ADN molde que contiene las secuencias objetivo puede añadirse a la PCR en forma monocatenaria o bicatenaria. El ADN molde se debe extraer de la muestra, por lo tanto, es importante elegir un método de extracción que asegure la integridad del ácido nucleico con un adecuado rendimiento, y determinar su concentración previo a la PCR para preparar adecuadamente la reacción de amplificación (Green & Sambrook, 2019).

Primers u oligonucleótidos

Los primers son fragmentos cortos de ADN monocatenario complementarios a las secuencias de ambos extremos del ADN objetivo. El diseño de los primers es una etapa fundamental para el correcto funcionamiento de la PCR, siendo la especificidad una de las características más importantes que deben cumplir, ya que de esto depende el éxito o fracaso de la técnica. Las reacciones estándar contienen cantidades no limitadas de primers, normalmente 0,1 µM - 0,5 µM de cada oligonucleótido (0.6-3.0 × 10^{13} moléculas). Esta cantidad es suficiente para al menos treinta ciclos de amplificación de un segmento de ADN de 1 kb. Actualmente existen una gran variedad de programas informáticos disponibles en distintas fuentes de Internet para ayudar en el diseño de los primers (Clark *et al*., 2019).

La utilización de estos programas permite ahorrar tiempo y minimizar los problemas, ya que optimizan el diseño y la selección de los primers además existen otros softwares que buscan en las secuencias sitios de cebado que se ajusten a un conjunto de parámetros definidos por el usuario y que estén libres de posibles horquillas, autodímeros y otras estructuras problemáticas (Green & Sambrook, 2019).

La Tabla 3 muestra las características recomendadas para el diseño de los primers con el fin de lograr una correcta optimización y funcionamiento de la PCR.

Tabla 3. *Diseño óptimo de primers*

Propiedad	Diseño óptimo
Composición de la base	El contenido de G + C debe estar entre el 40% y el 60%, con una distribución uniforme de las cuatro bases a lo largo del primer. Si es posible, se deben evitar secuencias ricas en GC ya que son propensas a formar estructuras secundarias.
Longitud	Los primers deben tener una longitud de 18 a 30 nucleótidos. Los miembros de un par de primers no deben diferir en longitud en más de tres bases. Los primers de longitud inferior a 18 nucleótidos tienden a unirse de forma inespecífica mientras que los primers de más de 30 nucleótidos tienen una mayor probabilidad de formar estructuras secundarias.
Estructuras repetidas internamente y autocomplementarias	Se debe asegurar que los primers no contengan secuencias repetidas invertidas ni secuencias autocomplementarias de más de 3 pb de longitud. Las secuencias de este tipo tienden a formar estructuras de horquilla que pueden suprimir la unión del primer a su secuencia objetivo.

Continuación

Propiedad	Diseño óptimo
Complementariedad entre miembros de un par de primers	Las secuencias 3′-terminales de un primer no deberían poder unirse a ningún sitio del otro primer. Una débil complementariedad entre primers puede causar la formación de híbridos y la consiguiente amplificación de dímeros que pueden competir por la ADN polimerasa y los dNTPs. La formación de estas moléculas puede reducirse mediante el diseño cuidadoso de los primers y el uso de un programa informático como, por ejemplo, *Oligo Analyzer*. La formación de dímeros de primers también puede suprimirse mediante el uso de la PCR de inicio en caliente y/o mediante el uso de polimerasas de ADN especialmente formuladas (por ejemplo, AmpliTaq Gold; Applied Biosystems). Si todo esto falla, se puede añadir formamida o dimetilsulfóxido a la mezcla de PCR y reoptimizar la concentración de Mg^{2+} en la PCR estableciendo una serie de PCR de prueba que contengan diferentes cantidades del catión divalente.
Cebado inespecífico	Las secuencias objetivo deben buscarse utilizando, por ejemplo, BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para encontrar homología cruzada con los primers. Un falso cebado en sitios de homología cruzada aumenta el nivel de amplificación inespecífica.
Temperatura de fusión (Tm)	La Tm óptima del dúplex formado entre un primer y su diana está entre 55°C y 60°C. Las Tm de los primers en una PCR no deben diferir en más de 2-3 °C. La mayoría de los programas informáticos para el diseño de primers utilizan la teoría termodinámica basada en la ecuación Nearest Neighbor (NN). Una aproximación de primer orden de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos con > 25 bases puede calcularse a partir de la regla de Wallace: $Tm = 2°C\ (A + T) + 4°C\ (G + C)$, Donde A, T, G, y C es el número de apariciones de cada nucleótido en cada primer.
Extremo 3’	La presencia de bases G o C dentro de las últimas cinco bases del extremo 3′ de los primers ayuda a promover la unión firme del extremo 3′ de la secuencia objetivo debido a la mayor unión de hidrógeno de las bases G y C. La eficacia y la especificidad de los primers aumentan si el residuo terminal 3′ es G. Deben evitarse más de tres G o C en las últimas cinco bases del extremo 3′ del primer.

Modificado de Poyimerase Chain Reaction, en *Molecular Cloning*, por Green y Sambrook, 2019, p. 438.

7.3 Etapas del ciclo de amplificación de la PCR

Desnaturalización. En la desnaturalización la muestra de ADN de doble cadena se convierte a ADN de cadena simple mediante el calentamiento a una temperatura aproximada de 95ºC. El calor rompe los enlaces de hidrógeno que mantienen unidas las dos bases complementarias. La desnaturalización estándar dura entre 15 y 30 segundos. En el primer ciclo de la PCR, la

desnaturalización inicial se realiza a veces durante 5 minutos para aumentar la probabilidad de que las moléculas largas de ADN molde se desnaturalicen completamente. Cuanto mayor sea la proporción de G + C y más largas sean las moléculas, mayor serán la temperatura y tiempo necesarios para separar las hebras del ADN molde (Clark *et al.*, 2019; Green & Sambrook, 2019).

Alineamiento. En este segundo paso, la temperatura se reduce a unos 60°C, lo que permite que los primers se unan a las secuencias complementarias de la muestra de ADN mediante la formación de puentes de hidrógenos entre las bases. Esta temperatura se mantiene durante aproximadamente 15 - 60 segundos, dependiendo de la longitud del primer (Clark *et al*., 2019).

El alineamiento suele realizarse a 3˚C - 5˚C por debajo de la temperatura de fusión (Tm) calculada. Existen muchas fórmulas para determinar la temperatura de fusión teórica, pero ninguna de ellas es precisa para los primers, es por ello que se recomienda optimizar las condiciones de alineamiento realizando una serie de PCR de prueba a temperaturas que oscilen entre 2˚C y 10˚C por debajo de la Tm (Green & Sambrook, 2019).

Elongación o extensión. En esta última etapa, la temperatura se incrementa hasta alcanzar la temperatura óptima (normalmente a 72°C) para el tipo de ADN polimerasa termoestable utilizada en el experimento (generalmente *Taq polimerasa*). A esta temperatura, la ADN polimerasa utiliza el conjunto de nucleótidos para elongar el primer, obteniéndose así una nueva cadena de ADN complementaria. Esta síntesis de ADN va en dirección 5´a 3´ya que la ADN polimerasa añade el nucleótido complementario en el grupo 3´-OH del primer (Clark *et al.*, 2019; Kadri, 2019). Como regla general, el tiempo utilizado en la elongación es de 1 minuto por cada 1000 pares de bases del producto. Para el último ciclo de la PCR, se utiliza un tiempo de extensión tres veces mayor que el de los ciclos anteriores para permitir que se completen todos los fragmentos amplificados (Green & Sambrook, 2019).

Número de ciclos. El número de ciclos necesarios para la amplificación depende del número de copias de ADN molde presentes al principio de la reacción y de la eficacia de la extensión y amplificación del primer. La reacción típica de PCR generalmente tiene alrededor de 25 -30 ciclos. (Clark *et al.*, 2019; Green & Sambrook, 2019; Kadri, 2019)

Actualmente existen numerosas variantes de la PCR utilizadas con distintos fines, sin embargo, en el diagnóstico de las infecciones respiratorias las más utilizadas se describen a continuación.

7.4 Variantes de PCR

- ***PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR)***

La RT-PCR permite que el ARN sirva como material de partida para la PCR. Esta variante es importante para el diagnóstico de las IRAs dado el número de virus de ARN implicados en estas infecciones. En la RT-PCR, se utiliza una transcriptasa inversa para sintetizar ADN complementario a partir de ARN aislado (Walter & Wunderink, 2018), al igual que otras polimerasas de ADN, la transcriptasa inversa no puede sintetizar ADN sin un primer de ADN (Clark *et al.*, 2019). A continuación, el ADN complementario se somete al proceso de amplificación de la PCR, tal como se ha descrito anteriormente, ya sea en el mismo tubo o como parte de un proceso de dos pasos (Walter & Wunderink, 2018).

- ***PCR en tiempo real (qPCR)***

La qPCR permite determinar la cantidad relativa del ADN diana o RNA en una muestra mediante el control de la cantidad de ADN que se amplifica en cada ciclo de la PCR (Clark *et al.*, 2019). Este objetivo se consigue mediante el uso de sondas marcadas con moléculas fluorescentes que se unen al ADN y cuya intensidad de señal refleja la cantidad de ADN amplificado cuando se expone a una fuente de energía. La tecnología de PCR cuantitativa puede aplicarse a la PCR tradicional, RT-PCR o PCR multiplex (Walter & Wunderink, 2018).

Hay dos tipos principales de fluoróforos utilizados en la qPCR: los que se unen específicamente a una secuencia diana determinada y los que no. En el primer caso tenemos sondas de hibridación como las sondas TaqMan® que contienen una molécula reportera en el extremo 5' y una molécula apagadora en el extremo 3'. La molécula apagadora inhibe eficazmente la fluorescencia del reportero mientras la sonda está intacta. Sin embargo, al entrar en contacto con la ADN polimerasa, la sonda de hibridación se escinde, permitiendo la medición de la fluorescencia (Ghannam & Varacallo, 2021). En el segundo caso tenemos al compuesto SYBR Green que emite luz cuando se une al ADN objetivo de doble cadena a medida que se va sintetizando durante la elongación (Clark *et al.*, 2019).

- ***PCR multiplex***

La PCR multiplex es una variante de PCR que se utiliza cuando se amplifican simultáneamente N secuencias objetivo en una PCR que contiene N pares de primers, donde N> 1. Actualmente la PCR múltiplex se utiliza para una variedad de propósitos, uno de los cuales y de los más importantes es para el cribado e identificación de múltiples patógenos bacterianos y virales en muestras patológicas (Green & Sambrook, 2019).

Una vez que ha sido optimizada para el propósito para el cual fue diseñada, la PCR múltiplex puede ahorrar tiempo y dinero. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la optimización puede ser una tarea muy larga y frustrante, especialmente cuando el número de secuencias objetivo deseadas es grande por lo que se debe tener mucho cuidado en el diseño de todos los pares de primers, debiendo cumplir con todos los siguientes puntos:

- Tener aproximadamente la misma temperatura de fusión (Tm) (No mayor a 2°C)
- Especificidad para su loci objetivo
- No deben mostrar una homología significativa entre ellos mismos o entre sí
- Deben generar productos amplificados que tengan aproximadamente el mismo tamaño pero que puedan distinguirse entre sí mediante electroforesis en gel. Este último punto aplica cuando la PCR multiplex es de punto final

Si bien son muchas las variables que pueden afectar a la eficacia y especificidad de la PCR múltiplex, una optimización sistemática de cada componente y de cada paso de la reacción es la clave del éxito en el diseño de esta prueba molecular (Green & Sambrook, 2019). Se han descrito varios protocolos que son de ayuda para evitar y diagnosticar problemas que suelen ocurrir en esta técnica, entre ellos se encuentra el descrito por Markoulatos *et al.* (2002), donde se establecen algunos consejos sobre la configuración y optimización de la PCR multiplex.

8. Alineamiento de secuencias

El análisis de secuencias es un término que representa de forma global el análisis computacional de una secuencia de ADN, ARN o péptidos, para extraer conocimientos sobre sus propiedades, función biológica, estructura y evolución. La alineación de secuencias es el proceso de comparación y detección de similitudes entre secuencias biológicas. Las "similitudes" que se detecten dependerán de los objetivos del proceso de alineación en cuestión. La alineación de

secuencias parece ser extremadamente útil en una serie de aplicaciones bioinformáticas como la construcción de árboles evolutivos o la búsqueda de secuencias conservadas (Prjibelski *et al.*, 2019).

Se conocen dos métodos de alineación de secuencias, la alineación de secuencias por pares (ASP) y la alineación de secuencias múltiples (ASM). En la ASP se analizan dos secuencias a la vez, mientras que en la ASM se alinean múltiples (más de dos) secuencias relacionadas. En este contexto, la ASM es más ventajosa que la ASP, ya que considera a varios miembros de una familia de secuencias y, por lo tanto, proporciona más información biológica (Chowdhury & Garai, 2017).

A su vez, el alineamiento de secuencias se divide en dos: El alineamiento global y el alineamiento local. El primero infiere que las dos secuencias a alinear son generalmente similares en toda su longitud. El alineamiento se lleva a cabo desde el principio y hasta el final de ambas secuencias para encontrar el mejor alineamiento posible en toda la longitud entre las dos secuencias. El alineamiento local, por otra parte, no supone que las dos secuencias en cuestión sean similares en toda su longitud y por ello se utiliza cuando existe una gran diferencia en las longitudes de las secuencias a comparar. De hecho, sólo determina las regiones con el mayor nivel de similitud entre las dos secuencias y alinea sólo estas regiones sin tener en cuenta la alineación del resto de las secuencias. (Prjibelski *et al*., 2019).

La mayoría de los ASM utilizan alineamientos globales, sin embargo, pueden surgir problemas cuando las secuencias son homólogas solo en ciertas regiones y no en toda su extensión. En tal caso, la alineación local se puede utilizar para reconocer las regiones homólogas dentro de las secuencias (Chowdhury & Garai, 2017).

Actualmente existe un gran número de programas utilizados para llevar a cabo alineamientos de secuencias. Entre ellos se encuentra Clustal Omega. Este es un programa utilizado para realizar alineaciones múltiples rápidas y precisas de un número potencialmente grande de secuencias de proteínas, ADN o ARN, mediante el uso del algoritmo mBed para calcular árboles-guía (Sievers & Higgins, 2020).

En un estudio realizado por Sievers *et al.,* (2011) se demostró que Clustal Omega es claramente más preciso que los métodos rápidos más utilizados y comparable en precisión a algunos de los métodos de alineamiento lentos intensivos.

Este programa se encuentra actualmente en línea en https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/, donde puede ser utilizado de manera gratuita y se pueden alinear hasta 4000 secuencias.

Sin duda, la herramienta de alineación de secuencias más popular en bioinformática es el algoritmo BLAST y sus variaciones, como BLASTN y MegaBLAST. Se utilizan varias modificaciones de los algoritmos BLAST para alinear secuencias de aminoácidos con secuencias nucleicas (tblastn) y viceversa (blastx). BLAST se utiliza ampliamente en el sitio web del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para buscar secuencias en varias bases de datos, como las secuencias de ARNr 16s y la colección de nucleótidos (todos los genomas ensamblados). Además de los algoritmos de la familia BLAST, en los últimos 20 años se han desarrollado múltiples métodos de alineación para diversos objetivos (Prjibelski *et al.*, 2019).

MARCO DE REFERENCIA

Actualmente existe una amplia gama de métodos dirigidos al diagnóstico de patógenos respiratorios, entre estos se incluyen pruebas de detección de antígenos y anticuerpos, cultivos celulares y bacterianos y pruebas moleculares como la PCR. En los siguientes párrafos se presenta un resumen de los principales ensayos empleados para el diagnóstico e identificación de los virus y bacterias respiratorias seleccionados en este proyecto.

- Diagnóstico de los virus de la influenza A y B

La identificación del virus de la influenza A y B incluye pruebas de diagnóstico rápido, ensayos de inmunofluorescencia, cultivos celulares y RT-PCR (Center for disease control and prevention, 2020a). La Tabla 4 resume las principales características de estos métodos.

Tabla 4. *Diagnóstico de los virus de la influenza A y B*

Método de diagnóstico	Diana	Tiempo de respuesta	Sensibilidad / Especificidad
Pruebas de diagnóstico rápido	Antígenos	15 minutos	Baja a moderada / Alta
Ensayos de inmunofluorescencia (FDA/IFA)	Antígenos	1-4 horas	Moderada/Alta
Cultivo celular rápido (Shell vial)	Virus viable	1-3 días	Baja a moderada / Alta
Cultivo celular convencional	Virus viable	3 a 10 días	
RT-PCR	ARN viral	1-8 horas (Varía según el ensayo)	Alta / Alta

Modificado de Influenza Signs and Symptoms and the Role of Laboratory Diagnostics, por Center for Disease, Control and Prevention, 2020, https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/table-testing-methods.htm

Actualmente las pruebas moleculares de PCR diseñadas para la identificación y diferenciación de los virus de la influenza A y B se basan en la amplificación de regiones del gen *M* (matriz) por ser una secuencia conservada en ambos virus (World Health Organization, 2021; Yang *et al.*, 2014).

- Diagnóstico del virus sincitial respiratorio

Las dos pruebas de laboratorio más utilizadas en el diagnóstico del VSR, son las pruebas rápidas de detección de antígenos, que son muy sensibles en niños pero no en adultos, y la qRT-PCR

que es más sensible que el cultivo y la prueba de antígenos (Center for disease control and prevention, 2020b). En un estudio realizado por Chartrand *et al.* (2015), en el cual se realizó una extensa revisión para evaluar las precisión de las pruebas rápidas de antígeno para VSR, se encontró que en general estos ensayos presentaron una especificidad y sensibilidad de 80 % y 97 % respectivamente, sin embargo la sensibilidad fue mayor en los niños (81 %) que en adultos (29 %). Por otro lado, las sensibilidades reportadas para DFA, cultivo celular y RT-PCR fueron de 23 % - 100 %, 46 %, y 82 % respectivamente, mientras que la especificidad fue muy cercana al 100 % en todas (Kraupp & Aberle, 2011).

El gen *N* (nucleocápside) es una región conservada que se utiliza para la identificación molecular por PCR del virus sincitial respiratorio (Do *et al.*, 2012)

- Diagnóstico del virus de la parainfluenza humana

La detección del HPIV puede hacerse por RT-PCR, pruebas de antígenos, aislamiento e identificación en cultivo celular y demostración de anticuerpos IgG específicos para el virus (Center for disease control and prevention, 2019b). Lau *et al.*, (2005) reportó valores de sensibilidad para RT-PCR de un 100 % comparado con el 74 % obtenido por inmunofluorescencia directa y el 16 % - 37 % por cultivo celular.

Los genes *HA* (hemaglutinina) y *NA* (neuraminidasa) son los objetivos más comunes para la amplificación molecular ya que contienen regiones conservadas para los cuatro serotipos de HPIV. (GhelichKhan *et al*., 2017; Mahony *et al*., 2011)

- Diagnóstico del metapneumovirus humano

La identificación del MPVH es limitado, debido a la dificultad para hacer crecer el virus. El aislamiento en cultivos celulares convencionales suele ser muy largo (2 semanas o más) debido al requerimiento de condiciones especiales para su desarrollo además los efectos citopáticos pueden ser difíciles de reconocer (Feregrino *et al.*, 2013; Landry *et al.*, 2008). Diversos estudios muestran que los ensayos de DFA tienen una sensibilidad de 62.5 % - 100 % y una especificidad de ~100 %, sin embargo, como todas la técnicas de anticuerpos fluorescentes requieren de personal sumamente capacitado y los resultados dependen en gran medida del laboratorio, por ello la RT-PCR es considerada como el estándar de referencia para el diagnóstico del MPVH (Aslanzadeh *et al.*, 2008; Feregrino *et al*., 2013; Landry *et al.*, 2008).

Los métodos moleculares son los métodos más sensibles para la identificación del metapneumovirus humano, se han descrito múltiples dianas de amplificación con regiones conservadas en los genes *M* (matriz), *N* (nucleoproteína), *Pol* (polimerasa) y *F* (proteína de fusión) (Mahony *et al.*, 2011).

- Diagnóstico del adenovirus

Las infecciones por AdV se pueden identificar mediante detección de antígenos, PCR, aislamiento de virus y serología (Center for disease control and prevention, 2019a). La PCR es el método que presenta mayor sensibilidad y especificidad (100 % y 97 % respectivamente) en comparación con el cultivo celular (Tripathi *et al.*, 2019). Stroparo *et al*., (2010) realizó un estudio para evaluar el incremento en la detección de AdV en muestras respiratorias usando la PCR, concluyendo que esta técnica es mucho más sensible que el cultivo celular y que el ensayo por inmunofluorescencia indirecta, siendo este último el menos sensible de todos los métodos evaluados. Las pruebas de antígenos rápidos muestran una sensibilidad y especificidad general del 88.5 % y 97 % respectivamente (Goto, 2012).

Los genes *H* (hexón) y *F* (fibra) son actualmente la diana de estudio de las pruebas moleculares para la identificación de los adenovirus por ser regiones conservadas (Mahony *et al.*, 2011). Sin embargo, Duo *et al*., (2018) describieron en su estudio que la región del gen *E3* es una opción para la detección de los principales adenovirus respiratorios.

- Diagnóstico del rinovirus

Debido al gran número de serotipos existentes, no hay hasta el momento un antígeno común entre los RV y por lo tanto los ensayos de detección de antígenos y anticuerpos no se utilizan para la detección de rutina, además los RV son algo exigentes in vitro, y, debido a las condiciones específicas requeridas para un cultivo óptimo, las tasas de aislamiento han sido generalmente bajas, por lo tanto la prueba mayormente utilizada para su diagnóstico ha sido la RT-PCR (Jacobs *et al.*, 2013). De hecho, en un estudio realizado por Wright *et al*., (2007) se informó que la sensibilidad de la RT-PCR fue mucho mayor en comparación con el cultivo celular a la hora de detectar RV en muestras respiratorias.

La identificación molecular de los RV se ha dirigido a la amplificación de la región 5' no codificante (5'UTR) ya que es una secuencia muy conservada en estos virus (Lu *et al.*, 2008; Mahony *et al.*, 2011).

- Diagnóstico de enterovirus

El diagnóstico actual de los EV se basa en la utilización de la RT-PCR y en menor medida el cultivo celular. Se ha demostrado que la RT-PCR es más sensible que el cultivo, para la detección de EV en muestras clínicas. Este último se puede utilizar para la confirmación de muestras de PCR negativas en caso de sospecha de una nueva variante o para la detección de más de una cepa viral en una muestra. En un estudio llevado a cabo por (Chiang *et al.*, 2012) se encontró que las tasas de detección por RT-PCR en frotis de garganta fueron mayores a las obtenidas por el aislamiento en cultivo celular combinado con IFA. Los métodos serológicos ya no se usan ya que su utilidad clínica es limitada debido a la reactividad cruzada de los antígenos utilizados entre los diferentes serotipos y a la alta prevalencia de anticuerpos de EV en la población general, además el intervalo de dos semanas entre las muestras aguda y convaleciente hace que el diagnóstico sea lento y, a menudo, clínicamente irrelevante (Harvala *et al.*, 2018).

La mayoría de los ensayos de PCR se dirigen a la amplificación de una secuencia conservada de la región 5' no codificante (5'UTR) de los EV (Harvala *et al.*, 2018; Mahony *et al.*, 2011).

- Diagnóstico de SARS-CoV-2

La actual pandemia de COVID-19 ha llevado al mundo entero al desarrollo de pruebas capaces de detectar al SARS-CoV-2 de manera temprana con el fin de controlar la expansión de la enfermedad. Hasta el momento se han utilizado dos tipos de pruebas; las pruebas moleculares (RT-PCR) y las serológicas que se enfocan en el diagnóstico de antígenos o anticuerpos.

El ensayo de RT-PCR en tiempo real sigue siendo la prueba molecular de elección para el diagnóstico etiológico de los casos de COVID-19; mientras que las pruebas serológicas basadas en anticuerpos o antígenos se utilizan como herramientas complementarias para evaluar a toda la población y se deben confirmar con el ensayo molecular (Mathuria *et al.*, 2020). La confiabilidad de los resultados de los inmunoensayos serológicos varía según los kits comerciales disponibles. Por ejemplo, un estudio mostró que la sensibilidad general de la prueba COVID-19 que prueba simultáneamente tanto IgM / IgG, fue del 88,66 % y la especificidad del

90,63 % (Li *et al.*, 2020). En tanto la RT-qPCR tuvo un valor de sensibilidad entre 73 % y 97 % (Boger *et al.*, 2020).

El diagnóstico molecular actual se lleva a cabo por qRT-PCR en la cual se amplifican secuencias conservadas de los genes *N* (nucleocápside), *E* (envoltura), *RdRP* (RNA polimerasa RNA dependiente), *S* (espiga) y la región ORF1ab (Center for disease control and prevention, 2021a; Secretaría de Salud *et al*., 2021; Shabani *et al.*, 2021). Se recomienda el uso de al menos dos dianas moleculares cuando se lleva a cabo el ensayo con el fin de evitar una posible reacción cruzada con otros coronavirus endémicos así como una posible deriva genética del SARS-CoV-2 (Tang *et al.*, 2020).

- Diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae*

No existe un verdadero estándar de referencia para el diagnóstico de neumonía neumocócica, se suelen utilizar distintas pruebas para identificar a *S. pneumoniae* como los hemocultivos, la detección de antígenos en orina, y la PCR. La serología es de poca ayuda en estos entornos agudos, ya que requiere suero de la fase de convalecencia (Vernet *et al.*, 2011). La detección de anticuerpos en orina presenta una sensibilidad de 76.9 % - 88 % y una especificidad de 84.2 % - 96 % (Smith *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2021). Respecto a la sensibilidad y especificidad de la PCR, existe un discrepancia entre diversos estudios sobre su utilidad en el diagnóstico de *S. pneumoniae*, asociados al biomarcador utilizado, el tipo de muestra y la variante de PCR utilizada (Avni *et al*., 2010; Kusznierz *et al.*, 2016; Murdoch *et al.*, 2003; Torres *et al*., 2016).

Para la identificación molecular de *S. pneumoniae* se han utilizado varias dianas de amplificación, sin embargo el gen *lytA* que codifica a la autolisina neumocócica ha sido el gen de referencia para los ensayos de PCR (Paternotte *et al.*, 2019; Sanz *et al.*, 2018)

- Diagnóstico de *Haemophilus influenzae*

Para el diagnóstico de *H. influenzae* se realizan cultivos y hemocultivos para valorar el desarrollo de colonias típicas de esta bacteria en conjunto con la tinción de Gram y pruebas confirmatorias, además se utilizan técnicas serológicas para la serotipificación de las cepas. Recientemente se ha incorporado el uso de la PCR en el diagnóstico (Khattak & Anjum, 2021). En un estudio llevado a cabo por Reddington *et al.*, (2015) se evaluó el diseño de un nuevo ensayo de PCR para el diagnóstico de *H. influenzae* en muestras clínicas obteniéndose una

sensibilidad del 90.91 % y una especificidad del 100 %. Estos valores son muy parecidos a los reportados por Deraz *et al.*, (2012) quién además reportó valores de sensibilidad y especificidad para hemocultivos de 38 % y 100 % respectivamente. Respecto a la tinción de Gram en muestras de esputo, esta presentó una sensibilidad de 45 % - 61 % y una especificidad de 87 % - 98 % (Huang *et al.*, 2020).

El gen *hpd* que codifica la proteína D (una lipoproteína expuesta la superficie de todos los *H. influenzae* capsulados y no capsulados), es un gen altamente conservado de gran interés para el desarrollo de pruebas moleculares por estar presente en los 6 serotipos y en los *H. influenzae* no tipificables (Castillo *et al*., 2011).

- Diagnóstico de *Micoplasma pneumoniae*

La infección por *M. pneumoniae* puede diagnosticarse mediante cultivo, serología o métodos moleculares. El cultivo es relativamente insensible, requiere medios especializados, una gran experiencia y tarda de varios días a semanas en completarse debido a la naturaleza fastidiosa y al lento crecimiento del organismo. La serología carece de sensibilidad y especificidad debido a varias razones, entre las que se incluyen la alta prevalencia de anticuerpos de memoria en personas sanas y la falta de respuesta IgM en muchos individuos de edad avanzada. El uso óptimo de la serología requiere el análisis de muestras agudas y de convalecencia, lo que no es práctico para el diagnóstico en un entorno ambulatorio. Por otro lado, debido al auge de las pruebas moleculares y a la aprobación de algunos ensayos por la FDA, estos pueden considerarse como el método de elección para el diagnóstico de este microorganismo (Leal *et al.*, 2020).

La detección molecular por amplificación de ácidos nucleicos en diversos kits comerciales y algunos estudios, se basa en la detección del gen *P1* (gen de la citoadhesina P1) y del gen *mpn372* (Toxina CARDS) (Chaudhry *et al.*, 2017; Leal *et al.*, 2020; Merida *et al.*, 2017; Thurman *et al.*, 2011).

- Diagnóstico de *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes generalmente se cultiva en medios de agar suplementados con sangre, esta técnica sigue siendo el estándar de oro y el método de referencia para el diagnóstico de las faringitis y amigdalitis estreptocócicas, cuya sensibilidad oscila por encima del 90 %. La detección en suero

por agrupamiento de antígenos de Lancefield se sigue aplicando ampliamente en los laboratorios, sin embargo, la correlación no es del 100 % debido a que la presencia del antígeno A de *S. pyogenes* se ha identificado en otras especies de *Streptococcus* por lo que es necesario la confirmación con otras pruebas como la prueba de PYR y la susceptibilidad a la bacitracina. Por otro lado, aunque las pruebas rápidas de antígenos proporcionan resultados inmediatos, la sensibilidad oscila entre un 58 % y 96 %. En el caso de las pruebas de detección de anticuerpos, esto se miden únicamente con fines de investigación y por lo general no tienen uso clínico en el diagnóstico de la infección estreptocócica. Finalmente, la introducción de pruebas de amplificación de ácidos nucleicos ha llevado a la obtención de valores de sensibilidad y especificidad del 99 % y 99.6 % respectivamente, esto las convierte en las técnicas con mayor fiabilidad y seguridad en los resultados (Spellerberg & Brandt, 2016).

Los principales objetivos genéticos utilizados para la identificación molecular de *S. pyogenes* incluyen los genes *spy1258, dnaseB, speB y sof* (Abraham & Sistla, 2016; Center for disease control and prevention, 2021b; Dunne *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2011; Slinger *et al.*, 2011).

Panorama actual de la PCR en el diagnóstico de las infecciones respiratorias.

El uso de la PCR como técnica de diagnóstico ha revolucionado la detección de patógenos respiratorios, debido a que ofrece resultados con valores de especificidad y sensibilidad que se acercan con frecuencia al 100 %, lo que asegura un incremento en la certeza y confiabilidad de los resultados, además estos últimos pueden estar disponibles en cuestión de horas, facilitando una detección rápida que permita la instauración de un terapia médica adecuada (Walter & Wunderink, 2018).

Sin embargo, la utilización de una PCR específica (Monoplex) para la detección de microorganismo individual tiene limitaciones, por ejemplo, de ante mano se sabe que la implementación de una PCR en el laboratorio suele ser compleja y además la obtención de un resultado negativo no descarta la infección de otros microorganismos patógenos respiratorios lo que generaría incertidumbre a la hora de emitir un diagnóstico. (El Kholy *et al.*, 2016).

Para superar la desventaja inherente del costo y mejorar la capacidad diagnóstica de la prueba, se ha desarrollado la PCR multiplex, una variante de la prueba en la que se amplifica más de una secuencia diana utilizando más de un par de primers. Esta variante está adquiriendo cada

vez más importancia en el diagnóstico clínico, ya que la cantidad de muestra requerida, el tiempo y los costos apenas difieren de los de la PCR monoplex, a pesar de que se analizan varios patógenos a la vez (Krause *et al.*, 2014).

Actualmente en el mercado ya existen kits comerciales de PCR multiplex para detectar patógenos respiratorios, la mayoría de ellos están diseñados para detectar un grupo reducido de patógenos e inclusive algunos lo hacen de manera separada entre virus y bacterias (Certest Biotec, 2021). Otros se han desarrollado para detectar una amplia variedad de patógenos respiratorios, sin embargo solo pueden utilizarse con equipos especializados que deben adquirirse por separado para poder utilizarse en el diagnóstico clínico (BioFire, 2020; Qiagen, 2021).

La tecnología más reciente que incorpora a la PCR multiplex para el diagnóstico clínico es el diseño del panel respiratorio FilmArray® desarrollado por BioFire®. Este sistema permite detectar 22 patógenos respiratorios (virales y bacterianos) en un tiempo aproximado de 45 minutos (BioFire, 2020). Este panel se considera una prueba molecular en el punto de atención (POC) ya que es una técnica totalmente automatizada, en una bolsa cerrada y desechable, que sólo requiere 2 minutos de trabajo y cuyos resultados están disponibles en aproximadamente 1 hora (Andrews *et al.*, 2017).

Sin embargo, el costo que representa adquirir el equipo completo para implementar la prueba suele ser la principal desventaja y limitante para la mayoría de los laboratorios clínicos, además se debe mencionar que solo se permite procesar una muestra a la vez, lo que disminuye la capacidad de procesamiento de un laboratorio (Azar & Landry, 2018; Pierce *et al.*, 2012).

Se han descrito PCR multiplex para detectar virus, bacterias y/u otros agentes infecciosos en uno o varios tubos de reacción. Los primeros estudios han destacado los obstáculos que pueden poner en peligro la producción de ensayos multiplex sensibles y específicos, pero estudios más recientes han proporcionado protocolos sistemáticos y mejoras técnicas para el diseño de pruebas simples (Bellau *et al.*, 2005; El Kholy *et al.*, 2016; Krause *et al.*, 2014; McDonough *et al.*, 2005; Miyashita *et al.*, 2004; Thurman *et al.*, 2011; Tiveljung *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2020). Los más útiles son la elección empírica y cuidadosa de oligonucleótidos, así como el uso de la metodología de PCR de arranque en caliente utilizando enzimas especiales (Green & Sambrook, 2019; Markoulatos *et al.*, 2002). Estos avances, junto con otros para mejorar la

sensibilidad y la especificidad y para facilitar la automatización, han dado como resultado la aparición de numerosas publicaciones sobre la aplicación de la PCR multiplex en el diagnóstico de agentes infecciosos.

Por lo tanto, la implementación de la PCR multiplex en el diagnóstico de las infecciones respiratorias permitiría ahorrar tiempo y dinero (Green & Sambrook, 2019), y lo más importante, al tener un amplio margen de detección de patógenos respiratorios, puede contribuir a un diagnóstico más certero, permitiendo la instauración de un adecuado manejo y tratamiento del paciente (Budnik *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2013).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) son el principal motivo de consulta médica en todo el mundo y se encuentran entre las principales causas de morbimortalidad en niños y adultos mayores.

A pesar de los grandes avances en el campo de la biología molecular, el diagnóstico de estas infecciones se realiza en la mayoría de los casos empleando métodos convencionales, no obstante, estos suelen resultar laboriosos, tardados, con niveles de sensibilidad y especificidad bajos y muchas veces enfocados a un patógeno en particular. Por ejemplo, las pruebas serológicas deben demostrar valores de sensibilidad y especificidad adecuados para que sus resultados tengan una validez clínica, sin embargo, esto se limita como consecuencia de la aparición de reacciones cruzadas y a la inmunidad adquirida posterior a una infección. Por otro lado, los cultivos requieren tiempos de incubación muy largos y los resultados son influenciados por la calidad de la muestra, sin olvidar que es necesario un análisis posterior para la identificación correcta del agente etiológico, lo que aumenta aún más los tiempos de respuesta.

Debido a lo anterior, algunos laboratorios han comenzado a implementar ensayos moleculares monoplex, pero a pesar de sus ventajas, resultan poco prácticos y rentables, en especial cuando se tratan de infecciones con una amplia variedad de agentes causales con lo son las infecciones respiratorias. Recientemente se han incorporado paneles de detección multiplex, sin embargo, el elevado costo de éstos hace difícil su implementación en la mayoría de los laboratorios.

Esta situación reta a los investigadores a implementar una prueba molecular múltiple que asegure mayor confiabilidad en los resultados, acortando, además, los tiempos de respuesta y, por lo tanto, contribuya a optimizar el manejo del paciente.

JUSTIFICACIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) representan el principal motivo de consulta médica en nuestro país. El diagnóstico convencional actual es poco sensible y específico, además de que se realiza individualmente para cada patógeno. Considerando la gran variedad de agentes etiológicos causantes de las IRAs es necesario desarrollar una prueba sensible y específica capaz de identificar al mismo tiempo a los principales patógenos respiratorios.

Debido a lo anterior, este trabajo está enfocado en diseñar una PCR multiplex altamente específica y potencialmente sensible para diagnosticar en un solo análisis a los principales agentes etiológicos causantes de IRAs en nuestro país. Además, una vez implementada en el laboratorio dicha prueba podrá contribuir a mejorar la atención médica del paciente al disminuir los tiempos de entrega de resultados y evitando el uso de una terapia farmacológica innecesaria.

HIPÓTESIS

Se puede diseñar una PCR multiplex para el diagnóstico específico de los principales agentes etiológicos causantes de las infecciones respiratorias agudas en México.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Diseñar una PCR multiplex para diagnosticar a los principales agentes etiológicos causantes de las infecciones respiratorias agudas en México.

Objetivos específicos

1. Identificar regiones conservadas dentro de los biomarcadores seleccionados de cada patógeno respiratorio para diseñar primers que se ajusten a una PCR multiplex.
2. Diseñar un plásmido que contenga las secuencias de todos los biomarcadores para que funcione como control positivo de la prueba y de la técnica.
3. Establecer las condiciones de reacción y de amplificación de la PCR multiplex.
4. Proponer un corrimiento electroforético para evaluar el funcionamiento *in sílico* de la PCR multiplex.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

a) Tipo de estudio

Diseño bioinformático

b) Universo de estudio

Secuencias genéticas de los principales patógenos causantes de las infecciones respiratorias agudas en México obtenidas de la base de datos del NCBI y de la plataforma GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data).

c) Tamaño de muestra

20 secuencias genéticas para cada microorganismo seleccionado en el estudio.

Agentes virales: adenovirus, enterovirus D68, metapneumovirus humano, rinovirus, SARS-CoV-2, virus de la influenza A, virus de la influenza B, virus de la parainfluenza humana 1-4, virus sincitial respiratorio.

Agentes bacterianos: *Haemophilus influenzae, Mycoplasma pneumoniae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes.*

d) Sede y lugar del estudio

Estudio computacional

e) Criterios de selección (Criterios de inclusión y criterios de exclusión)

Todos los patógenos respiratorios incluidos en este diseño fueron seleccionados de acuerdo con la frecuencia de aparición reportada en los estudios epidemiológicos llevados a cabo en el país. Se incluyeron a todos aquellos patógenos que presentaron las mayores tasas de frecuencia, así como aquellos que por su presencia son considerados como de importancia en la salud pública de México. No se incluyeron a los patógenos respiratorios cuya frecuencia de aparición es muy baja o se consideran como patógenos atípicos del sistema respiratorio.

La selección de todos los biomarcadores utilizados en este diseño se realizó con base a la información reportada en la bibliografía, tomándose en cuenta a aquellos que presentaron los

mayores grados de conservación, así como aquellos que reflejaron los mejores resultados de sensibilidad y especificidad reportados en diferentes estudios.

f) Recursos humanos

Tesista: pQFB. Julian Hernández Martínez

Director: Dra. Nidia Gary Pazos Salazar. Departamento de Microbiología, FCQ-BUAP.

Asesor: QFB. Miguel Ruís Jiménez. Asesores especializados

g) Recursos financieros

No requiere

h) Diseño estadístico

No requiere

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Materiales

- Equipo de cómputo
- Secuencias genéticas del NCBI y GISAID
- Programas Bioinformáticos
    - Clustal Omega
    - NEBcutter V2.0
    - BLAST
    - Oligo Analizer
    - Oligo Explorer
    - SnapGene

Metodología

- Identificación de los principales agentes etiológicos de las IRAs en México

Se llevó a cabo un análisis epidemiológico para identificar a los principales patógenos causantes de las IRAs en México. Para ello se accedió a las páginas oficiales de la Secretaría de Salud (SSA), del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) y del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), así mismo se utilizaron los motores de búsqueda de Google Scholar, PubMed y la página de la Biblioteca General Universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Durante la búsqueda se utilizaron las palabras clave *"Infección Respiratoria Aguda", "Virus", "Bacteria", "México", "Prevalencia",* y *"Epidemiología"*. Se recopilaron los datos epidemiológicos sobre la frecuencia de aparición de los principales patógenos respiratorios en el país y se reportaron en la Tabla 2.

- Selección de biomarcadores

Utilizando los mismos motores de búsqueda, se realizó una revisión de diversos artículos de investigación, enfocados en el estudio, comparación y selección de diferentes biomarcadores utilizados en el diagnóstico molecular de patógenos respiratorios. La selección de cada uno de los biomarcadores se fundamentó en la investigación científica disponible y se comparó con los porcentajes de identidad obtenidos de los alineamientos construidos con las secuencias genéticas de cada patógeno. Los biomarcadores elegidos se encuentran descritos en la Tabla 5.

- Obtención de las secuencias genéticas de cada uno de los biomarcadores

Se realizó la búsqueda de al menos 20 secuencias genéticas para cada biomarcador utilizando la base de datos del NCBI y la plataforma GISAID. Las secuencias identificadas en las plataformas fueron descargadas en formato FASTA y se guardaron en archivos de Word.

- Alineamiento e identificación de regiones conservadas

Utilizando las secuencias recuperadas anteriormente, se realizaron alineamientos múltiples mediante la plataforma Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). Una vez construidos los alineamientos, fueron identificadas y seleccionadas regiones conservadas para el posterior diseño de los primers.

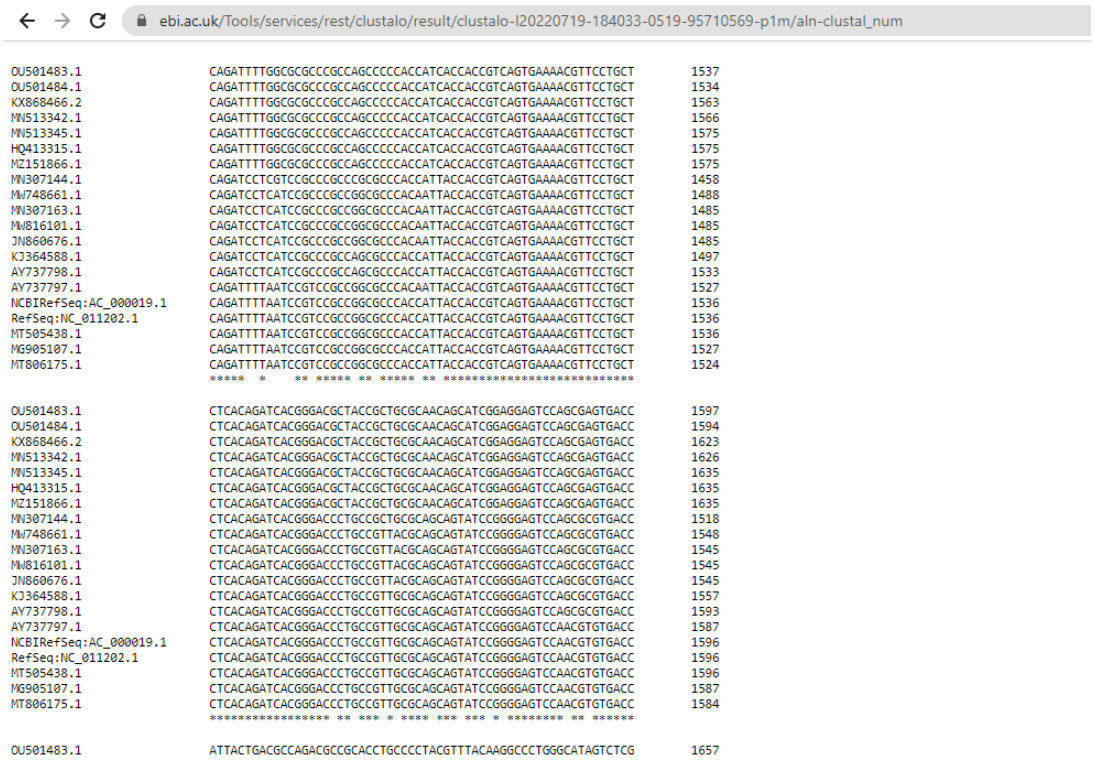


Figura 3. *Alineamiento del gen L2 del adenovirus en la plataforma Clustal Omega.* En la figura se observa el alineamiento de 20 secuencias del gen *L2* del adenovirus obtenidas de la base de datos del GenBank (NCBI). A la izquierda se muestran los números de acceso en la plataforma, al centro las secuencias alineadas y a la derecha la ubicación de la última base de cada fila. El signo * indica la existencia de bases iguales entre las diferentes secuencias y por lo tanto se puede hablar de regiones conservadas, la ausencia de este signo indica que algunas bases no son iguales derivado de mutaciones o sustituciones dentro de las secuencias.

- Diseño de primers

Se utilizó el programa Oligo Explorer 1.5 para diseñar primers empleando las regiones seleccionadas en los alineamientos múltiples. El diseño y características de los primers se basó en el cumplimiento de los criterios descritos en la Tabla 3.

Posteriormente se realizó un análisis múltiple en el programa Oligo Analizer 1.5 de todo el conjunto de primers para identificar la formación de dímeros y otras estructuras secundarias.

Se verificó la especificidad *in sílico* de los primers. Para ello, cada uno de los oligonucleótidos fue sometido a alineamientos locales utilizando las secuencias disponibles en la base de datos del programa bioinformático BLAST. En este análisis se verificó que los porcentajes de identidad y de alineación fueran de un 100 % con respecto al blanco de interés, poniendo especial atención en la búsqueda de alineamientos inespecíficos.

- Acoplamiento de la Tm y del tamaño de amplicones

Se buscó optimizar el diseño de la PCR multiplex ajustando todo el conjunto de primers a una Tm con una diferencia no mayor a 2°C, además se cuidó que los amplicones obtenidos para cada agente respiratorio tuvieran un tamaño de mínimo 20 bases de diferencia entre ellos, para lograr su correcta identificación y diferenciación en una electroforesis en gel de agarosa (EGA).

- Diseño del control positivo de la prueba

Se utilizó el programa SnapGene para diseñar un plásmido recombinante con las secuencias de los controles positivos de la prueba y de la técnica. Para ello se utilizó el vector de clonación pJET1.2 de ThermoFisher (Figura 4) al cual le fue insertado en el sitio múltiple de clonación (MCS) un constructo previamente diseñado con todos los amplificados de los biomarcadores (controles positivos de la prueba), así como del gen de la subunidad beta de la hemoglobina humana (control positivo de la técnica).

El diseño del constructo se basó en la adición de sitios de restricción a los primers previamente diseñados para obtener amplificados que pudieran ser reconocidos y cortados por enzimas de restricción y así generar extremos cohesivos que permitieran el ligado posterior en un solo inserto (Constructo).

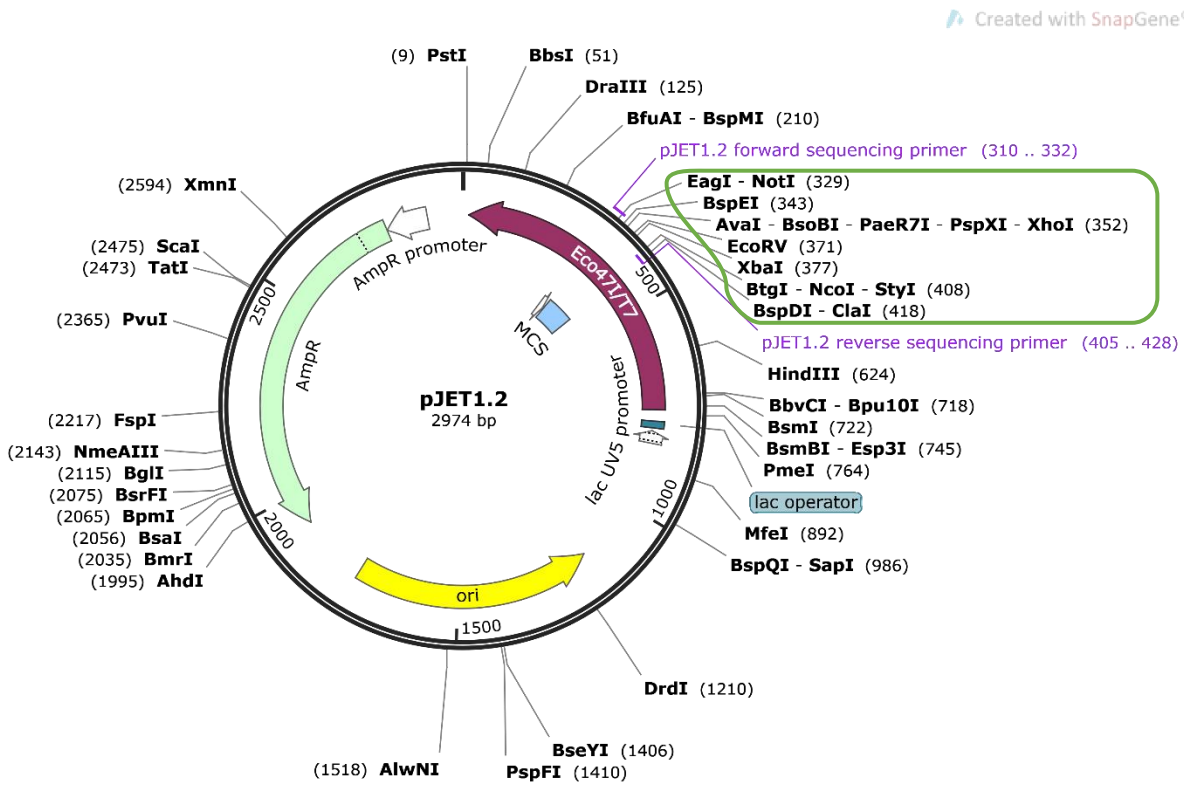
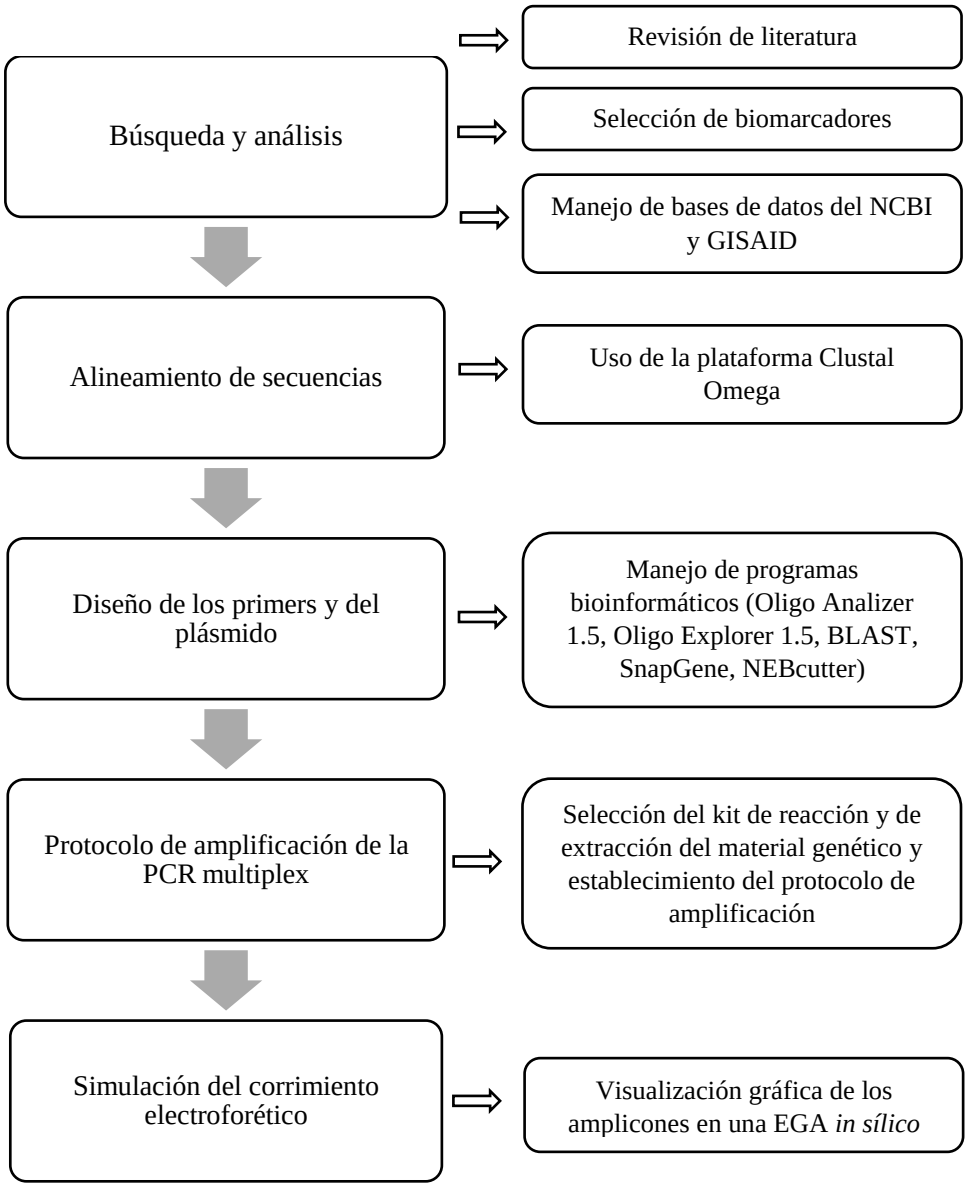


Figura 4. *Vector de clonación pJET1.2.* El vector de clonación pJET1.2 permite clonar fragmentos con una longitud de hasta 10 kb. Está formado por un sitio múltiple de clonación (MCS) integrado por múltiples sitios de restricción (Señalados en verde) que facilitan la inserción del fragmento que será clonado. Además, contiene un gen de resistencia a la ampicilina (AmpR) y un promotor de transcripción T7. Adaptado de: *pJET1.2* por SnapGene, 2022, www.snapgene.com/resources. Copyright

- Establecimiento de condiciones de reacción y amplificación

Se estudiaron diferentes kits comerciales, de los cuales se eligió el que mejor se adaptó a las condiciones propuestas en el diseño de la PCR multiplex. Se siguieron las indicaciones descritas en el inserto para establecer las condiciones de reacción, así como el protocolo de amplificación, además se incluyó la propuesta de un kit de extracción de material genético con compatibilidad para muestras respiratorias.

Diagrama general de trabajo



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de los principales patógenos responsables de las IRAs en México

Una de las principales limitantes en nuestro diseño fue la escasa información epidemiológica existente en nuestro país. Actualmente en México las IRAs son consideradas enfermedades de notificación obligatoria (Secretaría de Salud & Dirección General de Epidemiología, 2022), sin embargo, la información sobre la prevalencia y detección de los virus y bacterias respiratorias es limitada (Ortiz *et al*., 2019). Fueron muy pocos los estudios que muestran la frecuencia de aparición de los virus respiratorios, a pesar de ello, en todos se observa que el virus sincitial respiratorio y el rinovirus son los principales agentes virales ya que presentan una tasa de detección que oscila entre 17.4 % a 33.5 % y 17.5 % a 33.0 % respectivamente. Dichos valores cambian respecto a la población de estudio, observándose que la frecuencia de VSR es mayor en niños, mientras que para RV lo es en adultos. Continuando con el análisis, también se encontraron a los virus de la influenza A (2.9 % - 13.3 %) y B (0.7 % – 10.7 %), el virus de la parainfluenza humana (3.5 % – 14.4 %), el metapneumovirus humano (3.5 % - 10.6 %), el adenovirus (2.2 % - 9.6 %) y el enterovirus (5.8 % - 5.9 %). En conjunto, estos patógenos representan los principales virus respiratorios de mayor prevalencia en México (Fernandes *et al.*, 2017; Galindo *et al.*, 2013; Moreno *et al.*, 2015; Ojeda *et al*., 2016; Ortiz *et al*., 2019; Wong *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2017).

Hasta la fecha no se dispone de información en donde se estudie la frecuencia de SARS-CoV-2 respecto a otros virus respiratorios, no obstante, debido a la situación actual derivada de la pandemia de Covid-19 fue importante incluir a este virus dentro del diseño de la prueba. Es importante mencionar que existen otros virus respiratorios que han sido identificados en muestras respiratorias como el bocavirus y los coronavirus 229E, NL63, HKU1 y OC43, sin embargo, debido a su baja frecuencia, decidieron omitirse para el diseño de esta prueba.

Respecto a la información epidemiológica de las bacterias respiratorias, fue difícil determinar con exactitud su prevalencia en nuestro país. No se encontraron estudios que evaluaran su incidencia, por lo que su elección para este diseño se basó en reportes de casos registrados en las páginas oficiales de la Secretaría de salud, así como por su importancia en la salud pública de México. De acuerdo a lo anterior, se encontró que tanto *S. pneumoniae* como *H. influenzae* son los principales patógenos responsables de la neumonía adquirida en la comunidad (NAC),

una de las enfermedades con mayores tasas de morbilidad y mortalidad en México y en el mundo (Echaniz *et al.*, 2019). A pesar de que se han desarrollado vacunas que protegen contra los serotipos más comunes, se ha observado recientemente el surgimiento de serotipos no vacunales de importancia clínica. Según los datos publicados en el 2020 por el Grupo Interinstitucional para la Vigilancia de Enfermedades Bacterianas Prevenibles por Vacunación (GIVEBPVac) del Instituto Nacional de Salud Pública, en el año 2019 se registraron 129 casos de aislamiento de *S. pneumoniae* en pacientes con Neumonía. Para el caso de *H. influenzae*, ese año no se dieron a conocer datos derivado de la pandemia de covid-19, sin embargo, en el 2018 se registraron 15 aislamientos (Instituto Nacional de Salud Pública, 2019). Es importante mencionar que estos son solo datos de algunas instituciones del país, por lo que no representan datos reales del aislamiento de estos dos microorganismos.

Por otro lado, *M. pneumoniae*, ha tomado relevancia clínica en nuestro país por ser uno de los principales patógenos causantes de la neumonía atípica. En un estudio llevado a cabo por Merida *et al.*, (2019) se encontró que *M. pneumoniae* se aisló en el 26.6 % de los pacientes pediátricos con NAC en un hospital de México, este es quizá el único estudio que evalúa la incidencia de esta bacteria en nuestro país. Finalmente se decidió incluir a *S. pyogenes* debido a que es el principal causante de la amigdalitis y faringitis estreptocócica (Secretaría de Salud & Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2009), enfermedad que se ubicó en el lugar número 15 dentro de las 20 principales enfermedades de nuestro país en el año 2020 (Secretaría de Salud, 2021), de ahí la importancia de la detección de este microorganismo.

Elección de los biomarcadores

Uno de los principales retos a cumplir fue identificar biomarcadores altamente conservados para cada uno de los patógenos respiratorios con el objetivo de diseñar primers universales capaces de detectar una diana en común entre las distintas variantes genéticas existentes, de tal manera que se pudiera ampliar el espectro de detección de la prueba molecular. Para ello, fue necesario realizar una búsqueda y revisión de fuentes bibliográficas basadas en el análisis, estudio y comparación de biomarcadores utilizados para el diagnóstico molecular de patógenos respiratorios, apoyados en la construcción de alineamientos múltiples, que, en conjunto, permitieron establecer la selección de los genes descritos en la Tabla 5.

Tabla 5. *Biomarcadores seleccionados para el diseño de primers*

Agente etiológico	Biomarcador	Descripción
Adenovirus	*L2*	El gen *L2* codifica la proteína VII (Pentón), cuyas funciones están involucradas en la formación de la cápside al auto asociarse para formar los pentámeros que se sitúan en los 12 vértices de la estructura, además de ayudar en la encapsidación del ADN y la maduración de la progenie del virión del AdV (Kulanayake & Tikoo, 2021; Uniprot, 2022b).
SARS-CoV-2	*M*	El gen *M* codifica la proteína estructural de membrana (Finkel *et al.*, 2021). Estudios recientes han descrito que esta proteína es la encargada de inducir la apoptosis de las células epiteliales pulmonares (Yang *et al.*, 2022).
Virus de la influenza A y B	*M*	El gen *M* codifica dos proteínas tanto de la matriz como de la membrana. La proteína M1 es una proteína de la matriz que se encuentra justo debajo de la envoltura viral jugando un papel vital en el ensamblaje y en la gemación. M2 es una proteína de membrana que se inserta en la envoltura viral y se proyecta desde la superficie del virus como tetrámeros cuyo dominio transmembrana tiene actividad de canal de iones que participa en la liberación del virus de la célula (Furuse *et al.*, 2009).
Mycoplasma pneumoniae	*mpn372*	El gen *mpn372* codifica la toxina CARDS (Toxina del síndrome de dificultad respiratoria adquirida en la comunidad), principal factor de virulencia de *M. pneumoniae* y cuya expresión induce una respuesta inflamatoria robusta en el organismo infectado (Medina *et al.*, 2012; Ramasamy *et al.*, 2021).
Metapneumovirus humano	*F*	El gen *F* codifica la proteína de fusión del metapneumovirus humano, que se encarga de mediar la fusión de la envoltura viral y las membranas celulares para establecer la infección (Kinder *et al*., 2019).
Haemophilus influenzae	*hpd*	El gen *hpd* codifica la proteína D, la cual es una lipoproteína de la membrana externa expuesta a la superficie identificada en todas las cepas de *H. influenzae.* Se considera que la proteína D es un factor de virulencia que participa en todo el proceso de la enfermedad y evasión de la respuesta inmune (Clarke *et al.*, 2017).
Streptococcus pyogenes	*spy1258*	El gen *spy1258* es un gen regulador transcripcional putativo perteneciente a la familia TetR/AcrR, que juega un papel muy importante en la adaptación y supervivencia de *S. pyogenes* en diferentes condiciones ambientales (Abraham & Sistla, 2016).

Continuación

Agente etiológico	Biomarcador	Descripción
Rinovirus/ Enterovirus	5'UTR	Las estructuras presentes en la región 5-UTR de los *Picornavirus* son importantes para muchos eventos del ciclo de vida viral, incluida la replicación viral, la traducción, las interacciones entre la proteína del huésped y el virus y la virulencia. La región 5'UTR contiene siete dominios de bucle de tallo altamente conservados que forman dos unidades altamente funcionales. (Kloc *et al*., 2018; Mahmud *et al.*, 2019; Muslin *et al.*, 2015).
Streptococcus pneumoniae	*lytA*	El gen *lytA* codifica a la autolisina *N* -acetilmuramoil- l - alanina amidasa del neumococo y ha sido descrita como ubicua y específica de esta especie. La liberación de este factor de virulencia contribuye directamente al daño tisular del huésped (Herta *et al.*, 2018; Mellroth *et al.*, 2012; Tavares *et al.*, 2019).
Virus sincitial respiratorio	*N*	El gen *N* codifica la nucleoproteína. Esta proteína está altamente conservada y se asocia junto con el ARN viral, la fosfoproteína y la ARN polimerasa dependiente de ARN para formar la nucleocápside, cuya función es proteger al ARN de las nucleasas. La nucleoproteína también desempeña una función en la inhibición de la respuesta inmunitaria (Oliveira *et al.*, 2013; Uniprot, 2022a).
Virus de la parainfluenza humana	*L*	El gen *L* codifica para las proteínas grandes de la ARN polimerasa, consideradas las principales subunidades de esta enzima y cuya función es esencial para la transcripción y replicación del genoma del ARN viral (Li *et al.*, 2019; Nishio *et al*., 2011).

Las razones por las cuales se seleccionaron los biomarcadores anteriormente descritos se exponen a continuación.

Adenovirus. El diagnóstico actual ha señalado a los genes *h* (Hexón) y *f* (Fibra) como blancos moleculares para la identificación del AdV, sin embargo, este diagnóstico solo se ha enfocado en la diferenciación y caracterización particular de cada uno de los serotipos existentes (Khalaf *et al.*, 2017; Mahony *et al.*, 2011; Popowitch *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2000), además, durante la construcción de los alineamientos, no se encontraron regiones conservadas dentro de la secuencia de estos genes, haciendo imposible considerarlos como biomarcadores en esta prueba. Por otra parte, se ha informado que solo las especies B, C y E son responsables de causar

infecciones respiratorias agudas (Duo *et al.*, 2018; Kenmoe *et al*., 2018; Wu *et al.*, 2022), por lo tanto, fue necesario realizar una búsqueda y localización de una diana en común entre el genoma de los diferentes serotipos respiratorios. Esto nos llevó a identificar, en los alineamientos múltiples, a una región del gen *L2* (proteína VII o base del pentón) altamente conservada entre las tres especies, convirtiéndola en el blanco molecular de este diseño.

SARS-CoV-2. Gracias a la utilización de la plataforma GISAID fue posible alinear las distintas secuencias de las principales variantes del SARS-CoV-2 de importancia clínica en el país; *Alpha, Beta, Gamma, Lamda, Delta, Mu y Omicrón*. Se analizaron diferentes dianas moleculares, incluidos los genes *E* (Envoltura), *N* (Nucleocápside), *RdRp* (ARN polimerasa ARN dependiente), *ORF1ab* y S (Espiga), utilizados actualmente para el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 (Center for disease control and prevention, 2021a; Secretaría de Salud *et al.*, 2021; Shabani *et al*., 2021; Vacaflores *et al.*, 2022; Zimmerman *et al.*, 2021). A pesar de que se identificaron regiones conservadas en estos genes, se observó la presencia de variaciones nucleotídicas entre las diferentes secuencias utilizadas en los alineamientos. Este fenómeno ya ha sido señalado en diversos estudios donde se encontró que la presencia de estas mutaciones han generado desajustes en el diseño de los primers de diferentes casas comerciales, lo cual ha contribuido a la aparición de falsos negativos y al bajo rendimiento de diferentes kits de diagnóstico, siendo informado que los genes *N* y *S* son los que han mostrado las mayores tasas de variación, seguido por los genes *E* y *RdRp* (Afzal, 2020; Wang *et al*., 2020; Zimmerman *et al.*, 2021). Esto condujo al análisis de otros genes, específicamente el gen *M*, un objetivo molecular que no ha sido utilizado en el diagnóstico del SARS-CoV-2 pero que en este estudio presentó regiones altamente conservadas entre las distintas variantes. El análisis de esta secuencia llevó a la construcción de oligonucleótidos dirigidos al reconocimiento de este gen y con el fin de evaluar su especificidad, estos fueron sometidos a un proceso de alineamiento local en busca de homología con las secuencias del gen *M* de los coronavirus OC43, NL63, HKU1 y 229E, principales especies circulantes en el ambiente, sin embargo, los resultados arrojados indicaron la ausencia de esta, lo cual permitió el uso de este gen como biomarcador para la detección del SARS-CoV-2.

Virus de la influenza A y B. La elección de los biomarcadores para la identificación de los virus de la influenza A y B se realizó con base a las recomendaciones establecidas por los

protocolos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Estas instituciones establecen al gen *M* como blanco para la identificación molecular de ambas especies por contener regiones altamente conservadas (Center for disease control and prevention, 2021a; World Health Organization, 2021). Es importante mencionar que a pesar de que se utilizó el mismo biomarcador, se verificó mediante alineamientos en BLAST que no existiera un reconocimiento homólogo de parte de los primers hacia ambos virus. Los análisis concluyeron que los pares de oligonucleótidos eran específicos para cada especie en particular. Además, los primers del virus de la influenza A están diseñados para la detección universal de los principales serotipos circulantes en los seres humanos, como lo son los virus de la influenza AH1N1pmd09 y AH3N2 (World Health Organization, 2018), sin precisar distinción entre ellos ya que el manejo terapéutico una vez que se realiza el diagnóstico es el mismo, y su diferenciación solo se hace con fines epidemiológicos, lo cual no entra dentro de los objetivos de este diseño.

Mycoplasma pneumoniae. Se han descrito diferentes dianas utilizadas para la identificación molecular de *M. pneumoniae*. De todos ellos, el gen *mpn372*, encargado de codificar a la toxina CARDS, resultó ser un blanco muy interesante para este estudio por dos razones; primera, se ha informado que este gen se encuentra única y exclusivamente en esta especie (Muir *et al.*, 2011). Esto permitió el diseño de primers capaces de diferenciar a esta bacteria de otras especies del género *Mycoplasma*. Y segunda, porque se ha informado que las secuencias del gen de la toxina CARDS son más sensibles para la detección molecular de *M. pneumoniae* en comparación con pruebas dirigidas a la identificación de los genes de la Citadhesina P1 y de la ATPasa (Muir *et al*., 2011; Winchell *et al*., 2008), lo cual se explicaría debido a que la expresión de esta toxina aumenta sustancialmente una vez que ocurre la infección por esta bacteria en el organismo (Ramasamy *et al*., 2021).

Metapneumovirus humano. Se diseñaron primers capaces de detectar a los genogrupos A y B del MPVH, estos se dirigieron a la región del gen *F* (Proteína de fusión), uno de los principales objetivos moleculares descritos en la literatura, además de los genes *M* (Matriz), *N* (Nucleoproteína) y *Pol* (Polimerasa) (Mahony *et al.*, 2011). A pesar de que la secuencia genética del gen *F* es utilizada para clasificar al MPVH en los dos grupos (Cerezo *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2009), el grado de conservación se ha mantenido a lo largo de los años, por ejemplo, en

nuestro diseño el porcentaje mínimo de identidad encontrado fue de 83.09 % muy parecido al 83.7% obtenido en un estudio desarrollado por Yang *et al.*, (2009), en donde se evaluó la diversidad genética del gen F. Esto nos permitió identificar regiones altamente homólogas dentro del gen de ambos grupos, facilitando el diseño de los oligonucleótidos.

Haemophilus influenzae. La selección del gen *hpd* en este diseño se basó en informes que lo señalan como una de las principales dianas para la identificación molecular de *H. Influenzae*, especialmente porque ha demostrado ser el biomarcador con mayores tasas de sensibilidad y especificidad respecto a otros genes investigados, además el gen *hpd* se encuentra de manera exclusiva en esta bacteria, incluyendo todos los serotipos capsulados así como en las cepas no tipificables (Castillo *et al*., 2011; Diallo *et al.*, 2021; Maleki *et al.*, 2020). Por otro lado, también se ha informado que la identificación de este gen permite realizar un diagnóstico diferencial con *H. haemolyticus*, una especie comensal del aparato respiratorio que comparte grandes similitudes en cuanto a morfología, bioquímica y genética con los *H. influenzae no tipificables* (Hu *et al*., 2016).

Streptococcus pyogenes. El diagnóstico molecular de *S. pyogenes* se ha propuesto mediante la amplificación del gen *spy1258*, el cual es un regulador transcripcional putativo perteneciente a la familia TetR/AcrR, que demostró ser totalmente específico para esta bacteria (Liu *et al.*, 2005). Diversos investigadores han propuesto a este biomarcador como un excelente blanco molecular, ya que en sus estudios observaron que solo se encontraba presente en los amplificados obtenidos a partir de aislados de *Streptococcus* del grupo A, y no en otras especies del género *Streptococcus*, a diferencia de cuando se utilizaban los genes *dnaseB, speB, y sof*, objetivos también utilizados en el diagnóstico (Abraham & Sistla, 2016; Khalaf *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2015). Por otra parte, también se observó en los alineamientos múltiples que es un gen muy conservado y por ello se decidió trabajar con él, además con la ayuda de BLAST se descartaron homologías con otras especies del género *Streptococcus*, asegurándose un reconocimiento específico hacia la secuencia del gen *spy*1258 de *S. pyogenes*.

Rinovirus y enterovirus. Los RV y los EV exhiben una gran similitud genómica (Fall *et al.*, 2016). La identificación molecular de ambas especies se ha enfocado en la mayoría de las veces, en el reconocimiento de la región no codificante 5’UTR por ser una zona altamente conservada y que proporciona una alta sensibilidad a los ensayos moleculares (Silva *et al.*, 2012). Sin

embargo, debido a la gran similitud entre ambas especies, resultó algo complejo establecer una diferenciación entre ellas, presentándose ciertos inconvenientes respecto a la especificidad y diseño de los primers. Por una parte, a pesar de que la región 5'UTR es muy conservada entre los rinovirus, se observó que esta presentaba una alta hipervariabilidad genética (Figura 6), ya que durante la construcción de los alineamientos se apreció la formación de gaps (huecos) entre las bases alineadas. Este fenómeno ha sido descrito anteriormente en diversos artículos, en los cuales se menciona que las especies del género *Enterovirus* constantemente sufren inserciones o deleciones de bases en la región 5'UTR como resultado de un proceso de recombinación genética (Bouzid *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2022). Esto nos llevó a la obtención de amplicones con tamaños de entre 386 y 395 pb, que, aunque pareciera ser un problema para su identificación en el corrimiento electroforético, su tamaño no implicó mayor desafío durante la visualización *in sílico* en una electroforesis en gel de agarosa, además es importante mencionar que a pesar de la presencia de esta hipervariabilidad genética, fue posible diseñar dos primers universales con la capacidad de reconocer a las especies A, B y C de RV.

Por otro lado, el diagnóstico de los EV se basó solo en la identificación del EV-D68 por ser un virus emergente conocido por causar infecciones graves del tracto respiratorio inferior, y, al igual que el RV su diagnóstico también se dirigió a la región 5'UTR. El análisis in sílico realizado no mostró homología entre los primers de EV respecto a la secuencia de la región 5'UTR de RV, no siendo el mismo caso para los primers de RV, los cuales si mostraron cierta homología para otras especies del género *Enterovirus*.

En la literatura, la reactividad cruzada entre RV y EV no es infrecuente (Andrés *et al.*, 2019; Jansen *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2008), de hecho, muchas pruebas moleculares detectan a ambos virus sin hacer una distinción entre ellos (Biomérieux, 2022; Marcone *et al*., 2015), e inclusive, se ha sugerido que la especificidad completa para RV y EV no es posible debido a la similitud entre sus secuencias y como resultado de recombinaciones en la región 5´UTR (Nikolaidis *et al.*, 2019; Tapparel *et al.*, 2009).

Streptococcus pneumoniae. Se ha señalado al gen *lytA* como un excelente biomarcador en el diagnóstico molecular de *S. pneumoniae*, debido a la presencia ubicua y específica en todos los serotipos capsulares conocidos, así como en los neumococos no tipificables (Diallo *et al.*, 2021). Estudios comparativos han utilizado a los genes *piaB* (permeasa del transportador *pia* ABC),

ply (Neumolisina) y *psaA* (adhesina A de la superficie neumocócica) como blancos de diagnóstico, sin embargo, los resultados arrojan valores menos específicos en comparación con *lytA* (Sanz *et al.*, 2018; Tavares *et al*., 2019; Wyllie *et al.*, 2017). A pesar de que se ha señalado la presencia de este gen en otras especies relacionadas, hasta el momento, es el único biomarcador capaz de brindar los resultados más confiables y seguros (Wyllie *et al.*, 2017). Los alineamientos realizados en BLAST arrojaron que los primers diseñados fueron 100% específicos con las secuencias del gen *lytA* de las especies de *S. pneumoniae* disponibles en la base de datos de BLAST.

Virus sincitial respiratorio. El gen *N* ha sido el foco de la mayoría de los métodos de RT-PCR porque es uno de los más transcritos, lo que podría explicar una mejor sensibilidad, y uno de los más conservados dentro del genoma del VSR, lo que explica una mayor especificidad (Agustiningsih, 2021; Do *et al.*, 2012; Eboigbodin *et al.*, 2017; Eugene *et al.*, 1998). Estas características fueron la base de la elección del gen en esta prueba, lo cual permitió que los oligonucleótidos diseñados identificaran de manera universal y simultánea a los subgrupos A y B del VSR.

Virus de la parainfluenza humana 1 - 4. Dado que estos 4 virus pertenecen a dos géneros diferentes; HPIV 1 y HPIV-3 pertenecen al género *Respirovirus* y HPIV-2 junto con HPIV-4 pertenecen al género Ortho*rubulavirus* (Cordey *et al*., 2009), la alineación para la búsqueda de una región conservada no permitió señalar ninguna región común entre los genomas de las cuatro especies de HPIV. Después de un análisis completo realizado al genoma de cada una de las especies de HPIV, se identificó una zona conservada dentro del gen *L2*. El reto inicial fue construir primers específicos para cada especie, siempre y cuando generaran un amplicón con un tamaño similar, no mayor a 10 pb de diferencia entre ellos, ya que el objetivo principal de nuestra prueba fue el diseño con fines diagnósticos y no epidemiológicos. Durante el alineamiento, se logró identificar una región del gen *L2* con cierto grado de homología entre las especies 1 y 3 que nos permitió el diseño de 1 par de primers con la capacidad para identificar de manera simultánea a ambas especies, sin embargo, es importante aclarar que el diseño se tuvo que hacer con una degeneración de 1 base para el primer sentido y en 2 bases para el primer antisentido (Figura 7). A pesar de que el HPIV-2 y el HPIV-4 pertenecen al mismo género no se encontró una región común entre ambos, por lo que se tuvo que hacer un diseño individual

para cada uno. Al final se obtuvieron 3 pares de oligonucleótidos cuyos amplicones generados se mantuvieron en un tamaño de entre 569 y 574 pb, cumpliendo con el objetivo planteado al inicio.

Ahora bien, respecto a los primers degenerados, se sabe que su presencia contribuye a reducir la sensibilidad de una prueba molecular al disminuirse la concentración efectiva de cada uno de ellos. Este problema surge como resultado del proceso de fabricación en el cual se deben incluir las combinaciones necesarias de cada oligonucleótido de acuerdo con la cantidad de bases degeneradas presentes en la secuencia. Sin embargo, en nuestro caso, el número máximo de combinaciones en ambos primers fue de 2, un número relativamente pequeño, además si se toma en cuenta que para el *primer* sentido la base degenerada no se encuentra en el extremo 3'OH, si no cerca del extremo 5', la posibilidad de que cualquiera de las dos combinaciones pueda reconocer a la región del gen *L2* es alta, entonces podría incluso considerarse que la pérdida de sensibilidad podría ser insignificante, no obstante, será necesario evaluar estas condiciones en la fase experimental de este gen para establecer si la concentración podría tener efectos directos en la sensibilidad de la prueba.

Elección del control positivo de la técnica

Aunque en este momento el diseño de la prueba no implica desarrollar la fase experimental, si fue necesario introducir un gen control con el objetivo de evaluar la calidad de la muestra, así como el correcto funcionamiento de la prueba molecular una vez que se lleve a cabo el proceso de estandarización. Por ello se seleccionó el gen *HBB* encargado de codificar a la subunidad beta de la hemoglobina humana, ya que es uno de los tantos genes constitutivos o Housekeeping que pueden ser utilizados como control positivo durante la fase de amplificación de la técnica. En general, estos genes se expresan de manera constante y están implicados en la función básica de la célula (Yang *et al*., 2015), por lo que la no amplificación de estos durante la fase experimental estaría indicando una mala calidad de la muestra o bien de errores técnicos de la prueba molecular. De esta manera será posible tener un control interno adecuado para la correcta implementación en un futuro de nuestra PCR multiplex en el laboratorio.

Elección de bases de datos y alineamiento de las secuencias

La elección adecuada de las bases de datos representó un punto clave en el diseño de la prueba molecular. Las plataformas utilizadas en este trabajo fueron GenkBank y GISAID.

GenBank pertenece al NCBI y es la base de datos más utilizada en la investigación científica. Dicha plataforma trabaja de manera conjunta con el Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA) y el Banco de datos de ADN de Japón (DDBJ), por lo que contiene una amplia colección de secuencias de nucleótidos a las que se puede acceder de manera gratuita y sencilla (Sayers *et al.*, 2019). Estas características facilitaron el trabajo y búsqueda de la mayoría de las secuencias utilizadas en este proyecto.Por otra parte, GISAID es una iniciativa global donde se comparten datos genéticos del SARS-CoV-2. A diferencia del GenBank, GISAID permite la consulta y análisis de secuencias de cada una de las variantes del coronavirus identificadas en nuestro país, representando una ventaja para nuestro diseño, lo cual no fue posible de realizar con las secuencias de los demás microorganismos obtenidas del GenBank, debido a la escasa investigación realizada en México. Sin embargo, esto no representó mayor problema al trabajar y enforcar el diseño a las regiones mejor conservadas dentro del genoma de los patógenos seleccionados en el presente trabajo.

Ahora bien, es importante aclarar que no existe información consenso que determine el número de secuencias genéticas necesario para la construcción de alineamientos múltiples dirigidos al diseño de pruebas moleculares. Nuestro análisis determinó que 20 secuencias genéticas fueron suficientes para la construcción de los alineamientos en la mayor parte de los biomarcadores, pues se observó este número abarcó la mayor cantidad de variaciones genéticas existentes dentro de cada patógeno seleccionado, sin embargo, para el caso del RV se observó que debido al fenómeno de recombinación genética descrito anteriormente, fue necesario incluir alrededor de 30 secuencias, para abarcar la mayor cantidad de variantes genéticas existentes dentro de las 3 especies.

A continuación, se presentan los alineamientos construidos en la plataforma Clustal Omega para el gen *L2* del AdV, la región no codificante 5’UTR del RV, así como el gen *L* de las especies 1 y 3 del HPIV. Como se puede observar, en todos los alineamientos se identificaron regiones conservadas que se utilizaron para el posterior diseño de los primers. Estas zonas se reconocieron por la presencia del signo * ubicado debajo de las bases alineadas. La ausencia de este signo nos indicó la presencia de variaciones nucleotídicas a lo largo de la secuencia genética alineada, mientras que la presencia de deleciones o inserciones de bases en alguna secuencia se identificó por la aparición de gaps (signo -). Cada una de las regiones reconocidas por los

primers sentido y antisentido se señalaron en color amarillo y verde respectivamente. Los alineamientos realizados para los demás biomarcadores pueden ser consultados en el anexo 2 del presente documento. Se observó que el porcentaje mínimo de homología para la mayoría de las secuencias alineadas para cada biomarcador se ubicó alrededor del 80 %, a excepción de la región 5'UTR del RV, cuyo porcentaje osciló alrededor del 52 %. La descripción detallada con las características fisicoquímicas de cada oligonucleótido se presenta más adelante en la Tabla 6.

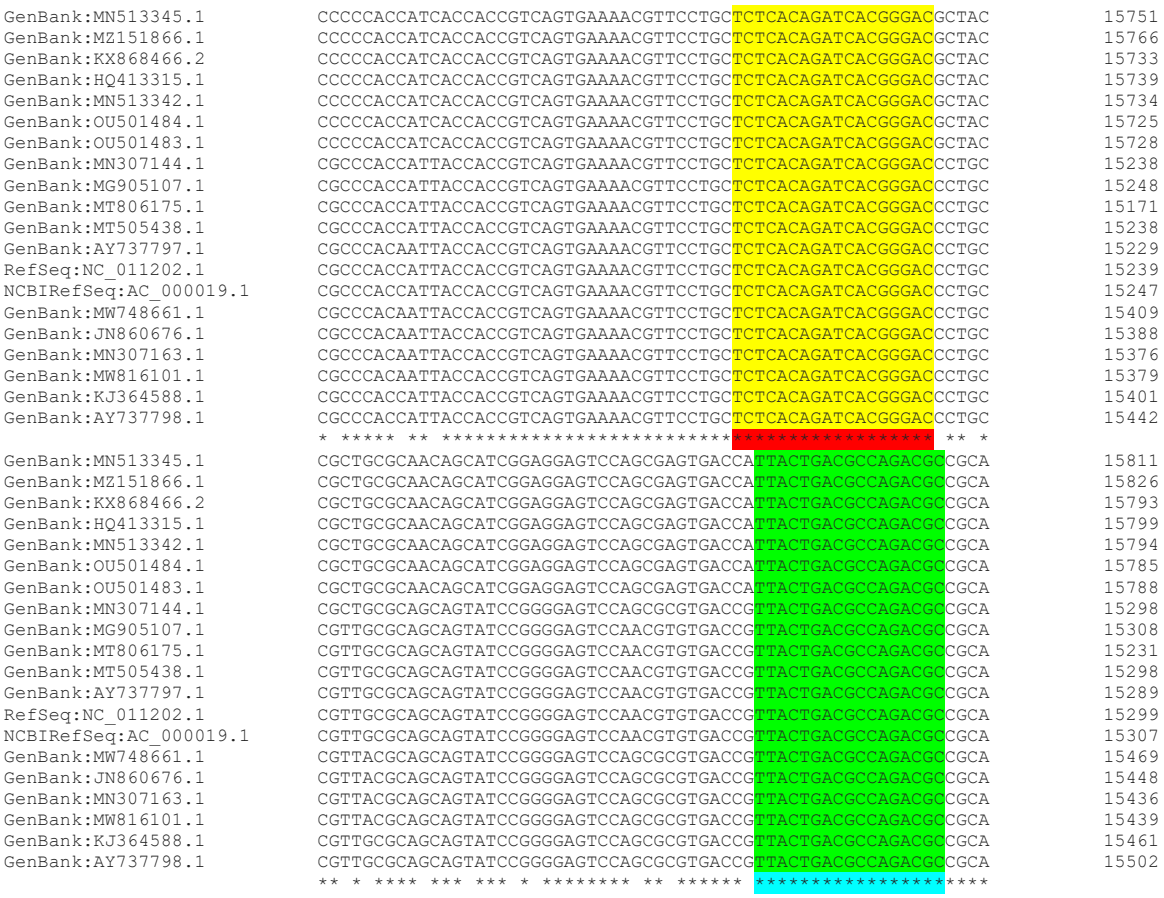
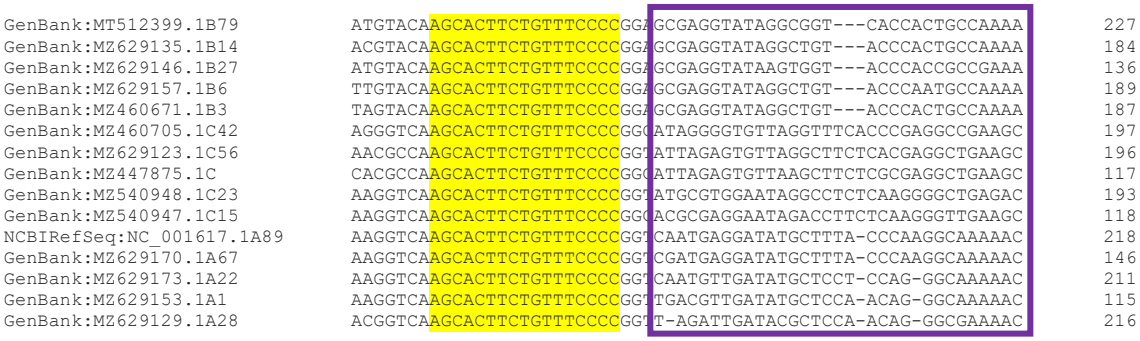


Figura 5. *Alineamiento de la secuencia del gen L2 del adenovirus.* Se observa el alineamiento múltiple de 20 secuencias del gen L2 de las especies B, C y E de los adenovirus respiratorios.



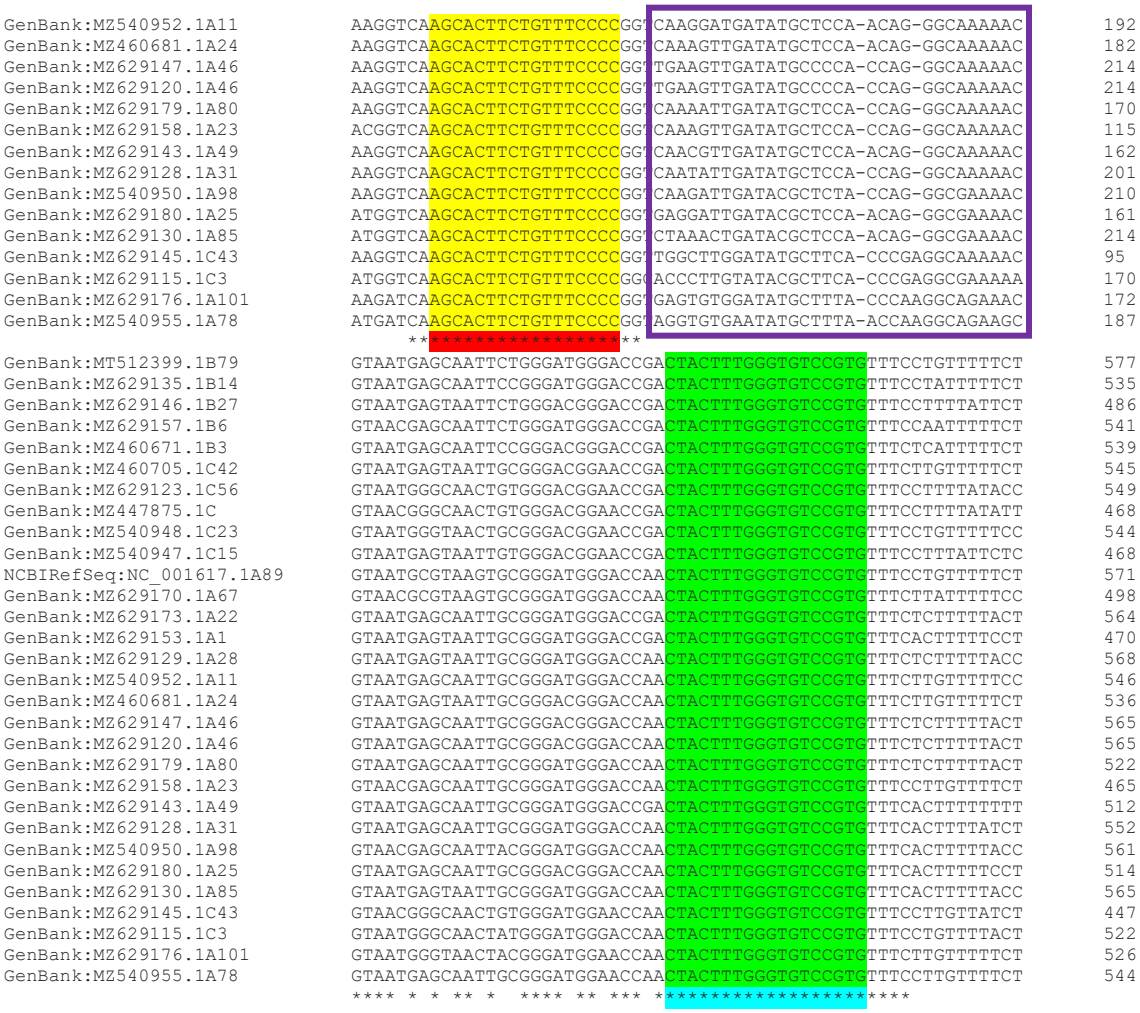


Figura 6. *Alineamiento de la secuencia de la región 5'UTR del rinovirus.* El alineamiento múltiple presentado está formado por 30 secuencias genéticas de las 3 especies de rinovirus existentes (-A, -B, -C). Se puede observar una zona de hipervariabilidad genética entre los primers diseñados señalada en color morado.

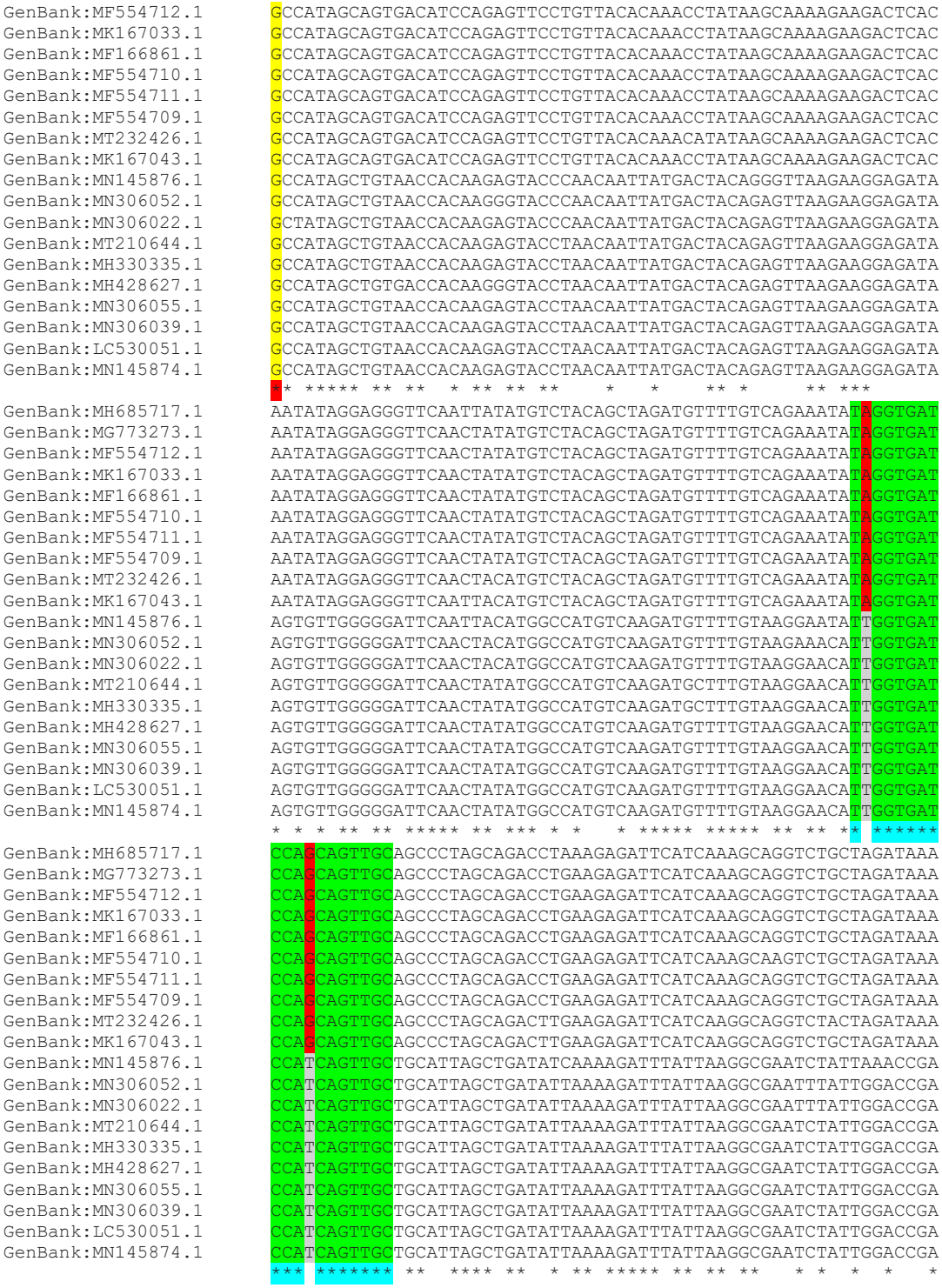


Figura 7. *Alineamiento de la secuencia del gen L del virus de la parainfluenza humana 1-3.* Debido a las variaciones genéticas entre ambas especies, los primers se diseñaron con la particularidad de ser de tipo degenerados. La posición de las bases degeneradas se señala en color rojo y gris dentro de la secuencia de los primers. El primer sentido presenta una degeneración en una sola base, mientras que el primer antisentido la presenta en 2 bases.

Diseño de primers

Uno de los puntos clave para la correcta optimización y estandarización de la PCR múltiplex, parte en el diseño cuidadoso y delicado de los primers, por lo que fue necesario seguir una serie de pautas y recomendaciones ya establecidas con el fin de lograr un éxito en la futura implementación experimental, que, aunque no es objetivo de este proyecto, si es necesario para el adecuado diseño *in sílico* de la prueba. La construcción de los primers se llevó a cabo en el programa Oligo Explorer 1.5 tomando como base los puntos descritos en la Tabla 3.

Para lograr una identificación y discriminación adecuada en una electroforesis en gel de agarosa, cada par de oligonucleótidos fue diseñado para generar amplicones con al menos 20 bases de diferencia entre ellos, además, con el objetivo de reducir los tiempos durante la fase de amplificación se buscó generar amplificados con tamaños no mayores a 1 kb. Por otro lado, se fijó la Tm a una temperatura no mayor a 2 °C de diferencia entre todo el conjunto de primers con el fin de ajustar el proceso a una reacción simultánea. La Tabla 6 resume las características principales de cada uno de los primers construidos.

Tabla 6. *Características fisicoquímicas de los primers diseñados para la PCR multiplex*

Agente etiológico	Primers 5'→3'	Tamaño nt	Tm °C	%GC	ΔG (kCal/mol)	Tamaño amplicón	Biomarcador de interés
Adenovirus	F-TCTCACAGATCACGGGAC	18	57.6	55.6	-38.0	79	*L2*
	R-GCGTCTGGCGTCAGTAA	17	58.2	58.8	-35.6		
Humano (*CPT)	F-CCTTGAGCATCTGGATTCTG	20	57.3	50.0	-38.9	101	*HBB*
	R-CTCCCACATTCCCTTTTTAGT	21	57.1	42.9	-38.5		
SARS-CoV-2	F-CGCTTTCTTATTACAAATTGGGAG	24	56.0	37.5	-40.2	120	*M*
	R-CACTGCTACTGGAATGGTC	19	57.8	52.6	-38.0		
Virus de la influenza A	F-ATGAGTCTTCTAACCGAGGT	20	57.3	45.0	-38.2	148	*M*
	R-GTCTTGTCTTTAGCCATTCCA	21	56.8	42.9	-39.4		
Mycoplasma pneumoniae	F-CCGTGTTGATTTGAGAAGCC	20	57.3	50.0	38.5	180	*mpn372*
	R-ACATATTCCCGTAACCAGC	19	57.0	47.4	-36.2		
Metapneumovirus humano	F-GCAAAGTCAGCACAGGAAG	19	57.6	52.6	-37.7	226	*F*
	R-ACATGCTGTTCACCCTCAA	19	57.5	47.4	-38.0		
Haemophilus influenzae	F-GCCCTTTCTTTATTAGCAGC	20	56.7	45.0	-36.7	259	*hpd*
	R-CAACATCAGTCAAGCCATCTA	21	56.3	42.9	-39.4		
Streptococcus pyogenes	F-CAAAAGACATACTGAAACCAAAGC	24	56.0	38.0	-41.3	309	*spy1258*
	R-TAAGAAATAGTAGCGAGTGCG	21	56.2	42.9	-37.4		
Virus de la influenza B	F-AGAAGATGGAGAAGGCAAAG	20	56.2	45.0	-37.5	344	*M*
	R-CCATGAGACAGTATAGTAGCG	21	57.8	47.6	-39.2		
Rinovirus	F-AGCACTTCTGTTTCCCC	17	56.1	52.9	-34.3	386-395	*Región 5'UTR*
	R-CACGGACACCCAAAGTAG	18	56.9	55.6	-35.4		
Enterovirus D68	F-TACGCCTGTTTTATCTCCC	19	56.6	47.4	-36.3	440	*Región 5'UTR*
	R-CGACAAGCAACTCACTGG	18	56.2	55.6	-35.6		
Streptococcus pneumoniae	F-ACACGCACACTCAACTGG	18	58.1	55.6	-36.8	476	*lytA*
	R-CATTCTTCTGCCAGCCTG	18	57.4	55.6	-36.2		

Continuación

Agente etiológico	Primers 5'→3'	Tamaño nt	Tm °C	%GC	ΔG (kCal/mol)	Tamaño amplicón	Biomarcador de interés
Virus sincitial respiratorio	F-GGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	20	57.0	45.0	-37.6	532	*N*
	R-ACCTGATCTATCTCCTGC	18	56.2	50.0	-36.0		
Virus de la parainfluenza humana 1-3	F-GGTCCAAGGAGACAATCAAG (1) F-GGTTCAAGGAGACAATCAAG (3) F-GGTYCAAGGAGACAATCAAG	20 20	57.5 54.4	50.0 45.0	-39.2 -37.0	570	*L*
	R-GCAACTGCTGGATCACCTA (1) R-GCAACTGATGGATCACCAA (3) R-GCAACTGMTGGATCACCWA	19 19	59.6 56.0	52.6 47,4	-39.4 -37.6		
Virus de la parainfluenza humana 2	F-GCATCAAAGTTCTCGTCAGC	20	57.2	50.0	-39.0	574	*L*
	R-AGATTCTCTCACTTTACCTGC	21	56.6	42.9	-39.2		
Virus de la parainfluenza humana 4	F-GTGGTGCTTCTATGACATTGA	21	56.5	42.9	-39.9	569	*L*
	R-TAAGTCAGAAAACCAGCCATC	21	56.8	42.9	-39.4		

Nota: * CPT: Control positivo de la técnica

Otro punto importante que se tomó en consideración durante el diseño de los primers fue el cálculo de la Tm. Existen numerosos métodos para determinar este parámetro, por ejemplo, es muy común utilizar el método básico que se basa en el contenido de Guanina y Citocina de los primers, el método ajustado a la sal que se relaciona con la concentración de los cationes presentes en la mezcla de reacción o bien el método Nearest Neighbor (NN) que utiliza parámetros termodinámicos.

A pesar de que se ha informado la existencia de una diferencia significativa entre utilizar uno u otro, no se ha podido establecer con claridad cual método es mejor (Panjkovich & Melo, 2005), ya que al final la temperatura de alineamiento se determina de manera experimental. Sin embargo, en dos estudios llevados a cabo por Panjkovich & Melo (2005) y Robertson & Walsh-Weller (1998), se encontró que el método NN presentaba valores de predicción más cercanos a la temperatura de alineamiento experimental en comparación con los otros dos métodos, debido en gran parte a que este utiliza parámetros termodinámicos relacionados con la estructura y composición de las bases que conforman a los oligonucleótidos. Esto resulta muy importante, ya que al establecer una Tm más precisa, es posible lograr un ahorro de tiempo y de reactivos durante la estandarización del gradiente para determinar la temperatura de alineamiento experimental. Estos motivos llevaron a la elección del programa Oligo Explorer 1.5, ya que este cuenta con los algoritmos necesarios para arrojar el valor de la Tm utilizando el método NN, lo cual podría ser de gran ayuda para la futura implementación experimental.

Análisis de dímeros y estructuras secundarias de los primers

Evitar la formación de dímeros y estructuras secundarias entre los primers fue imposible debido a la complejidad en el diseño de la PCR Multiplex. De hecho, la formación de estas estructuras resultó ser el principal problema durante la construcción de los primers pues se ha investigado que su presencia suele promover una competición por la ADN polimerasa y los dNTPs, suprimiendo la amplificación del ADN o ARN objetivo.

Para evaluar posibles complicaciones en el diseño, se realizó un análisis simultáneo de todo el conjunto de primers utilizando el programa Oligo Analizer 1.5, poniendo especial atención a los valores de ΔG a la que se formaban dichas estructuras. Se encontró que la mayoría presentaban una ΔG por debajo de -10 kcal/mol, esto nos hace saber que existe la probabilidad de que se formen estas estructuras no deseables pero a la vez también nos indica que son termodinámicamente inestables y que aunque contribuyen a disminuir la concentración efectiva de los primers, suelen desintegrase en segundos, por lo cual dichos valores se consideran aceptables en una PCR (ResearchGate, 2017), sin embargo, también se encontraron algunas estructuras con ΔG entre -10 y -12 Kcal/mol, lo cual si puede representar un problema en la fase experimental de la prueba, y por ello, en estos casos se recomienda considerar el diseño de nuevos primers, una opción no viable en este diseño, debido la cantidad de oligonucleótidos diseñados.

Para estos casos y, aunque el alcance de este diseño no implica observar el comportamiento experimental de los primers, es necesario establecer recomendaciones técnicas que permitan reducir o eliminar estas interferencias. Por ejemplo, la implementación de una PCR multiplex de arranque en caliente suele ser la mejor opción para disminuir el cebado inespecífico y la formación de estructuras secundarias, además se pueden utilizar aditivos como Dimetil Sulfóxido (DMSO), glicerol, formamida y betaína, en los cuales se ha visto que mejoran significativamente las reacciones de PCR Multiplex más difíciles, al relajar el DNA, y facilitar la desnaturalización de la plantilla, evitando la formación de horquillas y dímeros entre los primers (Green & Sambrook, 2019; Henegariu *et al.*, 1997; Markoulatos *et al*., 2002). En conjunto, estas recomendaciones pueden ser de gran utilidad durante la fase experimental, para evitar las complicaciones que resulten de la interacción entre los primers.

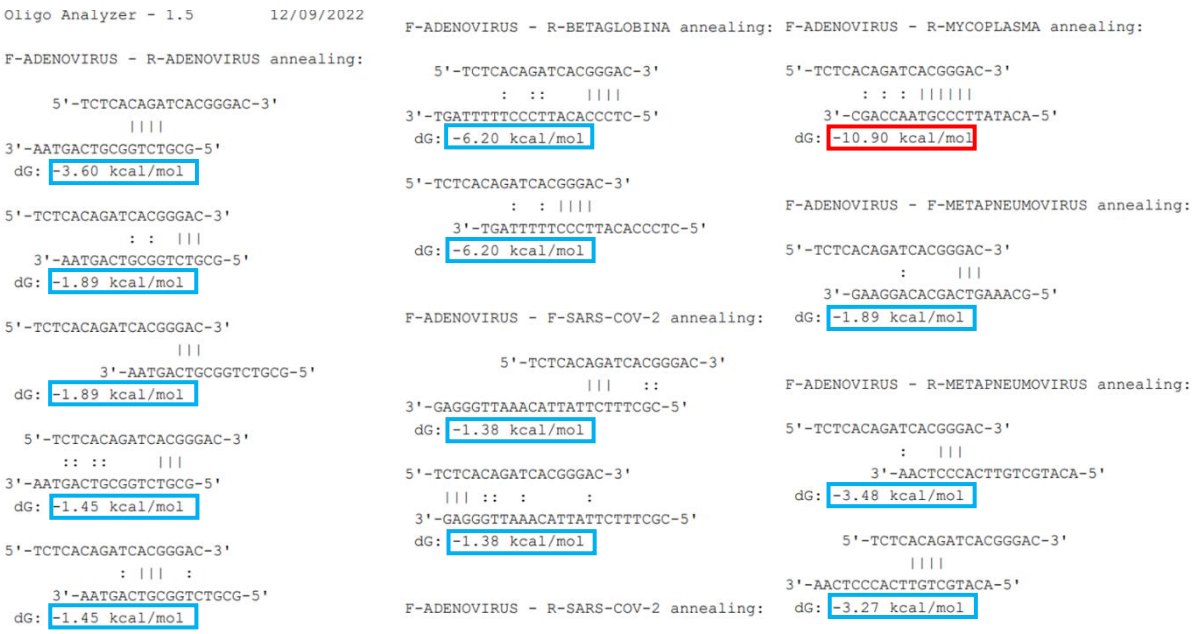


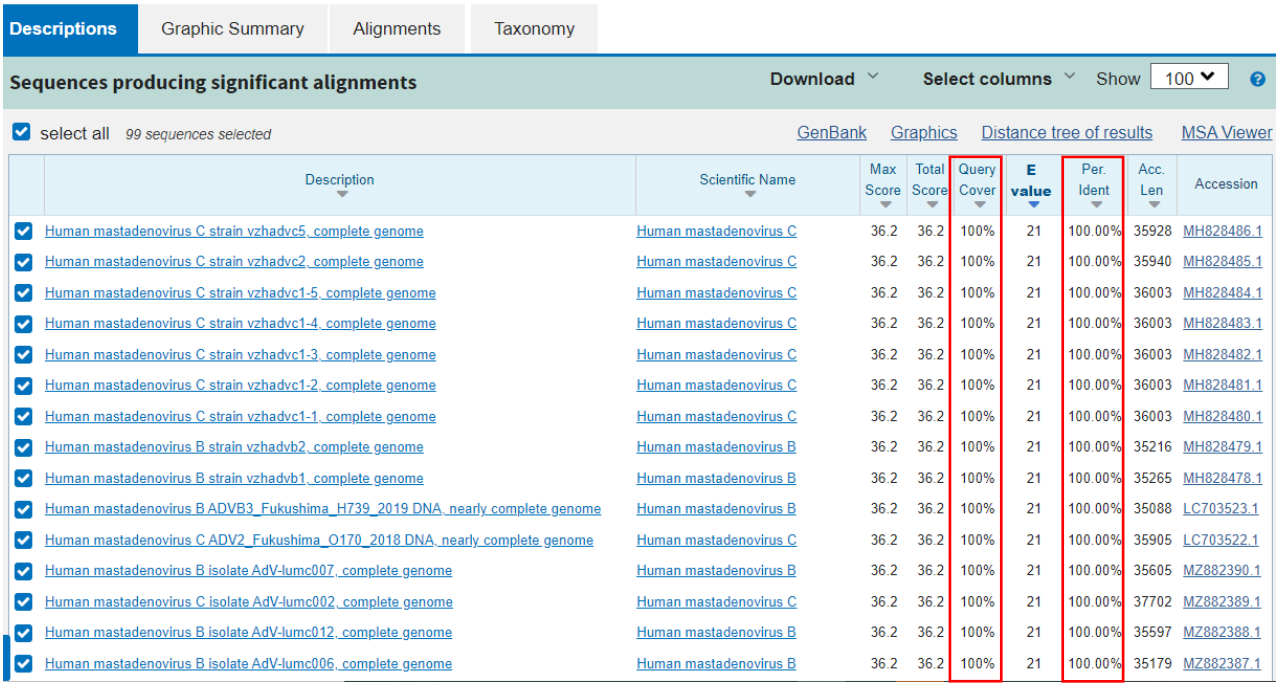
Figura 8. *Análisis de dímeros y estructuras secundarias de los primers.* Se muestra un fragmento del análisis realizado en Oligo Analizer 1.5 a las interacciones que ocurren entre los primers diseñados para esta prueba. Se logra observar como la mayoría de estas interacciones se desarrollan por debajo de -10 kcal/mol (Interacciones débiles / recuadros azules) a excepción de lo ocurrido entre el primer sentido de AdV y el primer antisentido de *M. penumoniae*, cuya interacción ocurre a -10.90 kcal/mol (Interacciones fuertes / recuadro rojo).

Verificación de la especificidad de los primers en BLAST

Verificar la especificidad de los primers para descartar alineamientos inespecíficos con otras secuencias genéticas representó uno de los puntos más importantes, ya que sobre este análisis recae el éxito o fracaso del diseño de la prueba.

Cada uno de los primers fue sometido a un alineamiento local en la plataforma BLAST utilizando la base de datos de secuencias nucleotídicas del NCBI. Durante este procedimiento cada oligonucleótido se comparó y alineó con cientos de secuencias genéticas disponibles en la plataforma (Figura 9). Una vez realizado el análisis, se prestó mucha atención a los valores arrojados en el alineamiento, específicamente a los del Porcentaje de identidad y del Query cover. El primer valor hace referencia al porcentaje de similitud que existe entre dos secuencias (para este caso la secuencia del primer y las secuencias de la base de datos), mientras que el segundo indica el porcentaje de las bases del oligonucleótido que se alinearon a lo largo de las secuencias disponibles en BLAST. En ambos casos el valor obtenido para todos los primers diseñados fue del 100 % y además no se encontraron alineamientos inespecíficos, lo cual nos

habla de la especificidad que podría esperarse de la prueba. Sin embargo, hubo una notable excepción con respecto a los primers dirigidos a la identificación de las especies del RV, que a pesar de que se obtuvieron los valores esperados en ambos parámetros, el análisis también demostró homología frente a otras especies del género *Enterovirus*. Este problema era de esperarse debido a la recombinación genética descrita anteriormente y por los resultados obtenidos en otros estudios similares. En este punto es necesario aclarar que, si bien existe esta inespecificidad, durante los alineamientos se observó que tanto el reconocimiento del primer sentido como el del primer antisentido no se dio dentro de las mismas secuencias en las que presentaron homología (Figuras 10 y 11), por lo tanto, se puede concluir que al menos *in sílico*, no existe la posibilidad de que puedan aparecer falsos positivos. Sin embargo, es importante que no se descarte la posibilidad de que durante la fase húmeda o experimental de la prueba se pueda dar la aparición de falsos positivos ya que existe una gran cantidad de especies y serotipos que aún no han sido identificados o secuenciados dentro del género *Enterovirus* y que por lo tanto si pudieran en algún momento ser reconocidos por ambos oligonucleótidos.



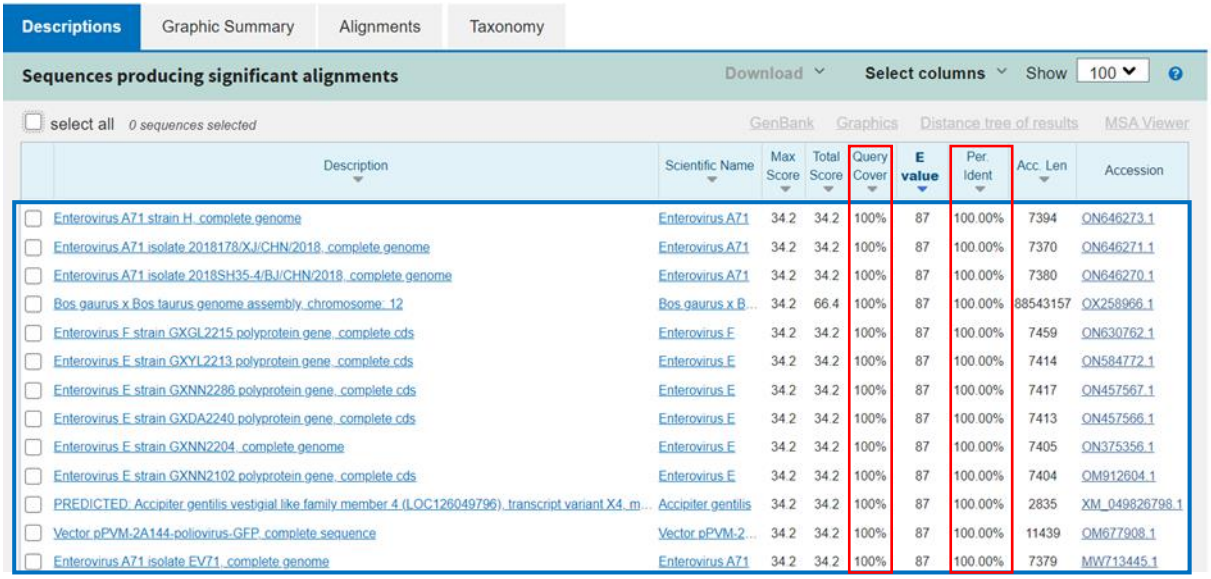
Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

select all *99 sequences selected* — GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Human mastadenovirus C strain vzhadvc5, complete genome	Human mastadenovirus C	36.2	36.2	100%	21	100.00%	35928	MH828486.1
Human mastadenovirus C strain vzhadvc2, complete genome	Human mastadenovirus C	36.2	36.2	100%	21	100.00%	35940	MH828485.1
Human mastadenovirus C strain vzhadvc1-5, complete genome	Human mastadenovirus C	36.2	36.2	100%	21	100.00%	36003	MH828484.1
Human mastadenovirus C strain vzhadvc1-4, complete genome	Human mastadenovirus C	36.2	36.2	100%	21	100.00%	36003	MH828483.1
Human mastadenovirus C strain vzhadvc1-3, complete genome	Human mastadenovirus C	36.2	36.2	100%	21	100.00%	36003	MH828482.1
Human mastadenovirus C strain vzhadvc1-2, complete genome	Human mastadenovirus C	36.2	36.2	100%	21	100.00%	36003	MH828481.1
Human mastadenovirus C strain vzhadvc1-1, complete genome	Human mastadenovirus C	36.2	36.2	100%	21	100.00%	36003	MH828480.1
Human mastadenovirus B strain vzhadvb2, complete genome	Human mastadenovirus B	36.2	36.2	100%	21	100.00%	35216	MH828479.1
Human mastadenovirus B strain vzhadvb1, complete genome	Human mastadenovirus B	36.2	36.2	100%	21	100.00%	35265	MH828478.1
Human mastadenovirus B ADVB3_Fukushima_H739_2019 DNA, nearly complete genome	Human mastadenovirus B	36.2	36.2	100%	21	100.00%	35088	LC703523.1
Human mastadenovirus C ADV2_Fukushima_O170_2018 DNA, nearly complete genome	Human mastadenovirus C	36.2	36.2	100%	21	100.00%	35905	LC703522.1
Human mastadenovirus B isolate AdV-lumc007, complete genome	Human mastadenovirus B	36.2	36.2	100%	21	100.00%	35605	MZ882390.1
Human mastadenovirus C isolate AdV-lumc002, complete genome	Human mastadenovirus C	36.2	36.2	100%	21	100.00%	37702	MZ882389.1
Human mastadenovirus B isolate AdV-lumc012, complete genome	Human mastadenovirus B	36.2	36.2	100%	21	100.00%	35597	MZ882388.1
Human mastadenovirus B isolate AdV-lumc006, complete genome	Human mastadenovirus B	36.2	36.2	100%	21	100.00%	35179	MZ882387.1

Figura 9. *Verificación de la especificidad del primer sentido del adenovirus.* En la imagen se logra apreciar la especificidad que presenta el primer diseñado frente a las especies B, C y E del AdV. No se identificaron alineamientos inespecíficos con secuencias de otros organismos. Los porcentajes de identidad y Query Cover (resaltados en color rojo) arrojaron valores del 100%, indicando que el primer contiene una secuencia de nucleótidos idéntica a AdV y por lo tanto existe un alineamiento completo a lo largo de todas las bases.



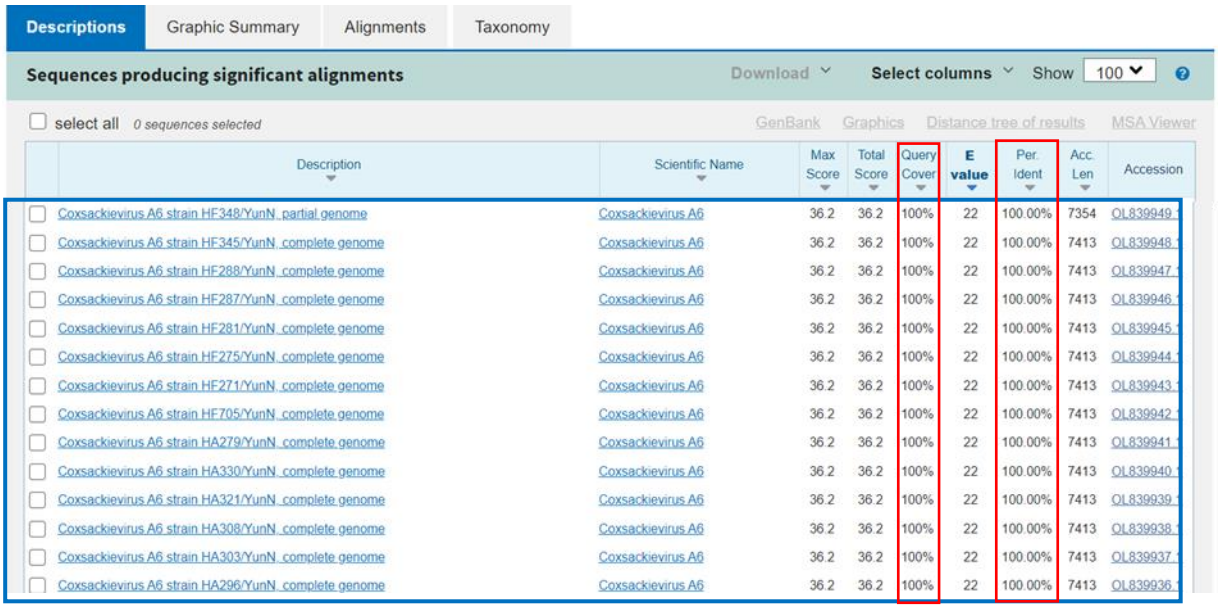
Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

select all 0 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Enterovirus A71 strain H, complete genome	Enterovirus A71	34.2	34.2	100%	87	100.00%	7394	ON646273.1
Enterovirus A71 isolate 2018178/XJ/CHN/2018, complete genome	Enterovirus A71	34.2	34.2	100%	87	100.00%	7370	ON646271.1
Enterovirus A71 isolate 2018SH35-4/BJ/CHN/2018, complete genome	Enterovirus A71	34.2	34.2	100%	87	100.00%	7380	ON646270.1
Bos gaurus x Bos taurus genome assembly, chromosome: 12	Bos gaurus x B...	34.2	66.4	100%	87	100.00%	88543157	OX258966.1
Enterovirus E strain GXGL2215 polyprotein gene, complete cds	Enterovirus E	34.2	34.2	100%	87	100.00%	7459	ON630762.1
Enterovirus E strain GXYL2213 polyprotein gene, complete cds	Enterovirus E	34.2	34.2	100%	87	100.00%	7414	ON584772.1
Enterovirus E strain GXNN2286 polyprotein gene, complete cds	Enterovirus E	34.2	34.2	100%	87	100.00%	7417	ON457567.1
Enterovirus E strain GXDA2240 polyprotein gene, complete cds	Enterovirus E	34.2	34.2	100%	87	100.00%	7413	ON457566.1
Enterovirus E strain GXNN2204, complete genome	Enterovirus E	34.2	34.2	100%	87	100.00%	7405	ON375356.1
Enterovirus E strain GXNN2102 polyprotein gene, complete cds	Enterovirus E	34.2	34.2	100%	87	100.00%	7404	OM912604.1
PREDICTED: Accipiter gentilis vestigial like family member 4 (LOC126049796), transcript variant X4, m...	Accipiter gentilis	34.2	34.2	100%	87	100.00%	2835	XM_049826798.1
Vector pPVM-2A144-poliovirus-GFP, complete sequence	Vector pPVM-2...	34.2	34.2	100%	87	100.00%	11439	OM677908.1
Enterovirus A71 isolate EV71, complete genome	Enterovirus A71	34.2	34.2	100%	87	100.00%	7379	MW713445.1

Figura 10. *Verificación de la especificidad del primers sentido del rinovirus.* En la figura se presentan los reconocimientos inespecíficos por parte del primer sentido del RV hacia otras secuencias genéticas pertenecientes a especies de EV.



Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

select all 0 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Coxsackievirus A6 strain HF348/YunN, partial genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7354	OL839949.1
Coxsackievirus A6 strain HF345/YunN, complete genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7413	OL839948.1
Coxsackievirus A6 strain HF288/YunN, complete genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7413	OL839947.1
Coxsackievirus A6 strain HF287/YunN, complete genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7413	OL839946.1
Coxsackievirus A6 strain HF281/YunN, complete genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7413	OL839945.1
Coxsackievirus A6 strain HF275/YunN, complete genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7413	OL839944.1
Coxsackievirus A6 strain HF271/YunN, complete genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7413	OL839943.1
Coxsackievirus A6 strain HF705/YunN, complete genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7413	OL839942.1
Coxsackievirus A6 strain HA279/YunN, complete genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7413	OL839941.1
Coxsackievirus A6 strain HA330/YunN, complete genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7413	OL839940.1
Coxsackievirus A6 strain HA321/YunN, complete genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7413	OL839939.1
Coxsackievirus A6 strain HA308/YunN, complete genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7413	OL839938.1
Coxsackievirus A6 strain HA303/YunN, complete genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7413	OL839937.1
Coxsackievirus A6 strain HA296/YunN, complete genome	Coxsackievirus A6	36.2	36.2	100%	22	100.00%	7413	OL839936.1

Figura 11. *Verificación de la especificidad del primers antisentido del rinovirus.* En la Figura 24 y 25 se señala en un recuadro azul el reconocimiento inespecífico por parte de los primers dirigidos al reconocimiento del RV hacia otras especies del género *Enterovirus*. Como se lograr apreciar el alineamiento presenta valores del 100% tanto para el Porcentaje de Identidad como para el Query Cover, sin embargo, es muy importante aclarar que este reconocimiento no es sobre las mismas secuencias genéticas.

Diseño del control positivo

Utilizando el programa SnapGene se diseñó un plásmido recombinante como propuesta para control positivo de la prueba (CPP) y control positivo de la técnica (CPT). El diseño se llevó a cabo mediante el corte y ligado *in sílico* del vector de clonación pJET1.2 y un constructo elaborado a partir de las secuencias de los biomarcadores y del gen de la subunidad beta de la hemoglobina humana. El diseño del constructo se realizó a partir de un perfil de restricción realizado a cada una de las secuencias blanco mediante la plataforma NEBCutter 2.0.

Utilizando solo el paquete de enzimas de *New England BioLabs® Inc*, se eligieron a todas aquellas que no cortaran dentro de la secuencia y que además contaran con un sitio de corte específico (Figura 12). Del conjunto de enzimas elegidas, se seleccionaron a aquellas cuya actividad de corte fuera de un 100% utilizando el buffer *rCutSmart™* de la misma casa comercial. La elección de este tapón se decidió entre otras cosas debido a que permite la actividad conjunta máxima de muchas enzimas, lo que facilita y optimiza la configuración de la reacción que se propone en este diseño pues evita el uso de diferentes buffers y por lo tanto se pueden disminuir los costos de su construcción.

	Rinovirus	S. pneumoniae	Enterovirus-D68	SARS-COV-2	S. pyogenes	Influenza B	VSR	H. Influenzae	Mycoplasma	Influenza A	Metapne
2	AatII (G_ACGT^C)	AatII (G_ACGT^C)	AatII (G_ACGT^C)	AatII (G_ACGT^C)	AatII (G_ACGT^C)	AatII (G_ACGT^C)	AatII (G_ACGT^C)	AatII (G_ACGT^C)	AatII (G_ACGT^C)	AatII (G_ACGT^C)	AatII (G_A
3	Acc65I (G^GTAC_C)	Acc65I (G^GTAC_C)	Acc65I (G^GTAC_C)	Acc65I (G^GTAC_C)	Acc65I (G^GTAC_C)	Acc65I (G^GTAC_C)	Acc65I (G^GTAC_C)	Acc65I (G^GTAC_C)	Acc65I (G^GTAC_C)	Acc65I (G^GTAC_C)	Acc65I (G^
4	AclI (AA^CG_TT)	AclI (AA^CG_TT)	AclI (AA^CG_TT)	AclI (C^CG_C)	AclI (AA^CG_TT)	AclI (C^CG_C)	AclI (AA^CG_TT)	AclI (AA^CG_TT)	AclI (C^CG_C)	AclI (C^CG_C)	AclI (C^CG
5	AflII (C^TTAA_G)	AflII (C^TTAA_G)	AflII (C^TTAA_G)	AclI (AA^CG_TT)	AflII (C^TTAA_G)	AclI (AA^CG_TT)	AflII (C^TTAA_G)	AflII (C^TTAA_G)	AflII (C^TTAA_G)	AclI (AA^CG_TT)	AclI (AA^C
6	AgeI (A^CCGG_T)	AgeI (A^CCGG_T)	AgeI (A^CCGG_T)	AflII (C^TTAA_G)	AgeI (A^CCGG_T)	AflII (C^TTAA_G)	AgeI (A^CCGG_T)	AgeI (A^CCGG_T)	AflII (C^TTAA_G)	AflII (C^TTAA_G)	AflII (C^T
7	ApaI (G_GGCC^C)	ApaI (G_GGCC^C)	ApaI (G_GGCC^C)	AgeI (A^CCGG_T)	ApaI (G_GGCC^C)	AgeI (A^CCGG_T)	ApaI (G_GGCC^C)	ApaI (G_GGCC^C)	AgeI (A^CCGG_T)	AgeI (A^CCGG_T)	AgeI (A^C
8	ApaLI (G^TGCA_C)	ApaLI (G^TGCA_C)	ApaLI (G^TGCA_C)	ApaI (G_GGCC^C)	ApaLI (G^TGCA_C)	ApaI (G_GGCC^C)	ApaLI (G^TGCA_C)	ApaLI (G^TGCA_C)	ApaI (G_GGCC^C)	ApaI (G_GGCC^C)	ApaI (G_GG
9	AscI (GG^CGCG_CC)	AscI (GG^CGCG_CC)	AscI (GG^CGCG_CC)	ApaLI (G^TGCA_C)	AscI (GG^CGCG_CC)	ApaLI (G^TGCA_C)	AscI (GG^CGCG_CC)	AscI (GG^CGCG_CC)	ApaLI (G^TGCA_C)	ApaLI (G^TGCA_C)	ApaLI (G^T
10	AseI (AT^TA_AT)	AseI (AT^TA_AT)	AseI (AT^TA_AT)	AscI (GG^CGCG_CC)	AseI (AT^TA_AT)	AscI (GG^CGCG_CC)	AsiSI (GCG_AT^CGC)	AseI (AT^TA_AT)	AscI (GG^CGCG_CC)	AscI (GG^CGCG_CC)	AscI (GG^C
11	AsiSI (GCG_AT^CGC)	AsiSI (GCG_AT^CGC)	AsiSI (GCG_AT^CGC)	AseI (AT^TA_AT)	AsiSI (GCG_AT^CGC)	AseI (AT^TA_AT)	AvrII (C^CTAG_G)	AsiSI (GCG_AT^CGC)	AseI (AT^TA_AT)	AseI (AT^TA_AT)	AseI (AT^T
12	AvrII (C^CTAG_G)	AvrII (C^CTAG_G)	AvrII (C^CTAG_G)	AsiSI (GCG_AT^CGC)	AvrII (C^CTAG_G)	AsiSI (GCG_AT^CGC)	BamHI (G^GATC_C)	AvrII (C^CTAG_G)	AsiSI (GCG_AT^CGC)	AsiSI (GCG_AT^CGC)	AsiSI (GCG
13	BamHI (G^GATC_C)	BbvCI (CC^TCA_GC)	BamHI (G^GATC_C)	AvrII (C^CTAG_G)	BamHI (G^GATC_C)	AvrII (C^CTAG_G)	BbvCI (CC^TCA_GC)	BamHI (G^GATC_C)	AvrII (C^CTAG_G)	AvrII (C^CTAG_G)	AvrII (C^C
14	BbvCI (CC^TCA_GC)	BclI (T^GATC_A)	BbvCI (CC^TCA_GC)	BamHI (G^GATC_C)	BbvCI (CC^TCA_GC)	BamHI (G^GATC_C)	BclI (T^GATC_A)	BbvCI (CC^TCA_GC)	BamHI (G^GATC_C)	BamHI (G^GATC_C)	BamHI (G^
15	BclI (T^GATC_A)	BglII (A^GATC_T)	BclI (T^GATC_A)	BbvCI (CC^TCA_GC)	BclI (T^GATC_A)	BbvCI (CC^TCA_GC)	BglII (A^GATC_T)	BclI (T^GATC_A)	BbvCI (CC^TCA_GC)	BbvCI (CC^TCA_GC)	BbvCI (CC^
16	BglII (A^GATC_T)	BmtI (G_CTAG^C)	BglII (A^GATC_T)	BclI (T^GATC_A)	BglII (A^GATC_T)	BclI (T^GATC_A)	BmtI (G_CTAG^C)	BglII (A^GATC_T)	BclI (T^GATC_A)	BclI (T^GATC_A)	BclI (T^GA
17	BseYI (C^CCAG_C)	BseYI (C^CCAG_C)	BmtI (G_CTAG^C)	BfaI (C^TA_G)	BmtI (G_CTAG^C)	BglII (A^GATC_T)	BseYI (C^CCAG_C)	BseYI (C^CCAG_C)	BfaI (C^TA_G)	BfaI (C^TA_G)	BfaI (C^TA
18	BstWI (C^GTAC_G)	BstWI (C^GTAC_G)	BseYI (C^CCAG_C)	BglII (A^GATC_T)	BseYI (C^CCAG_C)	BmtI (G_CTAG^C)	BstWI (C^GTAC_G)	BstWI (C^GTAC_G)	BglII (A^GATC_T)	BmtI (G_CTAG^C)	BglII (A^G
19	BspDI (AT^CG_AT)	BspDI (AT^CG_AT)	BstWI (C^GTAC_G)	BmtI (G_CTAG^C)	BstWI (C^GTAC_G)	BseYI (C^CCAG_C)	BspDI (AT^CG_AT)	BspDI (AT^CG_AT)	BmtI (G_CTAG^C)	BseYI (C^CCAG_C)	BmtI (G_C
20	BspEI (T^CCGG_A)	BspEI (T^CCGG_A)	BspDI (AT^CG_AT)	BseYI (C^CCAG_C)	BspDI (AT^CG_AT)	BstWI (C^GTAC_G)	BspEI (T^CCGG_A)	BspEI (T^CCGG_A)	BseYI (C^CCAG_C)	BspDI (AT^CG_AT)	BseYI (C^C
21	BspHI (T^CATG_A)	BsrGI (T^GTAC_A)	BspEI (T^CCGG_A)	BstWI (C^GTAC_G)	BspEI (T^CCGG_A)	BspDI (AT^CG_AT)	BspHI (T^CATG_A)	BspHI (T^CATG_A)	BstWI (C^GTAC_G)	BspEI (T^CCGG_A)	BstWI (C^G
22	BsrGI (T^GTAC_A)	BssHII (G^CGCG_C)	BspHI (T^CATG_A)	BspDI (AT^CG_AT)	BspHI (T^CATG_A)	BspEI (T^CCGG_A)	BsrGI (T^GTAC_A)	BsrGI (T^GTAC_A)	BspDI (AT^CG_AT)	BspHI (T^CATG_A)	BspDI (AT^
23	BssHII (G^CGCG_C)	BstBI (TT^CG_AA)	BsrGI (T^GTAC_A)	BspEI (T^CCGG_A)	BsrGI (T^GTAC_A)	BsrGI (T^GTAC_A)	BssHII (G^CGCG_C)	BssHII (G^CGCG_C)	BspEI (T^CCGG_A)	BsrGI (T^GTAC_A)	BspEI (T^C
24	BssSI (C^ACGA_G)	ClaI (AT^CG_AT)	BssHII (G^CGCG_C)	BspHI (T^CATG_A)	BssHII (G^CGCG_C)	BssHII (G^CGCG_C)	BssSI (C^ACGA_G)	BssSI (C^ACGA_G)	BspHI (T^CATG_A)	BssHII (G^CGCG_C)	BspHI (T^C
25	BstBI (TT^CG_AA)	EagI (C^GGCC_G)	BssSI (C^ACGA_G)	BsrGI (T^GTAC_A)	BssSI (C^ACGA_G)	BssSI (C^ACGA_G)	BstBI (TT^CG_AA)	BstBI (TT^CG_AA)	BsrFI (R^CCGG_Y)	BssSI (C^ACGA_G)	BsrGI (T^G

Figura 12. *Perfil de restricción de los biomarcadores.* Se logra observar el perfil de restricción realizado a cada uno de los amplicones generados a partir del diseño de los primers. Este perfil de restricción incluye a todas las enzimas que no cortan dentro de la secuencia del amplicón, así como el sitio de reconocimiento de cada una de las enzimas mostradas.

En la Tabla 7 se muestra en color rojo los sitios de restricción añadidos al extremo 5’ de los primers, así como la enzima utilizada para reconocer y cortar estos sitios.

Tabla 7. *Enzimas de restricción y sitios de corte añadidos a los primers*

Agente etiológico	Primers 5'→3' con sitio de restricción	Enzimas de restricción	Tamaño de Amplicón generado
Adenovirus	F-AGAGCGGCCGCTCTCACAGATCACGGGAC	NotI	99
	R-GCAAGATCTGCGTCTGGCGTCAGTAA	BglII	
Humano	F- GCTAGATCTCCTTGAGCATCTGGATTCTG	BglII	119
	R- CGACTCGAGCTCCCACATTCCCTTTTTAGT	XhoI	
SARS-CoV-2	F-AATCTCGAGCGCTTTCTTATTACAAATTGGGAG	XhoI	138
	R-AGGTCTAGACACTGCTACTGGAATGGTC	XbaI	
Virus de la influenza A	F-CGATCTAGAATGAGTCTTCTAACCGAGGT	XbaI	166
	R-ATAGGTACCGTCTTGTCTTTAGCCATTCCA	KpnI	
Mycoplasma pneumoniae	F-TTCGGTACCCCGTGTTGATTTGAGAAGCC	KpnI	198
	R-TGGGAATTCACATATTCCCGTAACCAGC	EcoRI	
Metapneumovirus humano	F-GACGAATTCGCAAAGTCAGCACAGGAAG	EcoRI	244
	R-GCAGGATCCACATGCTGTTCACCCTCAA	BamHI	
Haemophilus influenzae	F-TCGGGATCCGCCCTTTCTTTATTAGCAGC	BamHI	277
	R-ATACGGCCGCAACATCAGTCAAGCCATCTA	EagI	
Streptococcus pyogenes	F-TTCCGGCCGCAAAAGACATACTGAAACCAAAGC	EagI	327
	R-ATACTCGAGTAAGAAATAGTAGCGAGTGCG	XhoI	
Virus de la influenza B	F-ATGCTCGAGAGAAGATGGAGAAGGCAAAG	XhoI	362
	R-AAGTCTAGACCATGAGACAGTATAGTAGCG	XbaI	
Rinovirus	F-ACATCTAGAAGCACTTCTGTTTCCCC	XbaI	408
	R-TACGGTACCCACGGACACCCAAAGTAG	KpnI	
Enterovirus D68	F-TACGGTACCTACGCCTGTTTTATCTCCC	KpnI	458
	R-AAGGAATTCCGACAAGCAACTCACTGG	EcoRI	
Streptococcus pneumoniae	F-AACGAATTCACACGCACACTCAACTGG	EcoRI	494
	R-TTCCTCGAGCATTCTTCTGCCAGCCTG	XhoI	
Virus sincitial respiratorio	F-TACCTCGAGGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	XhoI	550
	R-CTTGGATCCACCTGATCTATCTCCTGC	BamHI	
Virus de la parainfluenza humana 1-3	F-ATGGGATCCGGTYCAAGGAGACAATCAAG	BamHI	588
	R-CAACGGCCGGCAACTGCTGGATCACCTA	EagI	
Virus de la parainfluenza humana 2	F-CTACGGCCGGCATCAAAGTTCTCGTCAGC	EagI	592
	R-ATACTCGAGAGATTCTCTCACTTTACCTGC	XhoI	
Virus de la parainfluenza humana 4	F-GTACTCGAGGTGGTGCTTCTATGACATTGA	XhoI	587
	R-CCACCATGGTAAGTCAGAAAACCAGCCATC	NcoI	

En la Figura 13 se aprecia el diseño del constructo obtenido mediante el ligado de los amplicones generados a partir de la PCR *in sílico* utilizando los primers de restricción. Los amplifcados se pueden observar con más detalle en el Anexo I. El tamaño del constructo fue de 5414 pb e incluyó las secuencias de los 15 biomarcadores (CPP) así como la secuencia de la Betaglobina (CPT). El constructo fue cortado en los laterales por las enzimas NotI y NcoI generando extremos cohesivos que sirvieron para poder insertarlo en vector de clonación pJET1.2.

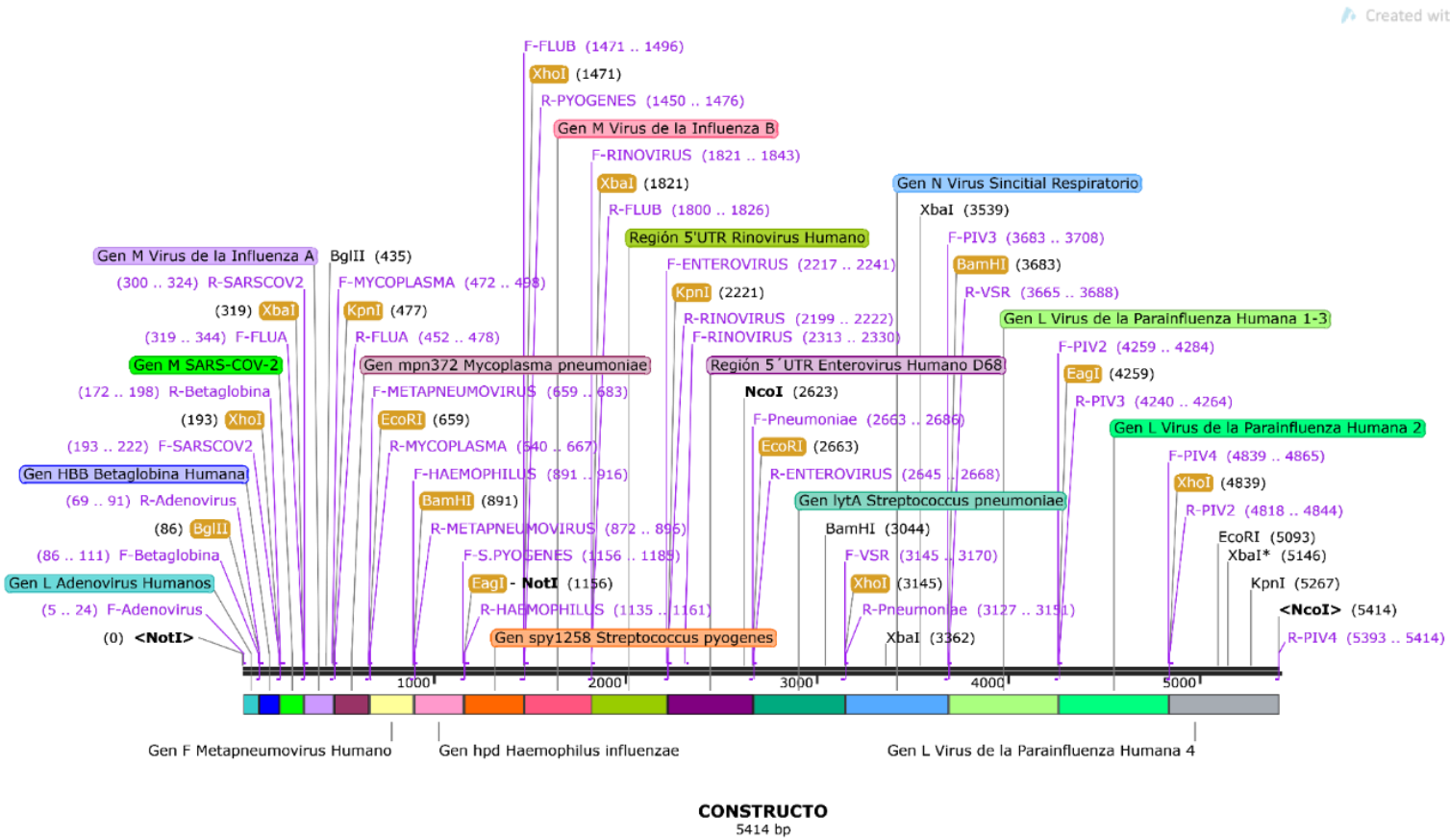


Figura 13. *Constructo generado a partir del ligado de los amplicones de cada patógeno respiratorio.* En la figura se aprecia la obtención de un constructo generado a partir del ligado de los amplicones de cada patógeno respiratorio mediante el uso de enzimas de restricción. En letras moradas se encuentran los primers diseñados con sitios de restricción. Las enzimas utilizadas para el ligado de los fragmentos se señalan en color dorado y se encuentran flanqueando los extremos ligados de cada amplicón.

Una vez diseñado el constructo, este fue insertado en el sitio múltiple de clonación del vector pJET1.2. La inserción se llevó a cabo en el programa SnapGene, mediante el corte con las mismas enzimas de restricción utilizadas en los extremos del constructo. La obtención del plásmido recombinante se muestra en la Figura 14 y presenta un tamaño de 8309 pb.

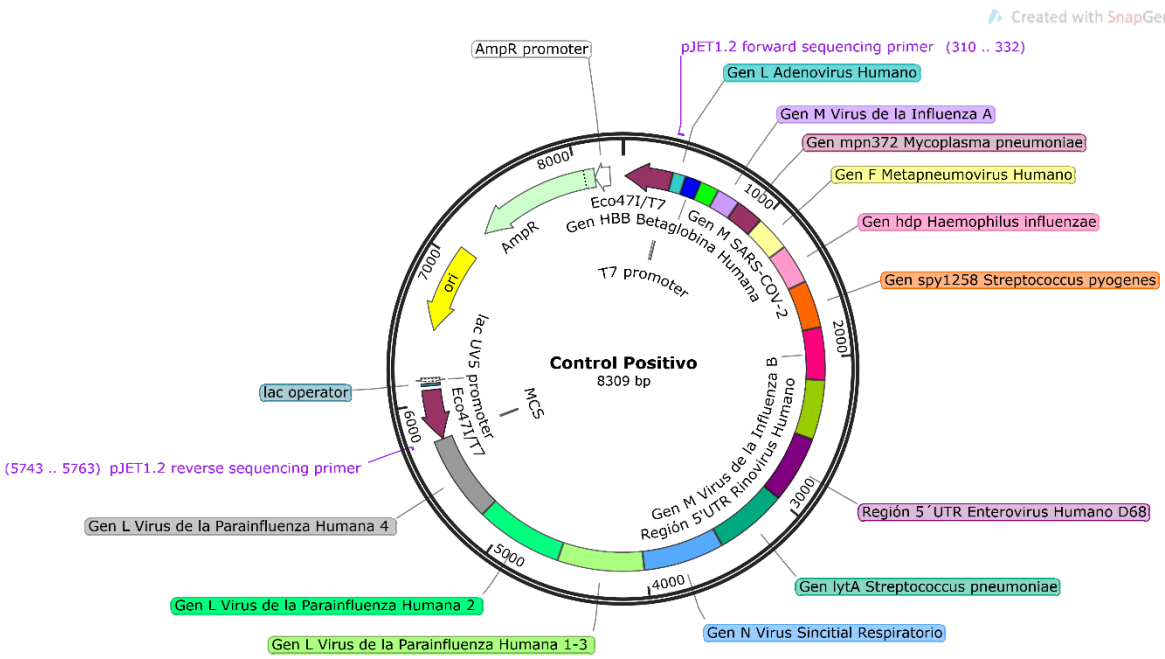


Figura 14. *Diseño del control positivo de la prueba y de la técnica.* En la figura se puede observar la construcción final del plásmido recombinante obtenido a partir de la inserción de un constructo (Figura 26) en el sitio múltiple de clonación (MCS) del vector pJET1.2 (Figura 4).

Ahora bien, este diseño *in sílico* requiere finalmente ser llevado a la parte experimental, en la cual será necesaria la obtención de los amplificados a partir de muestras que provean del material genético tanto de los virus como de las bacterias elegidas en este diseño.

Este proceso requiere en primera instancia de la amplificación de cada fragmento de los biomarcadores seleccionados utilizando los primers de restricción y su visualización en un gel de agarosa utilizando marcadores de peso molecular. Posterior a ello será necesario someter a cada amplificado a un proceso de corte mediante las enzimas de restricción previamente elegidas y su posterior ligado en un solo constructo mediante una *ligasa.* Después será necesario llevar a cabo un proceso de transformación, en el cual la bacteria elegida para albergar el vector de

clonación deberá permanecer en un estado de competencia que le permita la incorporación del plásmido recombinante.

Finalmente se requerirá de un método de detección para verificar que el inserto de interés fue clonado en la célula bacteriana, y esto dependerá en gran medida del tipo de vector utilizado. Estos métodos de detección pueden ir desde la detección de la coloración de las colonias clonadas, o en el caso del plásmido pJET1.2, mediante un gen letal al que se le interrumpe su expresión cuando el ADN de interés se inserta correctamente en el vector, y por lo tanto solo las colonias clonadas pueden crecer. También se puede hacer uso de un perfil de restricción y mediante un gel de agarosa determinar la presencia del inserto clonado mediante el tamaño esperado, o bien utilizar la PCR para amplificar el fragmento de interés (ThermoFisher Scientific, 2022).

Protocolo de la PCR multiplex

Debido a la complejidad en el diseño de la PCR Multiplex, fue necesario elegir un kit comercial cuyas características y componentes permitieran la optimización y diminución de las interferencias técnicas derivado del manejo simultáneo de varios pares de primers. El kit *LunaScript® Multiplex One-Step RT-PCR* de *New England Biolabs®* fue el que mejor se adaptó a las condiciones de nuestro diseño. Este kit se muestra en la Figura 28 e incluye agua libre de nucleasas, una mezcla de reacción que contiene dNTPs a una concentración optimizada para la detección de múltiples objetivos, así como una mezcla de las enzimas *transcriptasa inversa Luna WarmStart* y la *ADN polimerasa de alta fidelidad Q5 Hot Start*.

De acuerdo con las especificaciones del kit, su utilización permite un ahorro de tiempo, materiales y minimiza la contaminación al llevar a cabo una RT-PCR en un solo paso. Además, trabaja con una retro transcriptasa y una polimerasa especialmente diseñadas con control de temperatura lo que permite configurar la reacción a temperatura ambiente. Un punto importante es que la polimerasa cuenta con un bloqueo de temperatura basado en aptámeros, lo que brinda un sistema automático de arranque en caliente, un punto clave para elevar la especificidad de la prueba sobre todo cuando se tiene posibilidad de formación de dímeros u otras estructuras secundarias entre el conjunto de primers (New England BioLabs, 2021).

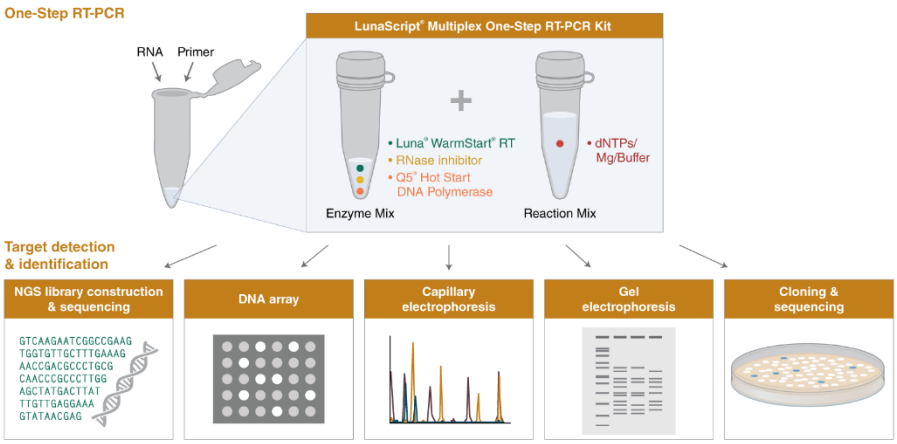


Figura 15. *Kit LunaScript Multiplex One-Step RT-PCR.* El kit LunaScript Multiplex One-Step RT-PCR (NEB n.º E1555) requiere una plantilla de ácidos nucleicos y primers específicos de genes para permitir la síntesis y la amplificación de objetivos de ADNc multiplex en una sola reacción. Los productos de cDNA amplificados pueden detectarse o identificarse mediante aplicaciones posteriores. Tomado de *LunaScript® Multiplex One-Step RT-PCR Kit*, por New England Biolabs® Inc, 2022, https://international.neb.com/products/e1555-lunascript-multiplex-one-step-rt-pcr-kit#Product%20Information. Derechos reservados.

Kit de extracción del material genético

Para este diseño se propuso el kit de extracción *MagMAX™ Viral/Pathogen Ultra Nucleic Acid Isolation* de *ThermoFisher Scientific*, ya que permite la extracción y recuperación integra tanto de DNA y RNA a partir de partículas virales, así como de bacterias Gram positivas y negativas, siendo probado en la mayoría de los patógenos respiratorios de este diseño. Este kit utiliza la tecnología de perlas magnéticas, lo cual garantiza la recuperación reproducible de ácido nucleico de alta calidad y con mayor rendimiento, en comparación con otros métodos de extracción. Además, es compatible con muestras respiratorias y permite la extracción con volúmenes de elución que van desde los 50 hasta los 100 µl en alrededor de 60 minutos (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific, 2019).

Sin embargo, dado que el éxito de una prueba molecular también depende en gran medida de la calidad de con la que se extrae la muestra, será necesario que el material genético recuperado sea sometido a pruebas de control para evaluar la calidad, cantidad y pureza de la muestra y con ello validar el método de extracción que será utilizado durante la fase experimental.

Es por ello que el uso de cualquier técnica de aislamiento debe conducir a una extracción eficiente con buena cantidad y calidad del material genético, que sea puro y esté libre de contaminantes, como lo son las proteínas, las sales, los carbohidratos o los fenoles. La calidad

y rendimiento deberán ser evaluados mediante espectrofotometría o electroforesis en gel de agarosa. Con la primera se podrá estimar la concentración del material genético midiendo la cantidad de luz absorbida por los ácidos nucleicos a una longitud de onda específica de 260 nm, mientras que la segunda nos permitirá evaluar la integridad. En cuanto a la pureza, esta se podrá evaluar con las relaciones de absorbancia A260/280 y A260/230. La relación A260/280 es muy estable y se considera que un valor mayor a 1.8 para ADN indica un valor de pureza aceptable, mientras que para ARN el valor deberá ser superior a 2, un valor inferior nos indicaría una contaminación por presencia de proteínas, cuya absorbancia se ubica en los 280 nm. Por otro lado, un valor por encima de 2 utilizando el ratio A260/A230 también será indicativo de pureza para ambos ácidos nucleicos, mientras que un valor más bajo nos hablaría de la presencia de carbohidratos y fenoles, cuyas absorbancias se encuentran en los 230 nm (ThermoFisher Scientific, 2019).

A) Condiciones de reacción

Las condiciones para preparar 50 µl de la mezcla de reacción se presentan en la Tabla 8, y fueron tomadas y ajustadas según las recomendaciones descritas en el kit. En la Tabla 9 se propone un mix de primers que contiene a todos los oligonucleótidos diseñados en esta prueba. En este punto será importante seguir todas la recomendaciones y cuidados necesarios para evitar la contaminación de la preparación, así como la aparición de fracasos durante la realización de la PCR.

Tabla 8. *Mezcla de reacción propuesta para la PCR multiplex*

Componentes	50 µl reacción	Concentración Final
Mezcla de reacción LunaScript Multiplex One-Step RT-PCR (5X)	10 µl	1X
Mezcla de enzimas LunaScript Multiplex One-Step RT-PCR (25X)	2 µl	1X
Mix de primers específicos (10 µM)	5-20 µl	1-4 µM *
Plantilla de material genético	Variable	Hasta 1 µg
Agua libre de nucleasas	A 50 µl	--

Nota: *Concentración final de los primers

Tabla 9. *Propuesta de preparación del mix de primers*

Concentración del stock de primers normalizado	400 µM
De cada primer	25 µl
Buffer	200 µl
Volumen total	1000 µl
Concentración final de cada primer	10 µM

B) Protocolo de Amplificación

En la Tabla 10 se describen las condiciones del ciclado óptimas de acuerdo con las condiciones de diseño de la PCR Multiplex, así como las recomendaciones descritas por el Kit. La temperatura de alineamiento aquí propuesta deberá ser evaluada y en su caso modificada una vez que se lleve a cabo la estandarización de la prueba, además podrán modificarse los tiempos de alineamiento y número de ciclos con el fin de optimizar los tiempos de amplificación y por lo tanto poder reducir los tiempos de entrega de un resultado.

Tabla 10. *Protocolo de amplificación la PCR multiplex en el termociclador*

	Temperatura	**Tiempo**	**Número de ciclos**
Síntesis de cDNA	50 – 65 °C	15 minutos	1
Pre-desnaturalización / Inactivación de la transcriptasa reversa	98 °C	1 minuto	1
PCR			
Desnaturalización	98 °C	10 segundos	35-40
Alineamiento	59 °C *	30 segundos	
Extensión	68 °C	1 minuto	
Extensión final	68 °C	5 minutos	1
Conservación o preservación de las muestras	4 °C	Tiempo indefinido	
Tiempo de respuesta aproximado		1 hora 20 minutos	

Nota. *La temperatura de alineamiento se propuso 3°C por arriba de la Tm más baja del conjunto de primers, según lo establecido en las recomendaciones del kit.

C) Corrimiento electroforético

En la Figura 17 se propone una simulación gráfica de un corrimiento electroforético utilizando un gel de agarosa a una concentración del 2.5%, dicha concentración se utiliza cuando la diferencia entre los amplicones oscila entre 20 y 50 pb. En la figura se muestran los diferentes amplicones generados para cada agente etiológico que obtenidos después de la amplificación de la PCR multiplex, Para realizar la comparación visual de los amplicones se propuso utilizar el kit comercial 50 pb Mini Ladder de Fisher Scientific que incluye 14 bandas que abarcan un

rango de tamaño de entre 25 y 650 pb (Figura 16). Además, se incluyen dos carriles que muestran al control positivo (CPT) y negativo (CNT) de la técnica.

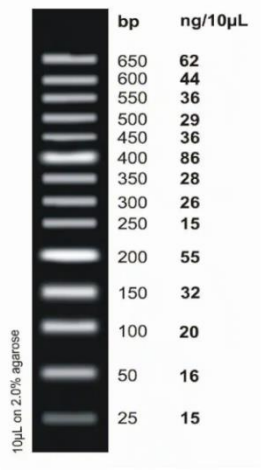


Figura 16. *Marcador de peso molecular 50 pb Mini Ladder Fisher Scientific.* Se puede observar que el kit comercial contiene 14 bandas que abarcan un tamaño que va desde los 25 pb hasta los 650 pb. Este rango de tamaño incluye a todos lo amplicones obtenidos por la amplificación de los primers diseñados en esta prueba. Tomado de *Fisher BioReagents™ exACTGene™ DNA Ladders,* por Fisher Scientific, 2022, https://www.fishersci.com/shop/products/fisher-bioreagents-i-ex-i-actg-i-ene-i-dna-ladders-11/BP2570100. Derechos Reservados.

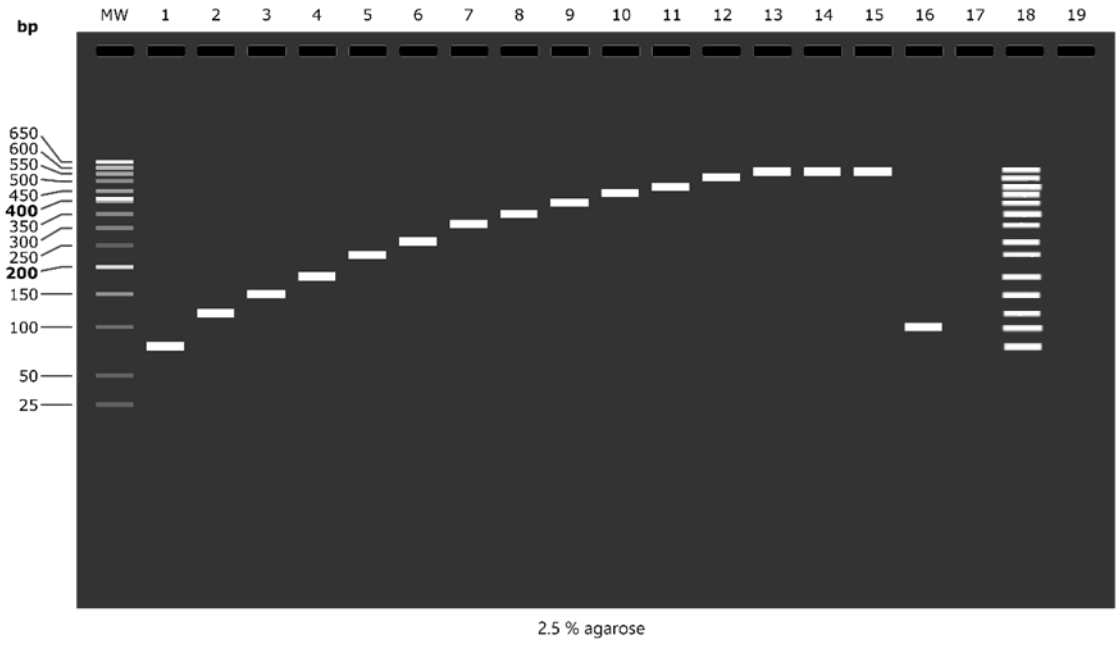


Figura 17. *Representación gráfica del corrimiento electroforético de la PCR multiplex.* En la figura se muestra una simulación del corrimiento electroforético que se obtendría a partir de la amplificación de cada una de las regiones genéticas reconocidas por los primers diseñados. Nota: cada uno de los carriles se señalan a continuación;

MW: Marcador de peso molecular

1: Adenovirus (79 bp)

2: SARS-CoV-2 (120 bp)

3: Virus de la influenza A (148 bp)

4: *Mycoplasma pneumoniae* (180 bp)

5: Metapneumovirus humano (226 bp)

6: *Haemophilus influenzae* (259 bp)

7: *Streptococcus pyogenes* (309 bp)

8: Virus de la influenza B (344 bp)

9: Rinovirus (390 bp)

10: Enterovirus D68(440 bp)

11: *Streptococcus pneumoniae* (476 bp)

12: Virus sincitial respiratorio (532 bp)

13: Virus de la parainfluenza humana 1-3 (570 bp)

14: Virus de la parainfluenza humana 2 (574 bp)

15: Virus de la parainfluenza humana 4 (569 bp)

16: Gen de la subunidad beta de la hemoglobina humana / Prueba negativa (101 bp)

17: Agua (Control negativo de la técnica)

18: Controles positivos de la prueba y control positivo de la técnica

Optimización de la PCR multiplex

El diseño óptimo, adecuado y funcional de la PCR Multiplex implica seguir una serie de pautas técnicas, capaces de llevar la prueba al trabajo experimental. A pesar de que el presente trabajo no implica esta última parte, es necesario mencionar los protocoles necesarios para la implementación futura en el laboratorio de diagnóstico microbiológico.

Esto implica que durante la fase de estandarización de la prueba se deben hacer un conjunto de evaluaciones para validar el funcionamiento adecuado de la técnica, mediante la utilización de muestras positivas que contengan el patógeno de interés como lo son muestras clínicas, cultivos celulares y bacterianos o plásmidos con la secuencia del gen del patógeno respiratorio. Por otra parte, también se deberá validar y estandarizar el tipo de muestra con la que la prueba finalmente trabajará, por lo tanto, este proceso requerirá del conocimiento del tropismo tisular de los virus y las bacterias, las zonas de la región anatómica del sistema respiratorio en donde se puedan encontrar, así como el tipo de afecciones clínicas que producen. Por otra parte, la validación de un resultado clínico positivo debe ir de la mano con la correlación clínica del paciente.

Además se debe incluir la configuración de una PCR para cada par de primers por separado utilizando el rango de concentraciones establecido en el kit y posteriormente llevando a cabo un análisis de los productos por electroforesis en un gel de agarosa, del mismo modo y siguiendo el paso anterior se debe configurar una PCR multiplex con concentraciones molares equivalentes para cada primer y se debe analizar nuevamente los amplificados en el gel utilizando como controles los productos obtenidos individualmente. También será necesario optimizar las condiciones de hibridación para cada par de primers realizando un gradiente con temperaturas que oscilen entre 2 y 10 °C por encima de la Tm calculada con el objetivo de determinar la temperatura de alineamiento promedio para cada primer y en función de este valor, determinar la temperatura de alineamiento de la reacción múltiple.

Por otro lado, en caso de que la PCR no salga del todo bien, una de las primeras cosas que se deberá hacer será realizar curvas de cloruro de magnesio ya que representa un punto clave para el funcionamiento correcto de la polimerasa. En este punto, una concentración baja puede generar productos inespecíficos y una concentración alta puede inhibir la actividad de la polimerasa al provocar una desnaturalización ineficaz de la cadena de ADN (Green & Sambrook, 2019)

Respecto a la concentración de dNTP´s, el kit *LunaScript® Multiplex One-Step RT-PCR* contiene una mezcla de dNTPs y buffer a una concentración que ha sido optimizada para trabajar con múltiples dianas moleculares, por lo que al menos en esta parte se esperaría que no sea necesario establecer un gradiente de concentraciones con este componente. Sin embargo, en caso de que se cambien las concentraciones de magnesio, será necesario también modificar las concentraciones de dNTP´s y viceversa, ya que existe una relación directa entre ambos componentes pues los dNTP´s se unen a los iones de magnesio, además si la concentración de estos últimos resulta ser muy alta pueden inhibir la actividad de la polimerasa al atrapar el magnesio necesario para la actividad de esta enzima (Espinoza, 2007).

Finalmente, una vez estandarizado cada uno de los componentes, corresponde al laboratorio determinar la sensibilidad de la prueba molecular, para ello, será necesario trabajar con diferentes rangos de concentración de material genético para cada patógeno con el objetivo de establecer el límite de detección de la PCR Multiplex. Este punto debe ir de la mano de la

validación del método de extracción para determinar si este cumple con la cantidad mínima necesaria de material genético a la cual la prueba puede detectar al patógeno respiratorio.

Evaluación de la sensibilidad de la PCR multiplex

Dado que el diseño de la PCR multiplex solo abarcó hasta la parte *in sílico*, no fue posible determinar la sensibilidad experimental de la prueba en este momento. No obstante, se ha demostrado que la PCR tiene una sensibilidad para detectar hasta una sola copia de un gen. Por este motivo se llevó a cabo una revisión bibliográfica sobre la determinación de la sensibilidad en pruebas de PCR enfocadas en el diagnóstico de patógenos respiratorios, con el fin de demostrar la capacidad de detección que podría presentar nuestra prueba. Se encontraron algunos artículos en los que se determinó la sensibilidad experimental para algunos patógenos respiratorios utilizando el método de la dosis infectiva del cultivo tisular 50 ($TCDI_{50}$). Dichos datos se tomaron como referencia para contrastar las dosis infectivas de estos patógenos en el ser humano. Concluimos que la $TCDI_{50}$ en humanos, era mucho más alta que la $TCDI_{50}$ a la cual la PCR detectaba el material genético de los patógenos (Tabla 11). Estos datos resultaron de mucha importancia ya que, si bien la $TCDI_{50}$ es la dosis mínima a la que el microorganismo puede causar enfermedad en las personas, una vez que se desarrolla la infección, la carga viral y bacteriana resultante será mucho más alta. Por ejemplo, en un estudio llevado por Jannetto *et al.*, (2010) se demostró que el límite de detección (sensibilidad) de la PCR multiplex de punto final para la Influenza A se ubicaba entre 26 a 62 $TCDI_{50}$/mL, valor muy por debajo en comparación con la carga viral excretada en la nasofaringe durante la fase activa de la infección, cuyo valor se calculó entre 10^3 y 10^7 $TCDI_{50}$/mL, es decir la sensibilidad fue de al menos 16 a 38 veces más baja que la carga viral. En resumen, estos datos indican la posibilidad de que la prueba pueda presentar valores de sensibilidad muy altos, en comparación con los obtenidos en otros estudios.

Ahora bien, también es importante destacar que la combinación de una cantidad considerable de primers en una sola reacción puede influir en la sensibilidad de este ensayo, ya que las interacciones primer-primer pueden conducir a una menor disponibilidad de estos. Además, la presencia de múltiples dianas en una reacción puede resultar en una competencia por enzimas y nucleótidos. Sin embargo, el recurrir a técnicas como PCR de arranque en caliente o el uso de

coadyuvantes químicos más la optimización de las cantidades de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción podrá ayudar a incrementar la especificidad y sensibilidad de la prueba.

Tabla 11. *Comparación entre la dosis infectiva 50 de los patógenos respiratorios y la sensibilidad de la PCR*

Agente infeccioso	**Dosis infectiva 50 ($TCID_{50}$)**	**Sensibilidad ($TCDI_{50}$) PCR punto final**	**Proporción** (TCID50 / Sensibilidad) **Punto Final**	**Sensibilidad ($TCDI_{50}$) qPCR**
SARS-CoV-2	100 copias [c]			125 -250 copias [g]
Virus de la influenza AHINI Virus de la influenza AH3N2	1.0×10^3 - 1.0×10^7 [a] 1.0×10^3 - 1.0×10^7 [a]	62 [d] 26 [d]	16 38	0.02 – 2.52 [f-g]
Virus de la influenza B	6.4×10^4 - 3.1×10^7 [a]	2 [d]	32,000	0.006 – 0.23 [f-g]
Rinovirus	3.2×10^{-2} - 6.3×10^5 [a]			
Adenovirus	0.5 – 171[a]	0.2 [e]	2.5	0.1 - 0.01 [h]
Virus sincitial respiratorio	30 - 40 Niños[a] 160-640 Adultos[a]	5 [e]	6 32	--
Metapneumovirus humano	--	--	--	--
Enterovirus D68	--	--	--	--
Virus de la parainfluenza humana	80 (PIV-1) [b]	250 PIV-1 [e] 10 PIV-2 [e] 30 PIV-3 [e]	--	
Mycoplasma pneumoniae	<100 UFC [b]	--	--	--
Streptococcus pneumoniae	Desconocida [b]	--	--	--
Haemophilus influenzae	Desconocida [b]	--	--	--
Streptococcus pyogenes	Desconocida [b]	--	--	--

Notas: [a] (Yezli & Otter, 2011) [b] (Government of Cananda, 2022) [c] (Karimzadeh *et al.*, 2021) [d] (Atmar & Baxter, 1996) [e] (Osiowy, 1998) [f] (Van Elden *et al.*, 2001) [g] (Bio-Rad, 2022) [h] (Pehler *et al.*, 2004)

Comparación entre PCR multiplex de tiempo real y de punto final

A pesar de las ventajas que implica desarrollar una PCR multiplex de tiempo real en comparación a una PCR multiplex de punto final, se deben considerar los costos de la implementación de cada una, tanto para el laboratorio que ofertará la prueba como para el paciente que la requerirá, y sin olvidar el objetivo de esta.

Para nuestro caso, el objetivo de la prueba consiste en el diagnóstico confiable y seguro de los principales patógenos respiratorios. Se sabe que la presencia de cualquier agente etiológico mencionado en este trabajo más la presentación de una sintomatología clínica específica es sinónimo de infección. Por lo tanto, el diagnóstico cualitativo es suficiente para sustentar la validez y rentabilidad de la prueba molecular que se propone.

Si bien la implementación de una prueba cuantitativa representa una opción más adecuada en términos de sensibilidad y rapidez, cuando hablamos de una técnica molecular múltiple, resulta importante considerar el costo económico de su implementación, ya que una prueba cuantitativa necesitará de mayor inversión al requerir además de los primers, el uso de sondas y sin olvidar que el diseño resulta ser más complicado pues se debe tener mayor cuidado en la construcción de estos dos componentes. Por otro lado, requiere de un equipo más sofisticado y especializado, con el cual la mayoría de los laboratorios en nuestro país no cuenta. Por ejemplo, respecto al tema económico, el costo de una sonda ronda alrededor de los $250.00, esto deberá sumarse al costo de los primers cuyo precio promedio es de alrededor de los $163.00, según las cotizaciones hechas en la página T4OLIGO (https://t4oligo.com/servicios/cotizaciones/). Sin embargo, esto solo es la punta del iceberg, ya que el precio de un termociclador en tiempo real con 6 canales, que es el que presenta una mayor capacidad de multiplexación, tiene un precio por arriba del millón de pesos mientras que un termociclador de punto final con gradiente de temperatura se encuentra alrededor de los $200,000.00.

En este punto es importante debatir que, si bien la PCR en tiempo real evita un trabajo posterior a la amplificación acortando el tiempo de entrega de resultados, se limita en este caso a detectar una cierta cantidad de objetivos por tubo y esto dependerá en gran medida de la cantidad de canales con las que cuente el termociclador utilizado por el laboratorio, por lo que se tendría que ajustar el diseño de la prueba en varios tubos, incrementado las posibilidades de aparición de una mayor cantidad de errores técnicos y también generando mayor trabajo en la fase de preparación de la muestra.

Ahora bien, respecto al sistema BioFire, el costo de adquirir la plataforma FilmArray es de aproximadamente 49,000 USD ($ 981,876.70 MX), sin embargo, este precio es solo por adquirir un equipo, cuya capacidad de procesamiento es de solo 1 muestra a la vez, por lo tanto, si el laboratorio requiere aumentar su capacidad de procesamiento debe adquirir más plataformas, lo que elevaría los costos de inversión, del tal manera que aunque los resultados se obtengan en aproximadamente 1 hora, esto no garantiza la rapidez para todos los pacientes que requieran conocer en ese momento los resultados. Por otro lado, también deben adquirirse por separado las bolsas de reactivo que contienen el panel respiratorio y cuyo precio de lista por unidad es de 129 USD ($2,584.94 MX) y que además solo sirve para procesar una muestra. Tomando en

cuenta estos datos, el costo de una prueba para un paciente se ha establecido en aproximadamente los 214.44 USD ($4,297.00 MX) (Soucek *et al.*, 2019). Esto implica que el monto inicial de adquisición, así como el costo por prueba para el paciente representen un factor limitante muy importante para la mayoría de los hospitales y laboratorios clínicos del país.

En cuanto a términos de rapidez, es posible llevar a cabo una optimización de la PCR de punto final, ajustando y estandarizando los tiempos de extracción, amplificación y del corrimiento electroforético, reduciendo los tiempos de entrega de resultados, así mismo, debido al diseño cuidadoso y delicado de la técnica es posible esperar resultados cuyos valores de sensibilidad y especificidad puedan ser equiparables con los obtenidos por pruebas comerciales. Sobre este punto, el diseño de una PCR multiplex de punto final, resulta ser la mejor opción, pues es una prueba que puede adaptarse a las condiciones de la mayoría de los laboratorios de biología molecular o bien en aquellos laboratorios pequeños que deseen implementar una prueba menos costosa y más accesible para los pacientes.

CONCLUSIONES

La selección cuidadosa de cada uno de los biomarcadores realizada a partir de una revisión bibliográfica junto con la elaboración de alineamiento múltiples permitió el diseño de una PCR multiplex de punto final con la capacidad para detectar a los principales patógenos respiratorios en México. La construcción cuidadosa de cada uno de los oligonucleótidos posibilitó acoplarlos a una sola reacción simultánea, mientras que el análisis en BLAST aseguró una detección específica para la mayoría de los patógenos, a excepción del Rinovirus Humano, cuyos primers presentaron homología con algunas especies del género *Enterovirus*, que, si bien no representaron mayor problema respecto a la especificidad *in sílico* de la prueba, será necesario evaluar su especificidad a nivel experimental.

Se demostró el funcionamiento *in sílico* de la PCR multiplex al construir un plásmido recombinante con las secuencias de los biomarcadores y del gen control, así mismo se logró proponer un corrimiento electroforético con los fragmentos obtenidos partir del amplificado de las secuencias blanco mediante el programa SnapGene. No obstante, será necesario desarrollar un protocolo experimental para determinar la sensibilidad, especificidad y funcionamiento de la prueba en el laboratorio, este proceso se encuentra descrito dentro del diseño y requerirá de un amplio trabajo de optimización y estandarización, sin embargo, una vez logrado, tendrá la capacidad de poder ser implementado en los laboratorios de diagnóstico microbiológico del país.

Se comparó la rentabilidad de la PCR de punto final propuesta frente a las variantes en tiempo real y al sistema de detección BioFire, se determinó que esta prueba puede competir frente a ellos y representa la mejor opción para la mayoría de los laboratorios de nuestro país, ya que requiere menos costos de inversión, es más accesible para el público y se puede adaptar fácilmente a la mayoría de las instalaciones además, una vez que se logre estandarizar se podrán optimizar los tiempos de entrega de resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, T., & Sistla, S. (2016). Identification of streptococcus pyogenes-phenotypic tests vs molecular assay (Spy1258PCR): A comparative study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *10*(7), 1–3. https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/20053.8093

Afzal, A. (2020). Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *Journal of Advanced Research*, *26*, 149–159. https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.08.002

Aguilar Gómez, N. E., Hernández Soto, A. A., & Ibanes Gutiérrez, C. (2020). Características del SARS-CoV-2 y sus mecanismos de transmisión. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, *33*(3), 143–148. https://doi.org/10.35366/95651

Agustiningsih, N. (2021). Optimization of multiplex real-time RT-PCR for respiratory syncytial viruses detection. *Health Science Journal of Indonesia*, *12*(2), 66–73. https://doi.org/10.22435/hsji.v12i2.5529

Andrés, C., Piñana, M., Vila, J., Esperalba, J., Trejo-Zahínos, J., Codina, M. G., Martín, M. C., Fuentes, F., Rubio, S., Pumarola, T., & Antón, A. (2019). The high genetic similarity between rhinoviruses and enteroviruses remains as a pitfall for molecular diagnostic tools: A three-year overview. *Infection, Genetics and Evolution*, *75*(August), 103996. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103996

Andrews, D., Chetty, Y., Cooper, B. S., Virk, M., Glass, S. K., Letters, A., Kelly, P. A., Sudhanva, M., & Jeyaratnam, D. (2017). Multiplex PCR point of care testing versus routine, laboratory-based testing in the treatment of adults with respiratory tract infections: A quasi-randomised study assessing impact on length of stay and antimicrobial use. *BMC Infectious Diseases*, *17*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s12879-017-2784-z

Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific. (2019). *MagMAX™ Viral/Pathogen Ultra Nucleic Acid Isolation Kit*. Productos de Purificación y Aislamiento de ARN. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A42356

Aslanzadeh, J., Zheng, X., Li, H., Tetreault, J., Ratkiewicz, I., Meng, S., Hamilton, P., & Tang, Y. W. (2008). Prospective evaluation of rapid antigen tests for diagnosis of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(5), 1682–1685. https://doi.org/10.1128/JCM.00008-08

Assane, D., Makhtar, C., Abdoulaye, D., Amary, F., Djibril, B., Amadou, D., Niokhor, D. J. B., Amadou, D., Cheikh, L., Ndongo, D., Mbayame, N., Lamine, F., & Bouh, B. C. S. (2018). Viral and bacterial etiologies of acute respiratory infections among children under 5 years in Senegal. *Microbiology Insights*, *11*, 117863611875865. https://doi.org/10.1177/1178636118758651

Atmar, R. L., & Baxter, B. D. (1996). Typing and subtyping clinical isolates of influenza virus using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Clinical and Diagnostic Virology*, *7*(2), 77–84. https://doi.org/10.1016/S0928-0197(96)00254-1

Avni, T., Mansur, N., Leibovici, L., & Paul, M. (2010). PCR using blood for diagnosis of invasive pneumococcal disease: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(2), 489–496. https://doi.org/10.1128/JCM.01636-09

Azar, M. M., & Landry, M. L. (2018). Detection of influenza a and b viruses and respiratory syncytial virus using (CLIA)-waived point-of-care assays: A paradigm shift to molecular tests. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(7), 1–34. https://doi.org/10.1128/JCM.00367-18

Bellau-Pujol, S., Vabret, A., Legrand, L., Dina, J., Gouarin, S., Petitjean-Lecherbonnier, J., Pozzetto, B., Ginevra, C., & Freymuth, F. (2005). Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *Journal of Virological Methods*, *126*(1–2), 53–63. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.020

Bio-Rad. (2022). *Analytical sensitivity for samples with SARS-CoV-2, Flu A, and Flu B*. Life Science Research. https://www.bio-rad.com/es-mx/life-science-research/overlay/analytical-sensitivity-lod?ID=Analytical_1610048637

BioFire. (2020). *The BioFire® Respiratory 2.1 (RP2.1) Panel*. BioFire by Biomerieux. https://www.biofiredx.com/products/the-filmarray-panels/filmarrayrp/

Biomérieux. (2022). *Panel Respiratorio FilmArray®*. https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/panel-respiratorio-filmarrayr

Boger, B., Fachi, M. M., Vilhena, R. O., Cobre, A. F., Tonin, F. S., & Pontarolo, R. (2020).

Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. *American Journal of Infection Control*, *49*(1), 21–29. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.07.011

Bouzid, D., Hadad, O., Bertine, M., Houhou-Fidouh, N., Mirand, A., Duval, X., Bunel, V., Borie, R., Lucet, J. C., Descamps, D., & Visseaux, B. (2022). Rhinoviruses: molecular diversity and clinical characteristics. *International Journal of Infectious Diseases*, *118*, 144–149. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.02.055

Branche, A. R., & Falsey, A. R. (2016). Parainfluenza Virus Infection. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, *37*(4), 538–554.

Budnik, I., Ferrés, M., Pardo, T., Edwards, J., Labarca, G., Reyes, F., Martinez, C., Montecinos, L., & Perret, C. (2016). Aporte de la biología molecular en el diagnóstico de infecciones respiratorias agudas. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, *32*(4), 224–232.

Castillo, D., Harcourt, B., Hatcher, C., Jackson, M., Katz, L., Mair, R., Mayer, L., Novak, R., Rahalison, L., Schmink, S., Theodore, M. J., Thomas, J., Voung, J., Wang, X., World Health Organization, & Center for disease control and prevention. (2011). PCR for Detection and characterization of bacterial meningitis pathogens: N. meningitidis, H. influenzae, and S. pneumoniae. In *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae.* (2° Edición, Issue 3, pp. 1–56). http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt10-pcr.html

Center for disease control and prevention. (2019a). *Adenovirus*. National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Division of Viral Diseases. https://www.cdc.gov/adenovirus/hcp/diagnosis.html#:~:text=Adenovirus infections can be identified,causing the person's particular illness.

Center for disease control and prevention. (2019b). *Human parainfluenza viruses (HPIVs)*. National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Division of Viral Diseases. https://www.cdc.gov/parainfluenza/index.html

Center for disease control and prevention. (2020a). *Influenza signs and symptoms and the role of Laboratory Diagnostics*. Influenza (Flu).

https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/labrolesprocedures.htm

Center for disease control and prevention. (2020b). *Respiratory syncytial virus infection (RSV)*. National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), Division of Viral Diseases. https://www.cdc.gov/rsv/

Center for disease control and prevention. (2021a). *CDC Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay Instructions for Use* (Issue CDC).

Center for disease control and prevention. (2021b). *Streptococcus pyogenes (group A Streptococcus)*. Streptococcus Laboratory Home. https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/resources.html

Cerezo-Lira, G., Zárate-Conde, K., Alpuche-Lazcano, S., Cabello, C., Tato, P., & Tirado, R. (2016). Diagnóstico molecular para la detección de metapneumovirus humano a partir de aislados virales en pacientes pediátricos con infección respiratoria aguda. *Investigación En Discapacidad*, 88–95.

Certest Biotec. (2021). *Viasure. Real Time PCR Detection Kits*. Certest Biotec. https://www.certest.es/viasure/

Charlton, C. L., Babady, E., Ginocchio, C. C., Hatchette, T. F., Jerris, R. C., Li, Y., Loeffelholz, M., McCarter, Y. S., Miller, M. B., Novak-Weekley, S., Schuetz, A. N., Tang, Y. W., Widen, R., & Drews, S. J. (2019). Practical guidance for clinical microbiology laboratories: Viruses causing acute respiratory tract infections. *Clinical Microbiology Reviews*, *32*(1), 1–49. https://doi.org/https://doi.org/10.1128/CMR .00042-18.

Chartrand, C., Tremblay, N., Renaud, C., & Papenburg, J. (2015). Diagnostic accuracy of rapid antigen detection tests for respiratory syncytial virus infection: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(12), 3738–3749. https://doi.org/10.1128/JCM.01816-15

Chaudhry, R., Valavane, A., Sreenath, K., Choudhary, M., Sagar, T., Shende, T., Varma-Basil, M., Mohanty, S., Kabra, S. K., Dey, A. B., & Thakur, B. (2017). Detection of Mycoplasma pneumoniae and Legionella pneumophila in patients having community-acquired pneumonia: A multicentric study from New Delhi, India. *The American Journal of*

Tropical Medicine and Hygiene, *97*(6), 1710–1716. https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0249

Chen, Y. S., Liu, P. Y., Huang, Y. F., Chen, C. S., Chiu, L. H., Huang, N. Y., Hsieh, K. S., & Chen, Y. S. (2013). Comparison of diagnostic tools with multiplex polymerase chain reaction for pediatric lower respiratory tract infection: A single center study. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *46*(6), 413–418. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.07.016

Chiang, P. S., Huang, M. L., Luo, S. T., Lin, T. Y., Tsao, K. C., & Lee, M. S. (2012). Comparing molecular methods for early detection and serotyping of Enteroviruses in throat swabs of pediatric patients. *PLoS ONE*, *7*(10), 5–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048269

Chirinos-Saire, Y., Reyna-García, R., Aguilar-Huauya, E., & Santillán-Salas, C. (2021). Virus respiratorios y características clínico-epidemiológicos en los episodios de infección respiratoria aguda. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, *38*(1), 1–8. https://doi.org/https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.6346.

Chowdhury, B., & Garai, G. (2017). A review on multiple sequence alignment from the perspective of genetic algorithm. *Genomics*, *109*(5–6), 419–431. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.06.007

Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). Polymerase chain reaction. In *Molecular Biology* (Third Edit, pp. 168–198). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00006-9

Clarke, C., Bakaletz, L. O., Ruiz-Guiñazú, J., Borys, D., & Mrkvan, T. (2017). Impact of protein D-containing pneumococcal conjugate vaccines on non-typeable Haemophilus influenzae acute otitis media and carriage. *Expert Review of Vaccines*, *16*(7), 751–764. https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1333905

Cordey, S., Thomas, Y., Cherpillod, P., van Belle, S., Tapparel, C., & Kaiser, L. (2009). Simultaneous detection of parainfluenza viruses 1 and 3 by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, *156*(1–2), 166–168. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.11.006

Das, S., Dunbar, S., & Tang, Y. W. (2018). Laboratory diagnosis of respiratory tract infections

in children - The state of the art. *Frontiers in Microbiology*, *9*(OCT), 1–9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02478

Deraz, T., Mansour, M. G. E., Albendary, S., & Allam, F. (2012). Haemophilus influenzae type b pneumonia in Egyptian children under five years: A step toward the identification of the real burden in our community by the use of real-time polymerase chain reaction. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, *13*(2), 213–218. https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2012.01.005

Diallo, K., Feteh, V. F., Ibe, L., Antonio, M., Caugant, D. A., du Plessis, M., Deghmane, A. E., Feavers, I. M., Fernandez, K., Fox, L. A. M., Rodrigues, C. M. C., Ronveaux, O., Taha, M. K., Wang, X., Brueggemann, A. B., Maiden, M. C. J., & Harrison, O. B. (2021). Molecular diagnostic assays for the detection of common bacterial meningitis pathogens: A narrative review. *EBioMedicine*, *65*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103274

Do, L. A. H., van Doorn, H. R., Bryant, J. E., Nghiem, M. N., Nguyen Van, V. C., Vo, C. K., Nguyen, M. D., Tran, T. H., Farrar, J., & De Jong, M. D. (2012). A sensitive real-time PCR for detection and subgrouping of human respiratory syncytial virus. *Journal of Virological Methods*, *179*(1), 250–255. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.11.012

Dunne, E. M., Marshall, J. L., Baker, C. A., Manning, J., Gonis, G., Danchin, M. H., Smeesters, P. R., Satzke, C., & Steer, A. C. (2013). Detection of group a streptococcal pharyngitis by quantitative PCR. *BMC Infectious Diseases*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-312

Duo, Y., Li, Y., Ma, C., Zhu, H., Du, J., Liu, H., Liu, Q., Rui, C., & Tan, Y. (2018). Rapid diagnosis of human adenovirus B, C and E in the respiratory tract using multiplex quantitative polymerase chain reaction. *Molecular Medicine Reports*, *18*(3), 2889–2897. https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9253

Eboigbodin, K. E., Moilanen, K., Elf, S., & Hoser, M. (2017). Rapid and sensitive real-time assay for the detection of respiratory syncytial virus using RT-SIBA®. *BMC Infectious Diseases*, *17*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s12879-017-2227-x

Echaniz-Aviles, G., Garza-González, E., Román-Mancha, A. L., Morfín-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Ayala-Gaytán, J. J., Guajardo-Lara, C. E., Soto-Nogueron, A., Carnalla-

Barajas, M. N., & Camacho-Ortiz, A. (2019). Clinical and microbiological characteristics of community-acquired pneumonia associated with Streptococcus pneumoniae in adult patients in Mexico. *Revista Argentina de Microbiologia*, *51*(3), 234–240. https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.10.002

El Kholy, A. A., Mostafa, N. A., Ali, A. A., Soliman, M. M. S., El-Sherbini, S. A., Ismail, R. I., El Basha, N., Magdy, R. I., El Rifai, N., & Hamed, D. H. (2016). The use of multiplex PCR for the diagnosis of viral severe acute respiratory infection in children: a high rate of co-detection during the winter season. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *35*(10), 1607–1613. https://doi.org/10.1007/s10096-016-2698-5

Espinoza-Asuar, L. (2007). Ecología Molecular. In L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirr (Eds.), *Ecología Molecular* (pp. 517–540). Instituto Nacional de Ecología.

Eugene-Ruellan, G., Freymuth, F., Bahloul, C., Badrane, H., Vabret, A., & Tordo, N. (1998). Detection of respiratory syncytial virus A and B and parainfluenzavirus 3 sequences in respiratory tracts of infants by a single PCR with primers targeted to the L-polymerase gene and differential hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(3), 796–801. https://doi.org/10.1128/jcm.36.3.796-801.1998

European Respiratory Society. (2013). Acute lower respiratory infections. In *The European Lung White Book: Respiratory Health and Disease in Europe*. European Respiratory Society.

Fall, A., Dia, N., Kébé, O., Sarr, F. D., Kiori, D. E., Cissé, E. H. A. K., Sy, S., Goudiaby, D., Richard, V., Diop, O. M., & Niang, M. N. (2016). Enteroviruses and rhinoviruses: Molecular epidemiology of the most influenza-like illness associated viruses in Senegal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *95*(2), 339–347. https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0799

Feregrino, R. R., Feregrino, R. R., Magaña, I. M., & Cabello, R. R. (2013). Diagnóstico de metapneumovirus humano . Revisión sistemática de la literatura . *Revista de Enfermedades Infecciosas En Pediatría*, *XXVI*(103), 256–269.

Fernandes-Matano, L., Monroy-Muñoz, I. E., Angeles-Martínez, J., Sarquiz-Martinez, B., Palomec-Nava, I. D., Pardavé-Alejandre, H. D., Coy-Arechavaleta, A. S., Santacruz-

Tinoco, C. E., González-Ibarra, J., González-Bonilla, C. R., & Muñoz-Medina, J. E. (2017). Prevalence of non-influenza respiratory viruses in acute respiratory infection cases in Mexico. *PLoS ONE*, *12*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176298

Ferreira-Guerrero, E., Báez-Saldaña, R., Trejo-Valdivia, B., Ferreyra-Reyes, L., Delgado-Sánchez, G., Chillán-Herrera, O. L., Mendoza-Alvarado, L. R., & García-García, L. (2013). Infecciones respiratorias agudas en niños y signos de alarma identificados por padres y cuidadores en México. *Salud Pública de México*, *55*(2), 307–313.

Finkel, Y., Mizrahi, O., Nachshon, A., Weingarten-Gabbay, S., Morgenstern, D., Yahalom-Ronen, Y., Tamir, H., Achdout, H., Stein, D., Israeli, O., Beth-Din, A., Melamed, S., Weiss, S., Israely, T., Paran, N., Schwartz, M., & Stern-Ginossar, N. (2021). The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature*, *589*, 125–130. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2739-1

Foro de las Sociedades Internacionales de Enfermedades Respiratorias. (2017). El impacto mundial de la enfermedad respiratoria. In *Asociación Latinoamericana de Tórax* (Segunda Ed).

Furuse, Y., Suzuki, A., Kamigaki, T., & Oshitani, H. (2009). Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: Large-scale sequence analysis. *Virology Journal*, *6*, 1–13. https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-67

Galindo-Fraga, A., Ortiz-Hernández, A. A., Ramírez-Venegas, A., Vázquez, R. V., Moreno-Espinosa, S., Llamosas-Gallardo, B., Pérez-Patrigeon, S., Salinger, M., Freimanis, L., Huang, C. yu, Gu, W., Guerrero, M. L., Beigel, J., & Ruiz-Palacios, G. M. (2013). Clinical characteristics and outcomes of influenza and other influenza-like illnesses in Mexico City. *International Journal of Infectious Diseases*, *17*(7), 19–21. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.01.006

Ghannam, M. G., & Varacallo, M. (2021). *Biochemistry , Polymerase Chain Reaction*. StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/?report=classic

GhelichKhan, M., Hosseini, S., Khansarinejad, B., & Fotouhi, F. (2017). Establishment of reverse transcription polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of human parainfluenza virus types 1 to 4 in children with influenza like illnesses. *Bratisl ,Ed*, *118*(5),

772–776. https://doi.org/10.4149/BLL_2017_145

Goto, E. (2012). Performance evaluation of detecting adenovirus by using rapid diagnostic kits among Japanese people. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *18*(3), 361–369. https://doi.org/10.1007/s10156-011-0346-7

Government of Cananda. (2022). *Pathogen safety data sheets*. Biosafety and Biosecurity. https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment.html

Green, D., & George, K. (2018). Rapid antigen tests for influenza: Rationale and significance of the FDA reclassification. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(10), 1–10. https://doi.org/10.1128/JCM.00711-18

Green, M., & Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. In *Molecular Cloning* (Fourth Edi, Issue 6, pp. 436–456). Cold Spring Harbor Laboratory Press. https://doi.org/10.1101/pdb.top095109

Guinocchio, C. (2016). Molecular pathology in clinical practice. In *Molecular Pathology in Clinical Practice* (2 Ed, pp. 1–1001). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19674-9_52

Guzek, A., Rybicki, Z., Korzeniewski, K., Mackiewicz, K., Saks, E., Chciałowski, A., & Zwolińska, E. (2014). Etiological factors causing lower respiratory tract infections isolated from hospitalized patients. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *835*(October 2014), 37–44. https://doi.org/10.1007/5584_2014_23

Hanson, K. E., Azar, M. M., Banerjee, R., Chou, A., Colgrove, R. C., Ginocchio, C. C., Hayden, M. K., Holodiny, M., Jain, S., Koo, S., Levy, J., Timbrook, T. T., & Caliendo, A. M. (2020). Molecular testing for acute respiratory tract infections: Clinical and diagnostic recommendations from the IDSA's diagnostics committee. *Clinical Infectious Diseases*, *71*(10), 2744–2751. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa508

Harvala, H., Broberg, E., Benschop, K., Berginc, N., Ladhani, S., Susi, P., Christiansen, C., McKenna, J., Allen, D., Makiello, P., McAllister, G., Carmen, M., Zakikhany, K., Dyrdak, R., Nielsen, X., Madsen, T., Paul, J., Moore, C., von Eije, K., … Fischer, T. K. (2018).

Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *Journal of Clinical Virology*, *101*, 11–17. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.01.008

Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *International Journal of Aromatherapy*, *23*(3), BioTechniques. https://doi.org/10.1016/s0962-4562(97)80025-2

Herta, T., Bhattacharyya, A., Bollensdorf, C., Kabus, C., García, P., Suttorp, N., Hippenstiel, S., & Zahlten, J. (2018). DNA-release by Streptococcus pneumoniae autolysin LytA induced Krueppel-like factor 4 expression in macrophages. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-018-24152-1

Hu, F., Rishishwar, L., Sivadas, A., Mitchell, G. J., King Jordan, I., Murphy, T. F., Gilsdorf, J. R., Mayer, L. W., & Wang, X. (2016). Comparative genomic analysis of haemophilus haemolyticus and nontypeable haemophilus influenzae and a new testing scheme for their discrimination. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(12), 3010–3017. https://doi.org/10.1128/JCM.01511-16

Huang, W. Y., Lee, M. S., Lin, L. M., & Liu, Y. C. (2020). Diagnostic performance of the Sputum Gram Stain in predicting sputum culture results for critically ill pediatric patients with pneumonia. *Pediatrics and Neonatology*, *61*(4), 420–425. https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2020.03.014

INEGI. (2021). *Características de las defunciones registradas en México durante 2020*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/mortalidad/doc/defunciones_registradas_2019_nota_tecnica.pdf

INEGI. (2022). *Estadística de defunciones registradas de Enero a Junio de 2021*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020_Pnles.pdf

Instituto Nacional de Salud Pública. (2019). *Sistema Regional de Vacunas*. Datos por sexo y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus* y *Neisseria meningitidis* en procesos infecciosos. https://www.insp.mx/lineas-de-investigacion/medicamentos-en-salud-

publica/sireva.html

Jacobs, S. E., Lamson, D. M., Kirsten, S., & Walsh, T. J. (2013). Human rhinoviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(1), 135–162. https://doi.org/10.1128/CMR.00077-12

Jang, J. Y., & Chun, B. C. (2021). Effect of diurnal temperature range on emergency room visits for acute upper respiratory tract infections. *Environmental Health and Preventive Medicine*, *26*(55), 1–9. https://doi.org/https://doi. org/10.1186/s12199-021-00974-w.

Jannetto, P. J., Buchan, B. W., Vaughan, K. A., Ledford, J. S., Anderson, D. K., Henley, D. C., Quigley, N. B., & Ledeboer, N. A. (2010). Real-time detection of influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus A and B in respiratory specimens by use of nanoparticle probes. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(11), 3997–4002. https://doi.org/10.1128/JCM.01118-10

Jansen, R. R., Schinkel, J., Koekkoek, S., Pajkrt, D., Beld, M., Jong, M. D. d., & Molenkamp, R. (2011). Development and evaluation of a four-tube real time multiplex PCR assay covering fourteen respiratory viruses, and comparison to its corresponding single target counterparts. *Journal of Clinical Virology*, *51*(3), 179–185. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.04.010

Jiang, H., Yang, T., Yang, C., Lu, Y., Yi, Z., Zhang, Q., & Wang, W. (2022). Molecular epidemiology and clinical characterization of human rhinoviruses circulating in Shanghai, 2012-2020. *Archives of Virology*, *167*(4), 1111–1123. https://doi.org/10.1007/s00705-022-05405-x

Johns Hopkins University. (2022). *Coronavirus Resource Center*. Johns Hopkins University Medicine. https://coronavirus.jhu.edu/

Kabir, M. S. (2018). Molecular methods for detection of pathogenic viruses of respiratory tract - A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *8*(5), 237–244. https://doi.org/10.4103/2221-1691.233004

Kadri, K. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and applications. In *Syntehetic Biology-New Interdisciplinary Sciencie* (1° Edition, pp. 1–17). IntechOpen. https://doi.org/10.5772 / intechopen.77541

Karimzadeh, S., Bhopal, R., & Huy, N. T. (2021). Review of infective dose, routes of transmission, and outcome of COVID-19 caused by the SARS-COV-2: comparison with other respiratory viruses. *Epidemiology and Infection*, *149*(96), 1–8. https://doi.org/10.1017/S0950268821000790

Kenmoe, S., Vernet, M.-A., Le Goff, J., Penlap, V. B., Vabret, A., & Njouom, R. (2018). Molecular characterization of human adenovirus associated with acute respiratory infections in Cameroon from 2011 to 2014. *Virology Journal*, *15*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s12985-018-1064-x

Khalaf, N. Z., Najeeb, L. M., & Abdul-Jalil, A. A. (2020). Molecular study of spy1258 gene in streptococcus pyogenes isolated from pharyngitis patients in Fallujah city. *Medico-Legal Update*, *20*(1), 585–590. https://doi.org/10.37506/v20/i1/2020/mlu/194386585

Khalaf, R. J., Fadhil, H. Y., Auf, I. M., & Namdar, S. A. (2017). Molecular diagnosis of human adenovirus in children with upper respiratory tract infections. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, *12*(03), 09–13. https://doi.org/10.9790/3008-1203010913

Khattak, Z., & Anjum, F. (2021). Haemophilus influenzae. *StatPearls Publishing*, 1–17. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562176/#_NBK562176_pubdet_

Kinder, J. T., Klimyte, E. M., Chang, A., Williams, J. V., & Dutch, R. E. (2019). Human metapneumovirus fusion protein triggering: Increasing complexities by analysis of new HMPV fusion proteins. *Virology*, *531*(1), 248–254. https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.03.003

Kloc, A., Rai, D. K., & Rieder, E. (2018). The roles of picornavirus untranslated regions in infection and innate immunity. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00485

Kraupp, T. P., & Aberle, J. H. (2011). Diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *The Open Microbiology Journal*, *5*(2), 128–134.

Krause, J. C., Panning, M., Hengel, H., & Henneke, P. (2014). The Role of Multiplex PCR in Respiratory Tract Infections in Children. *Deutsches Arzteblatt International*, *111*(38), 639–645. https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0639

Kulanayake, S., & Tikoo, S. K. (2021). Adenovirus core proteins: Structure and function. *Viruses*, *13*(3), 1–16. https://doi.org/10.3390/v13030388

Kumar, A., Bhatnagar, A., Gupta, S., Khare, S., & Suman. (2011). sof Gene as a specific genetic marker for detection of Streptococcus pyogenes causing pharyngitis and rheumatic heart disease. *Cellular and Molecular Biology*, *57*(1), 26–30. https://doi.org/10.1170/T898

Kusznierz, G., Chiani, Y., Rudi, J., Ortellao, L., Cantarutti, D., Pierini, J., Cociglio, R., Sioli, N., Ricart, M., Solari, V., Carreño, G., Garate, V. V., & Gasparri, J. (2016). Detección de Streptococcus pneumoniae en niños con neumonía adquirida en la comunidad. *Revista Cubana de Pediatria*, *88*(3), 323–334.

Landry, M. L., Cohen, S., & Ferguson, D. (2008). Prospective study of human metapneumovirus detection in clinical samples by use of light diagnostics direct immunofluorescence reagent and real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(3), 1098–1100. https://doi.org/10.1128/JCM.01926-07

Lau, S. K. P., To, W. K., Tse, P. W. T., Chan, A. K. H., Woo, P. C. Y., Tsoi, H. W., Leung, A. F. Y., Li, K. S. M., Chan, P. K. S., Lim, W. W. L., Yung, R. W. H., Chan, K. H., & Yuen, K. Y. (2005). Human parainfluenza virus 4 outbreak and the role of diagnostic tests. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(9), 4515–4521. https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4515-4521.2005

Leal, S. M., Totten, A. H., Xiao, L., Crabb, D. M., Ratliff, A., Duffy, L. B., Fowler, K. B., Mixon, E., Winchell, J. M., Diaz, M. H., Benitez, A. J., Wolff, B. J., Qin, X., Tang, Y. W., Gonzalez, M., Selvarangan, R., Hong, T., Brooks, E., Dallas, S., … Waites, K. B. (2020). Evaluation of commercial molecular diagnostic methods for detection and determination of macrolide resistance in mycoplasma pneumoniae. *Journal of Clinical Microbiology*, *58*(6), 1–12. https://doi.org/10.1128/JCM.00242-20

Li, Y., Zhang, C., Lu, N., Deng, X., Zang, G., Zhang, S., Tang, H., & Zhang, G. (2019). Involvement of actin-regulating factor cofilin in the inclusion body formation and RNA synthesis of human parainfluenza virus type 3 via interaction with the nucleoprotein. *Frontiers in Microbiology*, *10*(95), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00095

Li, Z., Yi, Y., Luo, X., Xiong, N., Liu, Y., Li, S., Sun, R., Wang, Y., Hu, B., Chen, W., Zhang,

Y., Wang, J., Huang, B., Lin, Y., Yang, J., Cai, W., Wang, X., Cheng, J., Chen, Z., … Ye, F. (2020). Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *Journal of Medical Virology*, 1518–1524. https://doi.org/10.1002/jmv.25727

Ling, L., Kaplan, S. E., Lopez, J. C., Stiles, J., Lu, X., & Tang, Y. W. (2018). Parallel validation of three molecular devices for simultaneous detection and identification of influenza A and B and respiratory syncytial viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(3), 1–6. https://doi.org/10.1128/JCM.01691-17

Liu, D., Hollingshead, S., Swiatlo, E., Lawrence, M. L., & Austin, F. W. (2005). Rapid identification of Streptococcus pyogenes with PCR primers from a putative transcriptional regulator gene. *Research in Microbiology*, *156*(4), 564–567. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.01.010

Lu, X., Holloway, B., Dare, R. K., Kuypers, J., Yagi, S., Williams, J. V., Hall, C. B., & Erdman, D. D. (2008). Real-time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(2), 533–539. https://doi.org/10.1128/JCM.01739-07

Ma, X., Li, Y., Liang, Y., Liu, Y., Yu, L., Li, C., Liu, Q., & Chen, L. (2020). Development of a DNA microarray assay for rapid detection of fifteen bacterial pathogens in pneumonia. *BMC Microbiology*, *20*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/s12866-020-01842-3

Mahmud, B., Horn, C. M., & Tapprich, W. E. (2019). *Structure of the 5' untranslated region of Enteroviral genomic RNA*. *93*(23), 1–16.

Mahony, J. B., Petrich, A., & Smieja, M. (2011). Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, *48*(5–6), 217–249. https://doi.org/10.3109/10408363.2011.640976

Maleki, A., Mansournia, F., Ghafourian, S., Taherikalani, M., Pakzad, I., Mohammadi, J., Kouhsari, E., Mahmoudi, M., & Sadeghifard, N. (2020). Rapid and direct molecular detection of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae isolated in oropharynx and nasal cavity of children. *New Microbes and New Infections*, *33*, 100632. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100632

Mandell, L. A. (2015). Community-acquired pneumonia: An overview. *Postgraduate Medicine*, *127*(6), 607–615. https://doi.org/10.1080/00325481.2015.1074030

Marcone, D. N., Carballal, G., Ricarte, C., & Echavarria, M. (2015). Diágnóstico de virus respiratorios utilizando un sistema automatizado de PCR múltiples (FilmArray) y su comparación con. *Revista Argentina de Microbiologia*, *47*(1), 29–35.

Marimón, J. M., & Navarro-Marí, J. M. (2017). Métodos de diagnóstico rápido de las infecciones respiratorias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *35*(2), 108–115. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.11.007

Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *16*(1), 47–51. https://doi.org/10.1002/jcla.2058

Mathuria, J. P., Yadav, R., & Rajkumar. (2020). Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods. *Journal of Infection and Public Health*, *13*(7), 901–905. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.005

McDonough, E. A., Barrozo, C. P., Russell, K. L., & Metzgar, D. (2005). A multiplex PCR for detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, Legionella pneumophila, and Bordetella pertussis in clinical specimens. *Molecular and Cellular Probes*, *19*(5), 314–322. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.05.002

Medina, J. L., Coalson, J. J., Brooks, E. G., Winter, V. T., Chaparro, A., Principe, M. F. R., Kannan, T. R., Baseman, J. B., & Dube, P. H. (2012). Mycoplasma pneumoniae CARDS toxin induces pulmonary eosinophilic and lymphocytic inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *46*(6), 815–822. https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0135OC

Mellroth, P., Daniels, R., Eberhardt, A., Rönnlund, D., Blom, H., Widengren, J., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2012). LytA, major autolysin of Streptococcus pneumoniae, requires access to nascent peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(14), 11018–11029. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318584

Merida-Vieyra, J., Aquino-Andrade, A., Ribas-Aparicio, R. M., & De ColsaRanero, A. (2017).

Changing the paradigms of M. pneumoniae infection in pediatrics. *Acta Pediatrica de Mexico*, *38*(6), 412–426. https://doi.org/10.18233/apm38no6pp412-4261509

Merida-Vieyra, Jocelin, Aquino-Andrade, A., Palacios-Reyes, D., Murata, C., Ribas-Aparicio, R. M., & De Colsa Ranero, A. (2019). Detection of Mycoplasma pneumoniae in Mexican children with community-acquired pneumonia: Experience in a tertiary care hospital. *Infection and Drug Resistance*, *12*, 925–935. https://doi.org/10.2147/IDR.S193076

Merida-Vieyra, Jocelin, Aquino-Andrade, A., Ribas-Aparicio, R. M., & De Colsa-Ranero, A. (2017). Cambiando los paradigmas de la infección por M. pneumoniae en pediatría. *Acta Pediátrica de México*, *38*(6), 412–426. https://doi.org/10.18233/apm38no6pp412-4261509

Miyashita, N., Saito, A., Kohno, S., Yamaguchi, K., Watanabe, A., Oda, H., Kazuyama, Y., & Matsushima, T. (2004). Multiplex PCR for the simultaneous detection of Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae and Legionella pneumophila in community-acquired pneumonia. *Respiratory Medicine*, *98*(6), 542–550. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2003.11.012

Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., & Schätzl, H. (2013). Molecular virology. In *Molecular Virology* (1st Editio, Vol. 1, pp. 163–181). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-20718-1

Moreno-Valencia, Y., Hernandez-Hernandez, V. A., Romero-Espinoza, J. A. I., Coronel-Tellez, R. H., Castillejos-Lopez, M., Hernandez, A., Perez-Padilla, R., Alejandre-Garcia, A., de la Rosa-Zamboni, D., Ormsby, C. E., & Vazquez-Perez, J. A. (2015). Detection and characterization of respiratory viruses causing acute respiratory illness and asthma exacerbation in children during three different seasons (2011-2014) in Mexico City. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, *9*(6), 287–292. https://doi.org/10.1111/irv.12346

Muir, M. T., Cohn, S. M., Louden, C., Kannan, T. R., & Baseman, J. B. (2011). Novel toxin assays implicate Mycoplasma pneumoniae in prolonged ventilator course and hypoxemia. *Chest*, *139*(2), 305–310. https://doi.org/10.1378/chest.10-1222

Murdoch, D. R., Anderson, T. P., Beynon, K. A., Chua, A., Fleming, A. M., Laing, R. T. R., Town, G. I., Mills, G. D., Chambers, S. T., & Jennings, L. C. (2003). Evaluation of a PCR assay for detection of Streptococcus pneumoniae in respiratory and nonrespiratory samples

from adults with community-acquired pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(1), 63–66. https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.63-66.2003

Murdoch, D. R., Werno, A. M., & Jennings, L. C. (2020). Microbiological diagnosis of respiratory illness: Recent advances. In *Microbiological Diagnosis of Respiratory Illness: Recent Advances* (pp. 396–405). Elsevier.

Murray, P., Rosenthal, K., & Pfalle, M. (2017). Microbiología médica. In *Elsevier* (8° Edición).

Muslin, C., Joffret, M. L., Pelletier, I., Blondel, B., & Delpeyroux, F. (2015). Evolution and emergence of Enteroviruses through intra- and inter-species recombination: Plasticity and phenotypic impact of modular genetic exchanges in the 5' untranslated region. *PLoS Pathogens*, *11*(11), 1–30. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005266

New England BioLabs. (2021). *LunaScript® Multiplex One-Step RT-PCR Kit*. https://international.neb.com/products/e1555-lunascript-multiplex-one-step-rt-pcr-kit#Protocols, Manuals & Usage_Manuals

Nikolaidis, M., Mimouli, K., Kyriakopoulou, Z., Tsimpidis, M., Tsakogiannis, D., Markoulatos, P., & Amoutzias, G. D. (2019). Large-scale genomic analysis reveals recurrent patterns of intertypic recombination in human enteroviruses. *Virology*, *526*(April 2018), 72–80. https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.006

Nishio, M., Tsurudome, M., Garcin, D., Komada, H., Ito, M., Le Mercier, P., Nosaka, T., & Kolakofsky, D. (2011). Human parainfluenza virus type 2 L protein regions required for interaction with other viral proteins and mRNA capping. *Journal of Virology*, *85*(2), 725–732. https://doi.org/10.1128/jvi.01226-10

Núñez-Samudio, V., & Landires, I. (2021). Epidemiology of viral respiratory infections in a pediatric reference hospital in Central Panama. *BMC Infectious Diseases*, *21*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s12879-020-05720-1

Ojeda, S., Munive, R., Moreno, L. C., Torres, A., & Melgar, V. (2016). Epidemiología de las infecciones respiratorias en pacientes pediátricos empleando metodología de PCR múltiple. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, *63*(4), 190–195.

Oliveira, A. P., Simabuco, F. M., Tamura, R. E., Guerrero, M. C., Ribeiro, P. G. G., Libermann,

T. A., Zerbini, L. F., & Ventura, A. M. (2013). Human respiratory syncytial virus N, P and M protein interactions in HEK-293T cells. *Virus Research*, *177*(1), 108–112. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.07.010

Ortiz-Hernández, A. A., Nishimura, K. K., Noyola, D. E., Moreno-Espinosa, S., Gamiño, A., Galindo-Fraga, A., Valdéz-Vázquez, R., Magaña-Aquino, M., Ramirez-Venegas, A., Valdés-Salgado, R., Andrade-Platas, D., Estevez-Jimenéz, J., Ruiz-Palacios, G. M., Guerrero, M. L., Beigel, J., Smolskis, M. C., Hunsberger, S., Freimanis-Hence, L., & Llamosas-Gallardo, B. (2019). "Differential risk of hospitalization among single virus infections causing influenza-like illnesses." *Influenza and Other Respiratory Viruses*, *13*(1), 36–43. https://doi.org/10.1111/irv.12606

Osiowy, C. (1998). Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(11), 3149–3154. https://doi.org/10.1128/jcm.36.11.3149-3154.1998

Panjkovich, A., & Melo, F. (2005). Comparison of different melting temperature calculation methods for short DNA sequences. *Bioinformatics*, *21*(6), 711–722. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti066

Paternotte, N., Kamies, B., Boersma, W. G., & Van Der Reijden, W. A. (2019). Adjusted lytA qPCR for improved detection of Streptococcus pneumoniae in community-acquired pneumonia. *European Resiratory Journal*, *63*, PA4550. https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2019.pa4550

Pehler-Harrington, K., Khanna, M., Waters, C. R., & Henrickson, K. J. (2004). Rapid detection and identification of human adenovirus species by Adenoplex, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(9), 4072–4076. https://doi.org/10.1128/JCM.42.9.4072-4076.2004

Pierce, V. M., Elkan, M., Leet, M., McGowan, K. L., & Hodinka, R. L. (2012). Comparison of the idaho technology FilmArray system to real-time PCR for detection of respiratory pathogens in children. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(2), 364–371. https://doi.org/10.1128/JCM.05996-11

Pinsky, B. A., & Hayden, R. T. (2019). Cost-effective respiratory virus testing. *Journal of Clinical Microbiology*, *57*(9), 1–11. https://doi.org/10.1128/JCM.00373-19

Polat, E., & Yucel, H. (2021). Evaluation of viral acute lower respiratory tract infections detected with real-time polymerase chain reaction. *Turkish Journal of Pediatric Disease*, *15*, 129–136. https://doi.org/10.12956/tchd.827700

Popowitch, E. B., O'Neill, S. S., & Miller, M. B. (2013). Comparison of the biofire filmarray RP, Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP fast multiplex assays for detection of respiratory viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(5), 1528–1533. https://doi.org/10.1128/JCM.03368-12

Prjibelski, A. D., Korobeynikov, A. I., & Lapidus, A. L. (2019). Sequence analysis. In S. Ranganathan, K. Nakai, & C. Schonbach (Eds.), *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics* (1st Editio, Vol. 3, pp. 292–322). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20106-4

Qiagen. (2021). *Products. Infectious disease*. https://www.qiagen.com/mx/product-categories/diagnostics-and-clinical-research/infectious-disease/

Ramasamy, K., Balasubramanian, S., Kirkpatrick, A., Szabo, D., Pandranki, L., Baseman, J. B., & Kannan, T. R. (2021). Mycoplasma pneumoniae CARDS toxin exploits host cell endosomal acidic pH and vacuolar ATPase proton pump to execute its biological activities. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-021-90948-3

Reddington, K., Schwenk, S., Tuite, N., Platt, G., Davar, D., Coughlan, H., Personne, Y., Gant, V., Enne, V. I., Zumla, A., & Barry, T. (2015). Comparison of established diagnostic methodologies and a novel bacterial smpB real-time PCR assay for specific detection of haemophilus influenzae isolates associated with respiratory tract infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(9), 2854–2860. https://doi.org/10.1128/JCM.00777-15

ResearchGate. (2017). *How much delta G is permissible for cross dimer, self dimer and hairpin?* ResearchGate-Question. https://www.researchgate.net/post/How_much_delta_G_is_permissible_for_cross_dimer_self_dimer_and_hairpin

Robertson, J. M., & Walsh-Weller, J. (1998). An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions. In *Methods in molecular biology* (Vol. 98, Issue 12, pp. 121–154). Humana Press. https://doi.org/10.1385/0-89603-443-7:121

Romero, R., & Feregrino, R. (2014). *Manual de infecciones del aparato respiratorio* (1° Edición). http://liomont.com/ManualdeInfeccionesdelAparatoRespiratorioLiomont.pdf#page=78

Sakai-Tagawa, Y., Ozawa, M., Tamura, D., Le, M. T. Q., Nidom, C. A., Sugaya, N., & Kawaoka, Y. (2010). Sensitivity of influenza rapid diagnostic tests to H5N1 and 2009 pandemic H1N1 viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(8), 2872–2877. https://doi.org/10.1128/JCM.00439-10

Sanz, J. C., Ríos, E., Rodríguez-Avial, I., Ramos, B., Marín, M., & Cercenado, E. (2018). Identification of Streptococcus pneumoniae lytA, plyA and psaA genes in pleural fluid by multiplex real-time PCR. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *36*(7), 428–430. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.07.007

Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Ostell, J., Pruitt, K. D., & Karsch-Mizrachi, I. (2019). GenBank. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D94–D99. https://doi.org/10.1093/nar/gky989

Secretaría de Salud. (2012). *Manual de Enfermedades Respiratorias 2012 Prevención , diagnóstico y tratamiento* (1° Edición, Vol. 1). http://docplayer.es/5119976-Manual-de-enfermedades-respiratorias-2012-prevencion-diagnostico-y-tratamiento.html

Secretaría de Salud. (2015). *Infecciones respiratorias agudas*. https://www.gob.mx/salud/articulos/infecciones-respiratorias-agudas-iras

Secretaría de Salud. (2021). Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por fuente de notificación. *Anuario de Morbilidad 1984 - 2021*, 1.

Secretaría de Salud. (2022). *Informe Técnico Diario COVID-19 MÉXICO*. Coronavirus.Org. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/653191/Comunicado_Tecnico_Diario_COVID-19_2021.07.13.pdf

Secretaría de Salud, & Dirección General de Epidemiología. (2022). *Formato SUIVE-1-2022*. Lineamiento estandarizado para la vigilancia epidemiológica y por laboratorio de la

enfermedad respiratoria viral. https://www.gob.mx/salud/documentos/lineamiento-estandarizado-para-la-vigilancia-epidemiologica-y-por-laboratorio-de-la-enfermedad-respiratoria-viral

Secretaría de Salud, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, & Dirección General de Epidemiología. (2021). *Listado de Pruebas Moleculares por RT-PCR, útiles para el diagnóstico de SARS-CoV-2 durante la contingencia de COVID-19 en México*. Secretaría de Salud. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/626987/Listado_de_pruebas_moleculares__tiles_por_RT-PCR_evaluadas_para_el_diagn_stico_de_SARS-CoV-2.pdf

Secretaría de Salud, & Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2009). Epidemiología. In *Epidemiologia* (Vol. 26).

Shabani, E., Dowlatshahi, S., & Abdekhodaie, M. J. (2021). Laboratory detection methods for the human coronaviruses. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *40*(2), 225–246. https://doi.org/10.1007/s10096-020-04001-8

Sievers, F., & Higgins, D. G. (2020). Multiple Sequence Alignment. In K. Katoh (Ed.), *Multiple Sequence Alignment* (pp. 3–16). Springer Nature. https://doi.org/10.1201/9781420070347-10

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, *7*(539), 1–6. https://doi.org/10.1038/msb.2011.75

Silva, E. R. M., Watanabe, A. S. A., Carraro, E., Perosa, A. H. S., Granato, C. F. H., & Bellei, N. C. J. (2012). Rhinovirus detection using different PCR-based strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(2), 739–743. https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200038

Simoes, E. A. F., Cherian, T., Chow, J., Shahid-Salles, S. A., Laxminarayan, R., & John, T. J. (2006). Acute respiratory infections in children. In D. T. Jamison, J. G. Breman, A. R. Measham, G. Alleyne, M. Claeson, D. B. Evans, P. Jha, A. Mills, & P. Musgrove (Eds.), *Oxford University Press* (Vol. 7, Issue 2, pp. 483–497). https://doi.org/10.1097/00001432-

199404000-00002

Slinger, R., Goldfarb, D., Rajakumar, D., Moldovan, I., Barrowman, N., Tam, R., & Chan, F. (2011). Rapid PCR detection of group a streptococcus from flocked throat swabs: A retrospective clinical study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *10*, 1–5. https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-33

Smith, M. D., Sheppard, C. L., Hogan, A., Harrison, T. G., Dance, D. A. B., Derrington, P., & George, R. C. (2009). Diagnosis of Streptococcus pneumoniae infections in adults with bacteremia and community-acquired pneumonia: Clinical comparison of pneumococcal PCR and urinary antigen detection. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*(4), 1046–1049. https://doi.org/10.1128/JCM.01480-08

Somerville, L. K., Mala Ratnamohan, V., Dwyer, D. E., & Kok, J. (2015). Molecular diagnosis of respiratory viruses. *Pathology*, *47*(3), 243–249. https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000240

Soucek, D. K., Dumkow, L. E., VanLangen, K. M., & Jameson, A. P. (2019). Cost justification of the BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis panel versus standard of care for diagnosing meningitis in a community hospital. *Journal of Pharmacy Practice*, *32*(1), 36–40. https://doi.org/10.1177/0897190017737697

Spellerberg, B., & Brandt, C. (2016). Laboratory diagnosis of Streptococcus pyogenes (group A streptococci). In J. J. Ferretti, D. L. Stevens, & V. A. Fischetti (Eds.), *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* (pp. 1–13). University of Oklahoma Health Sciences Center. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343617/#:~:text=For presumptive identification of S,culture time of 48 hours.

Stroparo, E., Cruz, C. R., Debur, M. do C., Vidal, L. R., Nogueira, M. B., de Almeida, S. M., Pereira, L. A., Rotta, I., & Raboni, S. M. (2010). Adenovirus respiratory infection: significant increase in diagnosis using PCR comparing with antigen detection and culture methods. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *52*(6), 317–321. https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000600006

Tang, Y., Schmitz, J. E., Persing, D. H., & Stratton, C. W. (2020). Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *Journal of Clinical Microbiology*, *58*(6), 1–9.

Tapparel, C., Junier, T., Gerlach, D., Van Belle, S., Turin, L., Cordey, S., Mühlemann, K., Regamey, N., Aubert, J. D., Soccal, P. M., Eigenmann, P., Zdobnov, E., & Kaiser, L. (2009). New respiratory enterovirus and recombinant rhinoviruses among circulating picornaviruses. *Emerging Infectious Diseases*, *15*(5), 719–726. https://doi.org/10.3201/eid1505.081286

Tavares, D. A., Handem, S., Carvalho, R. J., Paulo, A. C., de Lencastre, H., Hinds, J., & Sá-Leão, R. (2019). Identification of Streptococcus pneumoniae by a real-time PCR assay targeting SP2020. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39791-1

ThermoFisher Scientific. (2019). *260/280 and 260/230 Ratios*. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers. https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf

ThermoFisher Scientific. (2022). *5 screening methods every scientist should know*. Molecular Biology Spotlight Articles. https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/5-ways-screen-recombinant-clones.html

Thomas, M., & Bomar, P. A. (2020). *Upper Respiratory Tract Infection*. StatPearls. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532961/

Thurman, K. A., Warner, A. K., Cowart, K. C., Benitez, A. J., & Winchell, J. M. (2011). Detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, and Legionella spp. in clinical specimens using a single-tube multiplex real-time PCR assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *70*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.11.014

Tiveljung-Lindell, A., Rotzén-Östlund, M., Gupta, S., Ullstrand, R., Grillner, L., Zweygberg-Wirgart, B., & Allander, T. (2009). Development and implementation of a molecular diagnostic platform for daily rapid detection of 15 respiratory viruses. *Journal of Medical Virology*, *81*(1), 167–175. https://doi.org/10.1002/jmv.21368

Torres, A., Lee, N., Cilloniz, C., Vila, J., & Van Der Eerden, M. (2016). Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age. *European Respiratory Journal*, *48*(6), 1764–1778.

https://doi.org/10.1183/13993003.01144-2016

Tripathi, R., Awasthi, S., Zia, A., Saxena, S., Singh, D., Pandey, A., Bhattacharya, P., & Dhole, T. N. (2019). Comparison of PCR and cell culture for human adenoviruses detection in gastroenteritis and respiratory tract infected north Indian children. *International Journal of Pharmaceutical Sciencies and Research*, *10*(6), 2884–2891. https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(6).2884-91

Uniprot. (2022a). *Human respiratory syncytial virus B (strain 18537) Gene N*. P24566 · NCAP_HRSV1. https://www.uniprot.org/uniprotkb/P24566/entry

Uniprot. (2022b). *Penton protein · Human adenovirus C serotype 5 (HAdV-5) (Human adenovirus 5) Gene L2*. P12538 · CAPSP_ADE05. https://www.uniprot.org/uniprotkb/P12538/entry

Vacaflores, A., Ashavaid, T., Payne, D. A., Linder, M. W., Baluchova, K., Pan, S., Huggett, J., & Ahmad-Nejad, P. (2022). Molecular diagnostics of SARS-CoV-2: Findings of an international survey. *Clinica Chimica Acta*, *531*, 237–242. https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.04.007

Van Elden, L. J. R., Nijhuis, M., Schipper, P., Schuurman, R., & Van Loon, A. M. (2001). Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(1), 196–200. https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.196-200.2001

Vernet, G., Saha, S., Satzke, C., Burgess, D. H., Alderson, M., Maisonneuve, J. F., Beall, B. W., Steinhoff, M. C., & Klugman, K. P. (2011). Laboratory-based diagnosis of pneumococcal pneumonia: state of the art and unmet needs. *Clinical Microbiology and Infection*, *17*(3), 1–13. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03496.x

Walter, J. M., & Wunderink, R. G. (2018). Testing for Respiratory Viruses in Adults With Severe Lower Respiratory Infection. *Elsevier*, *5*(154), 1213–1222. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.06.003

Wang, R., Hozumi, Y., & Yin, C. (2020). Mutations on COVID-19 diagnostic targets. *Genomics*, *112*(January), 204–213.

https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.09.028

Widhidewi, N. W., Wiyatno, A., Dewantari, A. K., Paramasatiari, L., Aryastuti, S. A., Artika, I. N., Setiawan, W. D., Soebandrio, A., Aye Myint, K. S., & safari, D. (2020). Identification of viral etiology of acute respiratory tract infections in children and adults in Tabanan, Bali, Indonesia. *Access Microbiology*, *2*(6), 1–5. https://doi.org/10.1099/acmi.0.000120

Williams, J., & Shafagati, N. (2018). Human metapneumovirus - what we know now. *F1000Research*, *7*(0), 1–11. https://doi.org/10.12688/f1000research.12625.1

Winchell, J. M., Thurman, K. A., Mitchell, S. L., Thacker, W. L., & Fields, B. S. (2008). Evaluation of three real-time PCR assays for detection of Mycoplasma pneumoniae in an outbreak investigation. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(9), 3116–3118. https://doi.org/10.1128/JCM.00440-08

Wong-Chew, Rosa M., Espinoza, M. A., Taboada, B., Aponte, F. E., Arias-Ortiz, M. A., Monge-Martínez, J., Rodríguez-Vázquez, R., Díaz-Hernández, F., Zárate-Vidal, F., Santos-Preciado, J. I., López, S., & Arias, C. F. (2015). Prevalence of respiratory virus in symptomatic children in private physician office settings in five communities of the state of Veracruz, Mexico. *BMC Research Notes*, *8*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/s13104-015-1239-0

Wong-Chew, Rosa María, García-León, M. L., Noyola, D. E., Perez-Gonzalez, L. F., Gaitan-Meza, J., Vilaseñor-Sierra, A., Martinez-Aguilar, G., Rivera-Nuñez, V. H., Newton-Sánchez, O. A., Firo-Reyes, V., Del Río-Almendarez, C. N., González-Rodríguez, A. P., Ortiz-García, E. R., Navarrete-Navarro, S., Soria-Rodríguez, C., Carrasco-Castillo, A., Sánchez-Medina, E., López-Martínez, I., Hernández-Andrade, T., … Santos-Preciado, J. I. (2017). Respiratory viruses detected in Mexican children younger than 5 years old with community-acquired pneumonia: a national multicenter study. *International Journal of Infectious Diseases*, *62*(November 2015), 32–38. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.06.020

Wong, A. Y. W., Johnsson, A. T. A., Ininbergs, K., Athlin, S., & Özenci, V. (2021). Comparison of four streptococcus pneumoniae urinary antigen tests using automated readers. *Microorganisms*, *9*(4), 1–11. https://doi.org/10.3390/microorganisms9040827

World Health Organization. (2018). *Influenza (Seasonal)*. Centro de Prensa/ Notas Descriptivas. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)

World Health Organization. (2019). *Pneumonia*. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia

World Health Organization. (2021). *WHO information for the molecular detection of influenza viruses*.

Wright, P. F., Deatly, A. M., Karron, R. A., Belshe, R. B., Shi, J. R., Gruber, W. C., Zhu, Y., & Randolph, V. B. (2007). Comparison of results of detection of rhinovirus by PCR and viral culture in human nasal wash specimens from subjects with and without clinical symptoms of respiratory illness. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(7), 2126–2129. https://doi.org/10.1128/JCM.02553-06

Wu, X., Zhang, J., Lan, W., Quan, L., Ou, J., Zhao, W., Wu, J., Woo, P. C. Y., Seto, D., & Zhang, Q. (2022). Molecular typing and rapid identification of human Adenoviruses associated with respiratory diseases using universal PCR and sequencing primers for the three major capsid genes: Penton Base, Hexon, and Fiber. *Frontiers in Microbiology*, *13*(May), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.911694

Wyllie, A. L., Pannekoek, Y., Bovenkerk, S., van Engelsdorp Gastelaars, J., Ferwerda, B., van de Beek, D., Sanders, E. A. M., Trzciński, K., & van der Ende, A. (2017). Sequencing of the variable region of rpsB to discriminate between *Streptococcus pneumoniae* and other streptococcal species. *Open Biology*, *7*(9), 5–7. https://doi.org/10.1098/rsob.170074

XH, C., JH, W., & XH, Y. (2015). Clinical utility of a near patient care microarray based diagnostic test for influenza and respiratory syncytial virus infections. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *8*(9), 16504–16511.

Xing, W., Liu, Y., Wang, H., Li, S., Lin, Y., Chen, L., Zhao, Y., Chao, S., Huang, X., Ge, S., Deng, T., Zhao, T., Li, B., Wang, H., Wang, L., Song, Y., Jin, R., He, J., Zhao, X., … Cheng, J. (2020). A high-throughput, multi-index isothermal amplification platform for rapid detection of 19 types of common respiratory viruses including SARS-CoV-2. *Engineering*, *6*(10), 1130–1140. https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.07.015

Xu, W., McDonough, M. C., & Erdman, D. D. (2000). Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex pcr assay. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(11), 4114–4120. https://doi.org/10.1128/jcm.38.11.4114-4120.2000

Yang, C. F., Wang, C. K., Tollefson, S. J., Piyaratna, R., Lintao, L. D., Chu, M., Liem, A., Mark, M., Spaete, R. R., Crowe, J. E., & Williams, J. V. (2009). Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years. *Virology Journal*, *6*(138), 1–10. https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-138

Yang, J. R., Kuo, C. Y., Huang, H. Y., Wu, F. T., Huang, Y. L., Cheng, C. Y., Su, Y. T., Chang, F. Y., Wu, H. S., & Liu, M. T. (2014). Newly emerging mutations in the matrix genes of the human influenza a(h1n1)pdm09 and a(h3n2) viruses reduce the detection sensitivity of real-time reverse transcription-pcr. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(1), 76–82. https://doi.org/10.1128/JCM.02467-13

Yang, Q., Li, X., Ali, H. A. bdella. A., Yu, S., Zhang, Y., Wu, M., Gao, S., Zhao, G., Du, Z., & Zhang, G. (2015). Evaluation of suitable control genes for quantitative polymerase chain reaction analysis of maternal plasma cell-free DNA. *Molecular Medicine Reports*, *12*(5), 7728–7734. https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4334

Yang, Y., Wu, Y., Meng, X., Wang, Z., Younis, M., Liu, Y., Wang, P., & Huang, X. (2022). SARS-CoV-2 membrane protein causes the mitochondrial apoptosis and pulmonary edema via targeting BOK. *Cell Death and Differentiation / Nature*, *June 2021*, 1–14. https://doi.org/10.1038/s41418-022-00928-x

Yezli, S., & Otter, J. A. (2011). Minimum infective dose of the major human respiratory and enteric viruses transmitted through food and the environment. *Food and Environmental Virology*, *3*(1), 1–30. https://doi.org/10.1007/s12560-011-9056-7

Zhang, W., Chen, C., Cui, J., Bai, W., & Zhou, J. (2015). Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid diagnosis of pathogenic bacteria in clinical sputum specimens of acute exacerbation of COPD (AECOPD). *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *8*(5), 7881–7889.

Zhang, Y., Cao, L., Xu, Z., Zhu, P., Huang, B., Li, K., Xu, Y., Zhang, Z., Wu, Y., & Di, B. (2020). Evaluation of a multiplex PCR assay for detection of respiratory viruses and

Mycoplasma pneumoniae in oropharyngeal swab samples from outpatients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *34*(1), 1–5. https://doi.org/10.1002/jcla.23032

Zhao, X., He, X., Li, H., Zhao, J., Huang, S., Liu, W., Wei, X., Ding, Y., Wang, Z., Zou, D., Wang, X., Dong, D., Yang, Z., Yan, X., Huang, L., Du, S., & Yuan, J. (2015). Detection of *Streptococcus pyogenes* using rapid visual molecular assay. *FEMS Microbiology Letters*, *362*(18), 1–5. https://doi.org/10.1093/femsle/fnv148

Zimmerman, P. A., King, C. L., Ghannoum, M., Bonomo, R. A., & Procop, G. W. (2021). Molecular diagnosis of SARS-CoV-2: Assessing and interpreting nucleic acid and antigen tests. *Pathogens and Immunity*, *6*(1), 135–156. https://doi.org/10.20411/pai.v6i1.422

ANEXO 1 AMPLIFICADOS

A continuación, se muestran los amplicones generados de cada biomarcador al añadir los sitios de restricción a los primers. Se pueden identificar a los primers señalados en color morado. En rojo se muestra el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción. Las flechas azules indican el sitio de corte. Señalado en color azul se muestra la secuencia que se obtendrá una vez que las enzimas realicen los cortes.

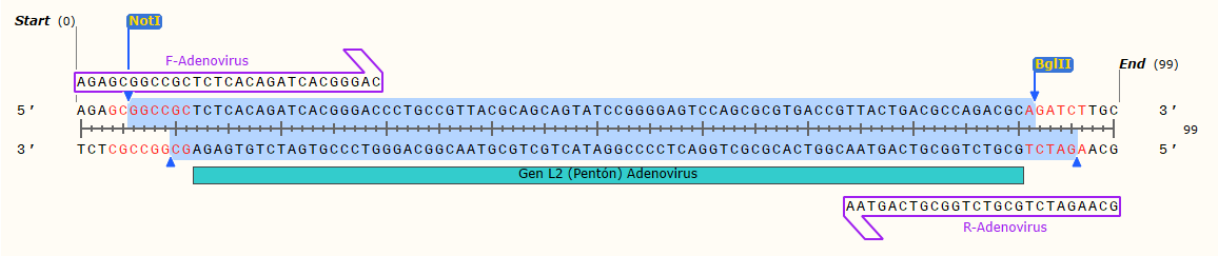


Figura 18. *Amplicón con sitios de restricción del gen L2 del adenovirus*

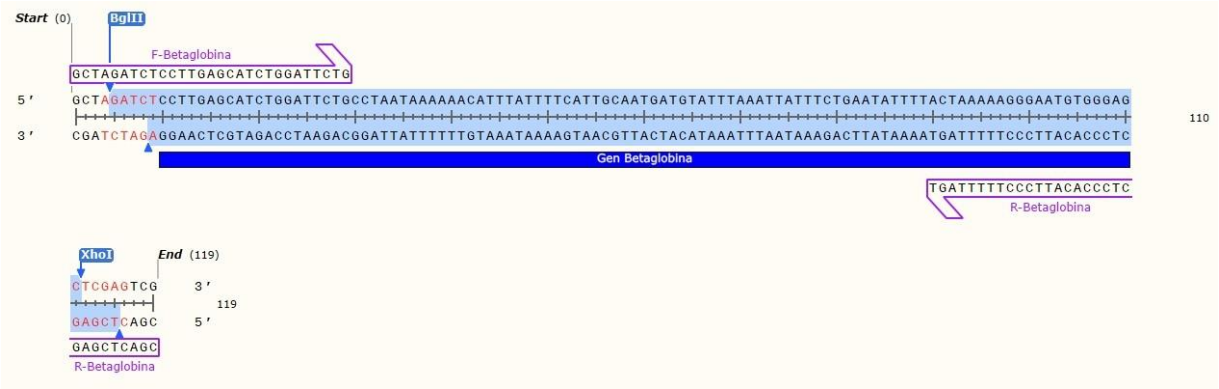


Figura 19. *Amplicón con sitios de restricción del gen HBB de la subunidad beta de la hemoglobina humana*

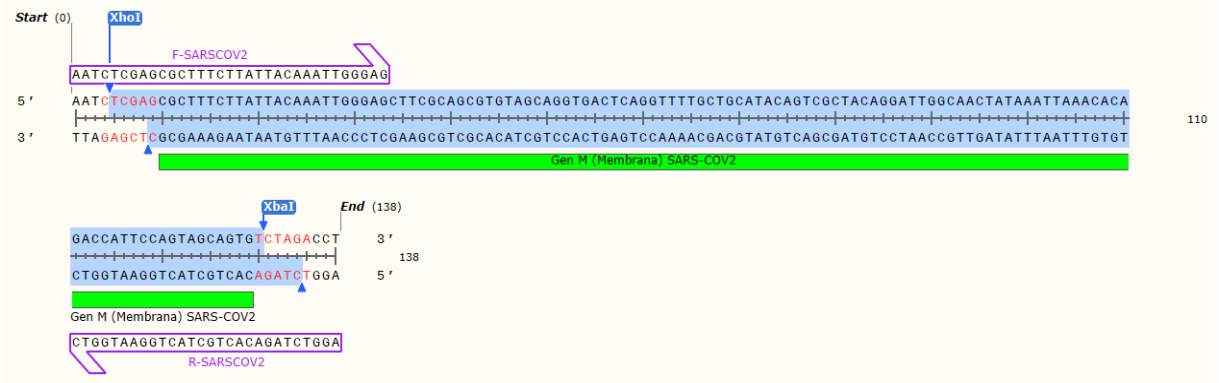


Figura 20. *Amplicón con sitios de restricción del gen M del SARS-CoV-2*

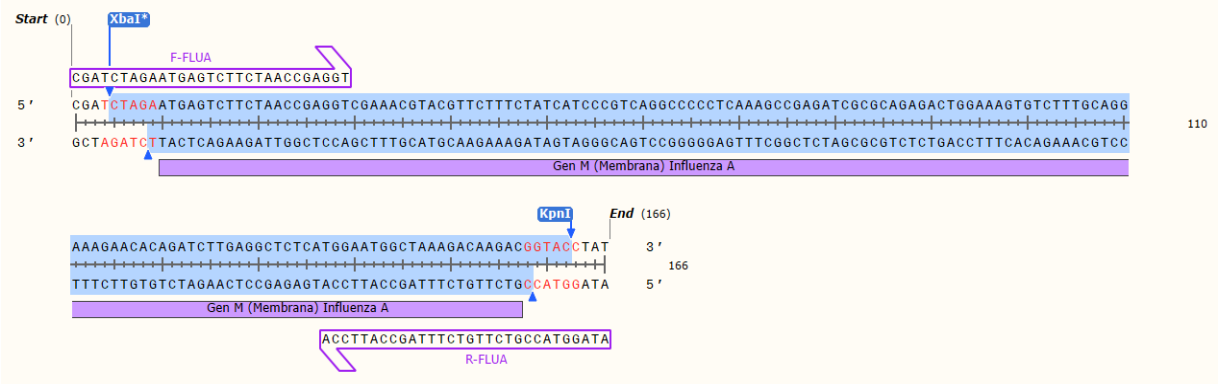


Figura 21. *Amplicón con sitios de restricción del gen M del virus de la influenza A*

Figura 22. *Amplicón con sitios de restricción del gen mpn372 de Mycoplasma pneumoniae*

Figura 23. *Amplicón con sitios de restricción del gen F del metapneumovirus humano*

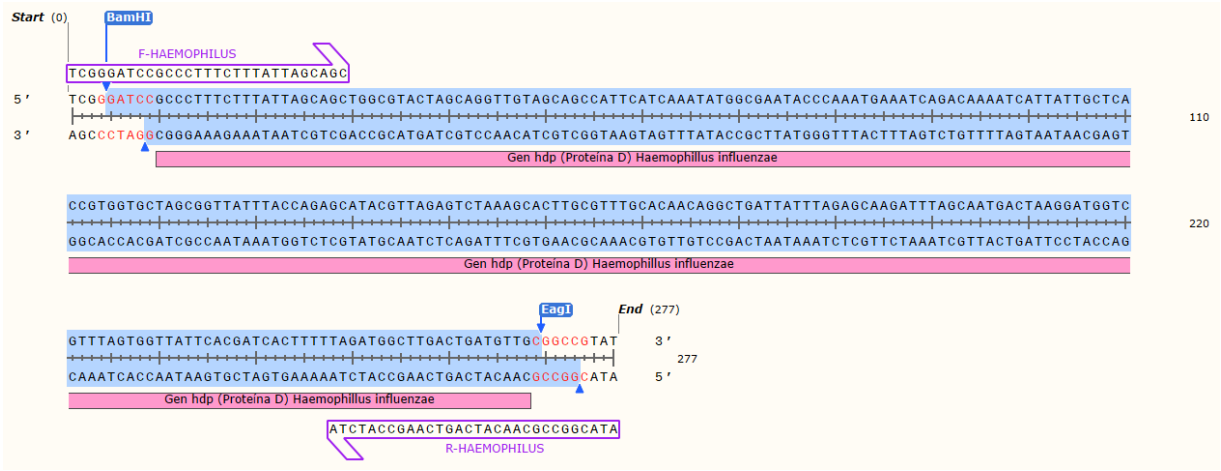


Figura 24. *Amplicón con sitios de restricción del gen hdp de Haemophilus influenzae*

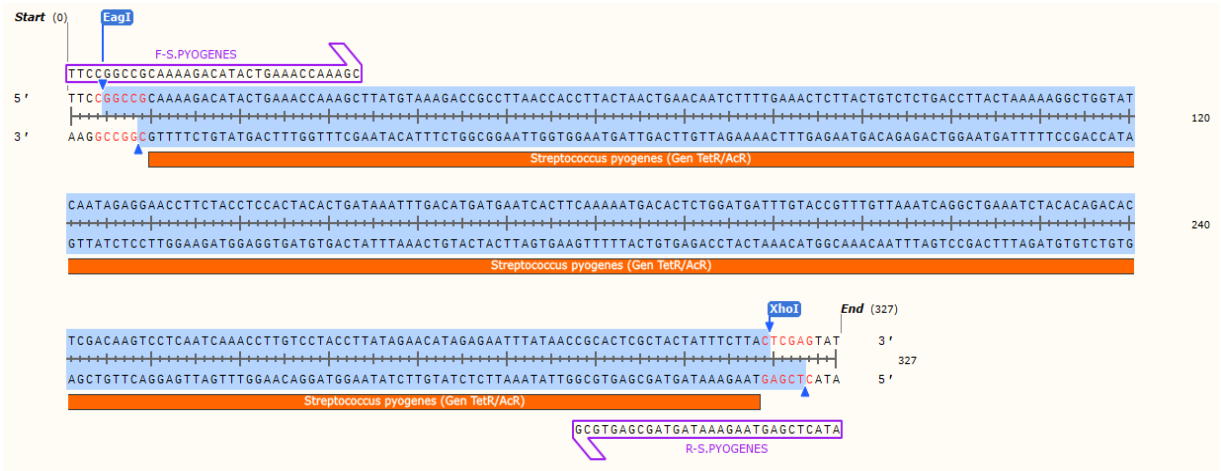


Figura 25. *Amplicón con sitios de restricción del gen spy1258 de Streptococcus pyogenes*

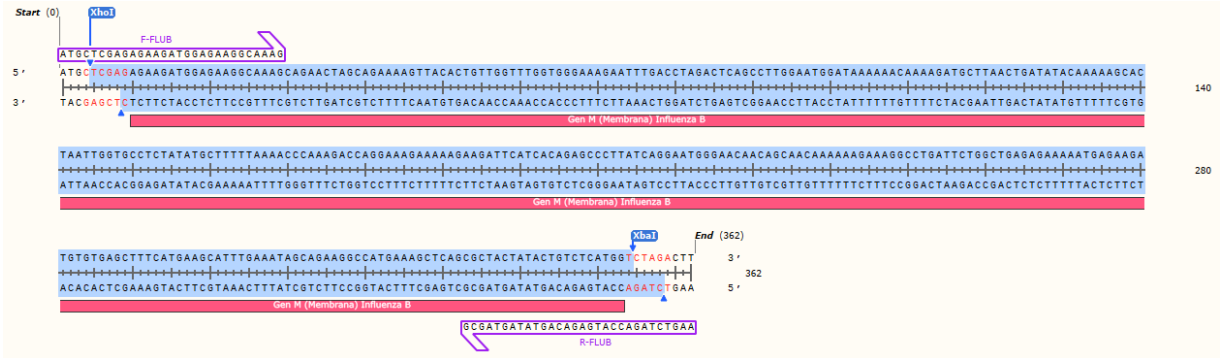


Figura 26. *Amplicón con sitios de restricción del gen M del virus de la influenza B*

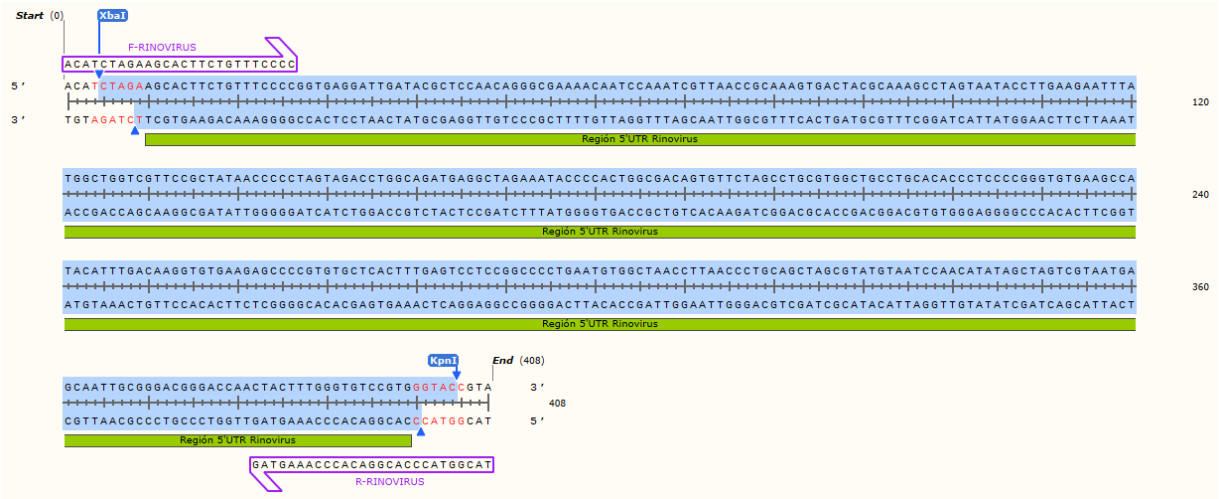


Figura 27. *Amplicón con sitios de restricción de la región 5´UTR del rinovirus*

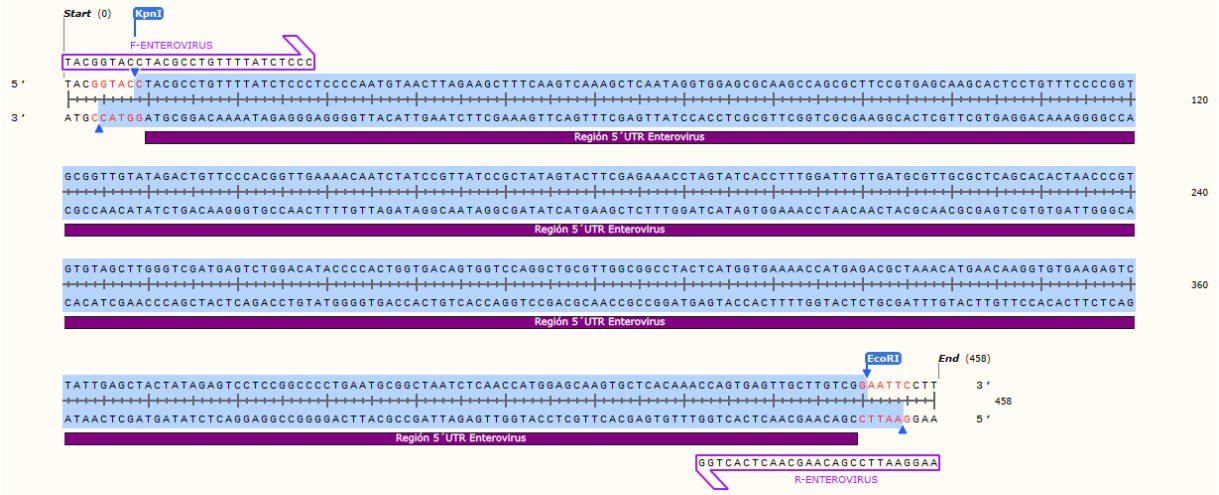


Figura 28. *Amplicón con sitios de restricción de la región 5'UTR del enterovirus D68*

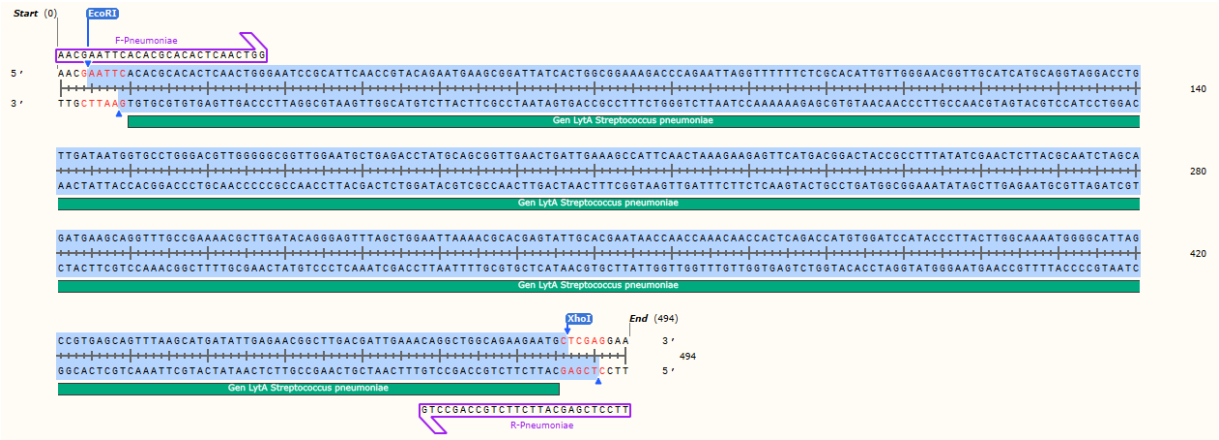


Figura 29. *Amplicón con sitios de restricción del gen lytA de Streptococcus pneumoniae*

Figura 30. *Amplicón con sitios de restricción del gen N del virus sincitial respiratorio*

Figura 31. *Amplicón con sitios de restricción del gen L del virus de la parainfluenza humana 1-3*

Figura 32. *Amplicón con sitios de restricción del gen L del virus de la parainfluenza humana 2*

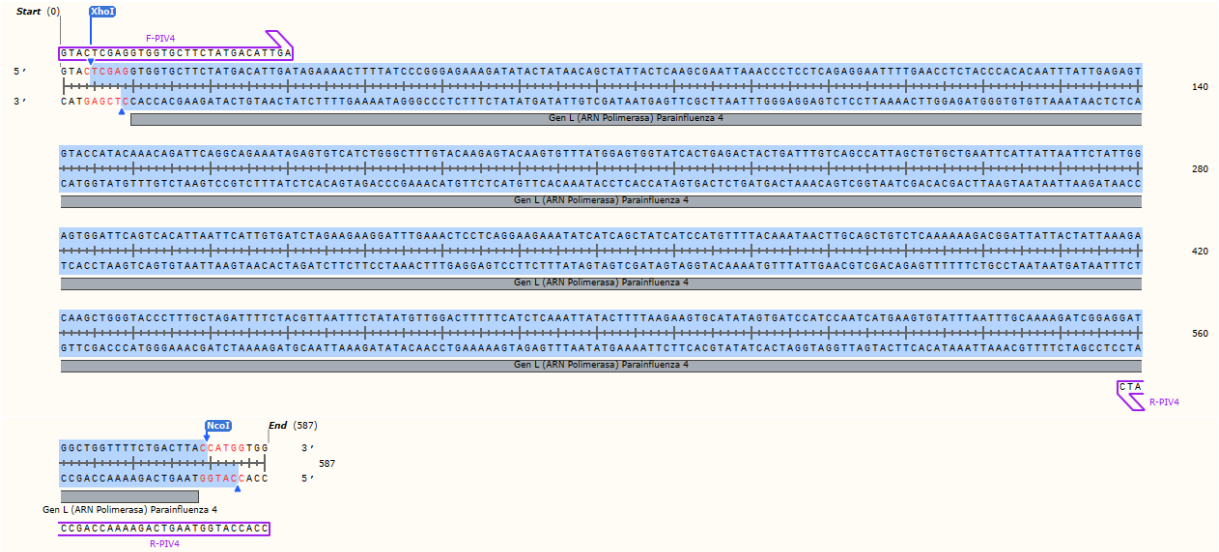


Figura 33. *Amplicón con sitios de restricción del gen L del virus de la parainfluenza humana 4*

ANEXO II ALINEAMIENTOS

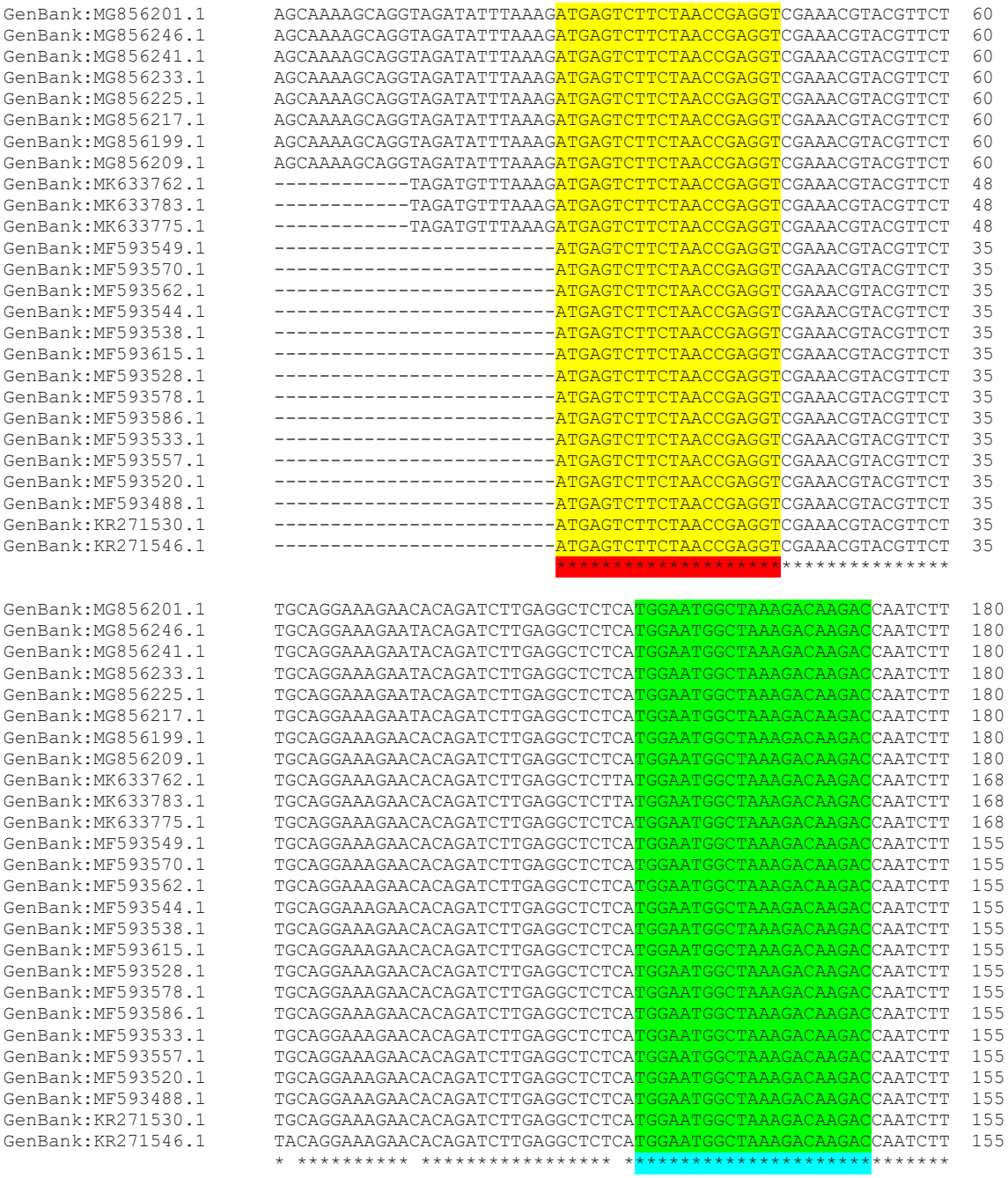


Figura 34. *Alineamiento de la secuencia del gen M del virus de la influenza A.*

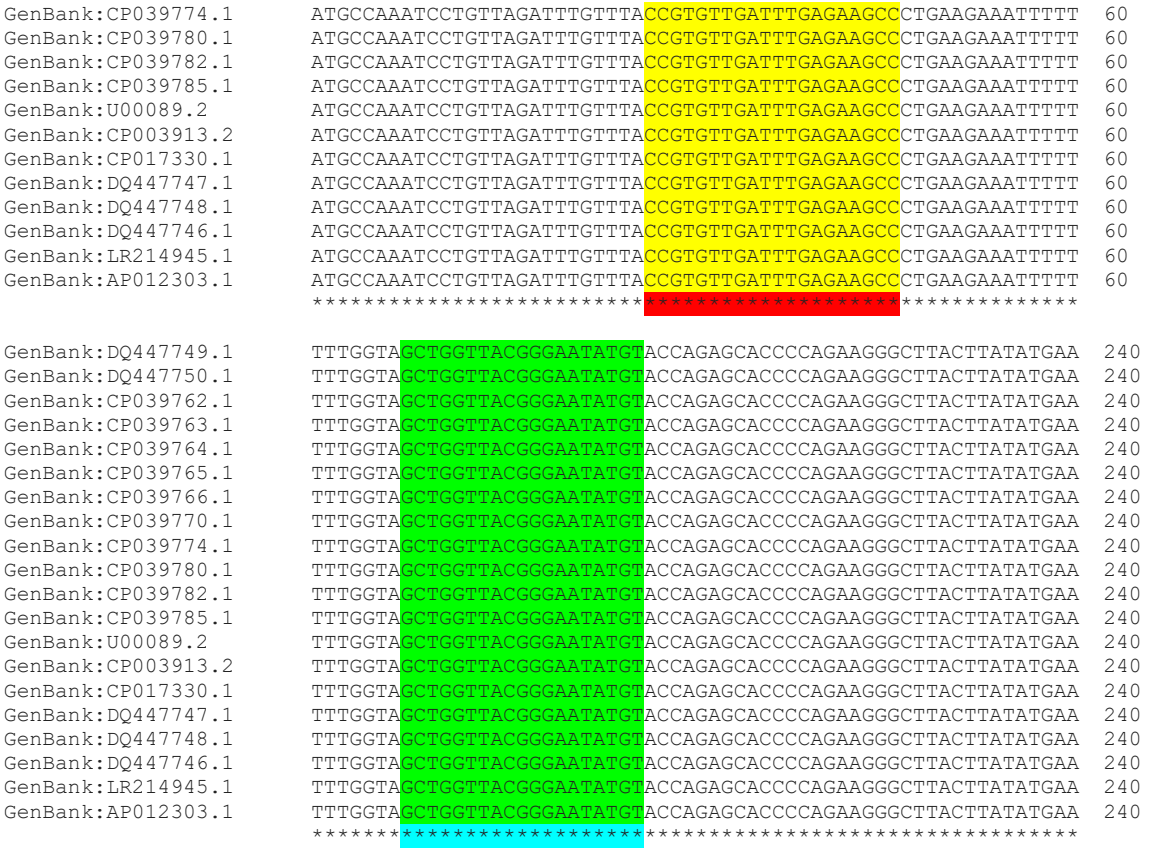


Figura 35. *Alineamiento de la secuencia del gen mpn372 de Mycoplasma pneumoniae.*

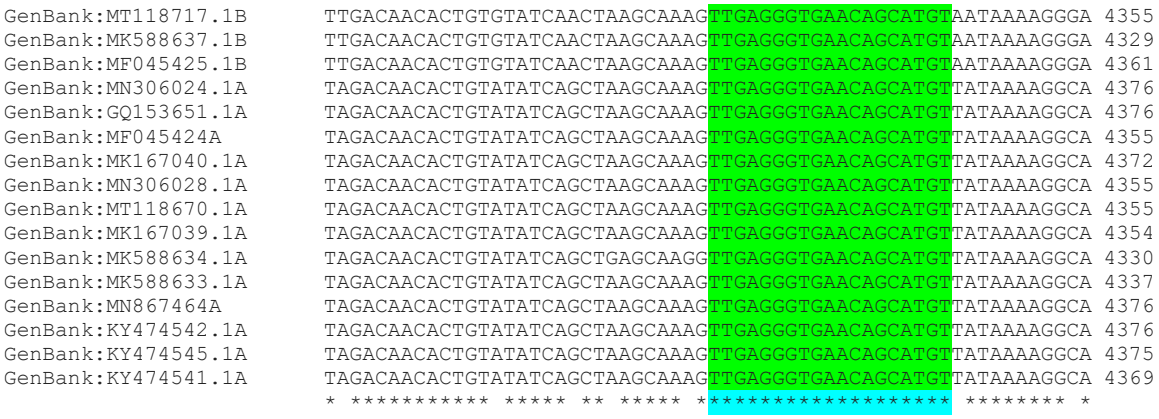


Figura 36. *Alineamiento de la secuencia del gen F del metapneumovirus humano.*

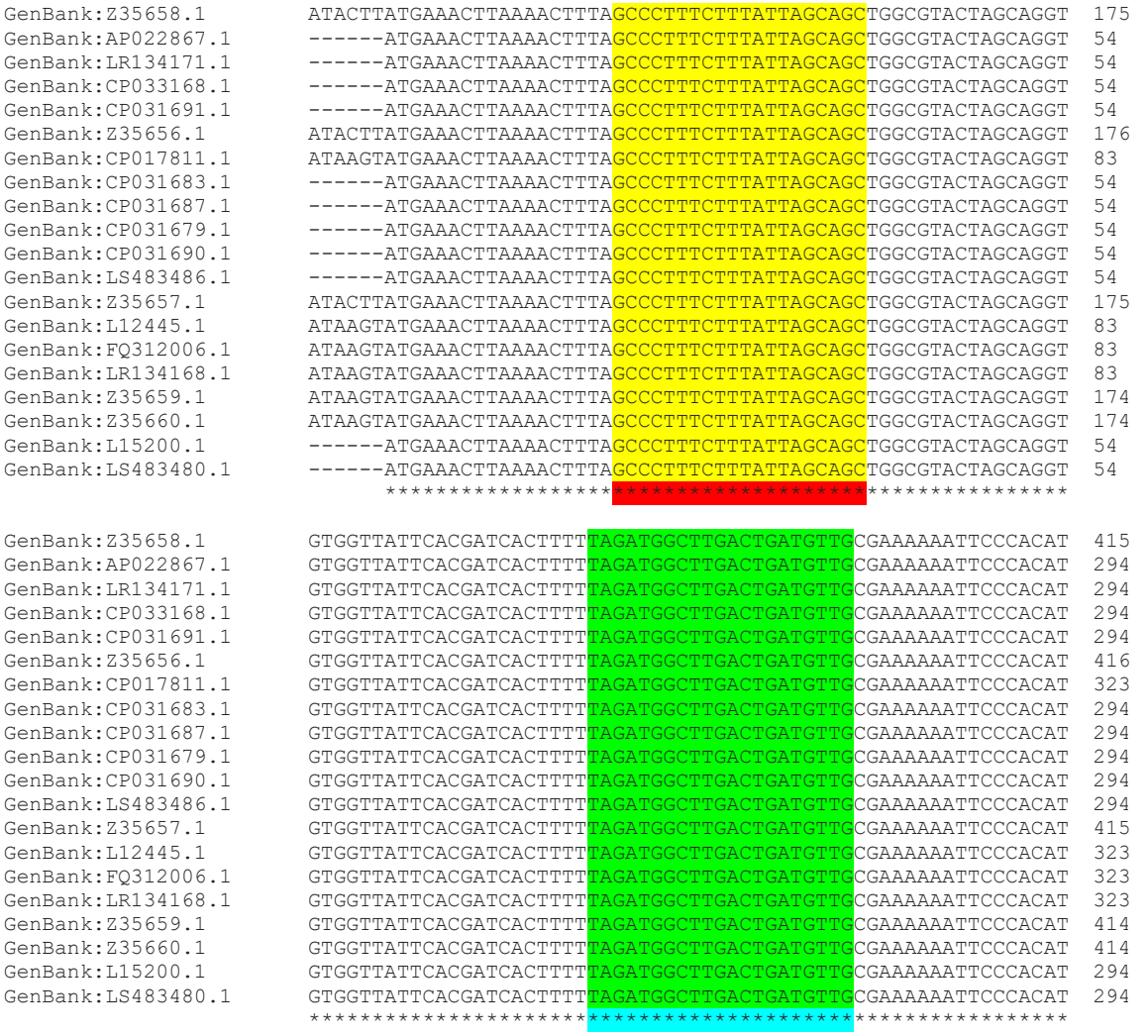
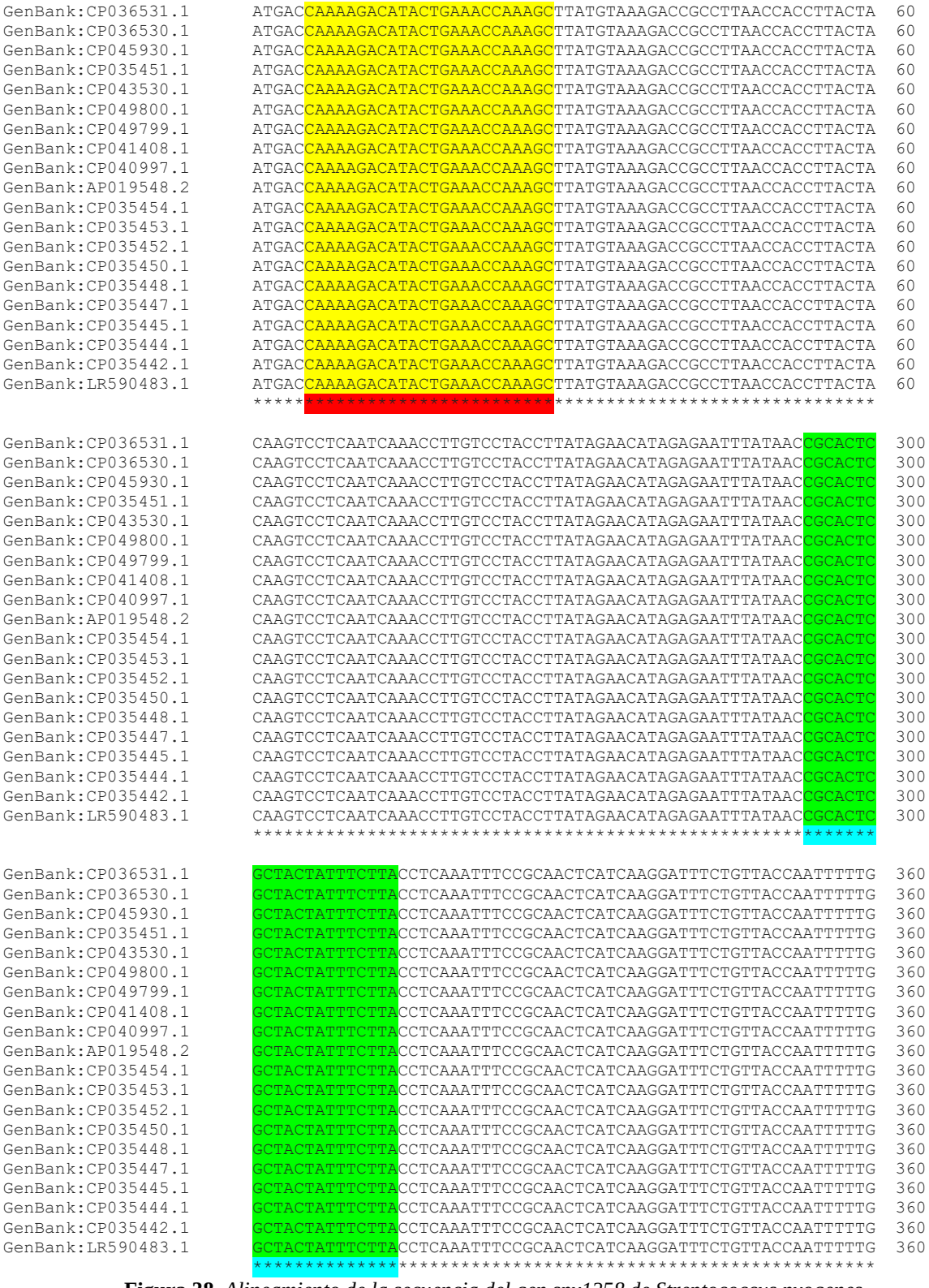


Figura 37. *Alineamiento de la secuencia del gen hpd de Haemophilus influenzae.*


GenBank:CP036531.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP036530.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP045930.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP035451.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP043530.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP049800.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP049799.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP041408.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP040997.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:AP019548.2 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP035454.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP035453.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP035452.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP035450.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP035448.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP035447.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP035445.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP035444.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:CP035442.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
GenBank:LR590483.1 ATGACCAAAAGACATACTGAAACCAAAGCTTATGTAAAGACCGCCTTAACCACCTTACTA 60
****** ****** ******

```
GenBank:MZ555969.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGATAGAAGATGG  60
GenBank:MW795690.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGATAGAAGATGG  60
GenBank:MW795682.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGATAGAAGATGG  60
GenBank:MZ555985.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGATAGAAGATGG  60
GenBank:MW713232.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGATAGAAGATGG  60
GenBank:MW713216.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MW619869.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MH706598.1      -------ATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  53
GenBank:MT343522.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT466614.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MZ555953.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MZ556037.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT342911.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT466926.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT243806.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT874067.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT874155.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT874138.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT375846.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT343934        TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT343549.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT306776.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MW626098.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MW626007.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT466630.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT049764.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
GenBank:MT874163.1      TCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACTTGCTTTCATTGACAGAAGATGG  60
                                ****************************************** *********

GenBank:MZ555969.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTGCACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MW795690.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MW795682.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MZ555985.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MW713232.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MW713216.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACATTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MW619869.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MH706598.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  113
GenBank:MT343522.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT466614.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MZ555953.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGCTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MZ556037.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT342911.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT466926.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT243806.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT874067.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT874155.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT874138.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT375846.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT343934        AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT343549.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT306776.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MW626098.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MW626007.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT466630.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT049764.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
GenBank:MT874163.1      AGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAGTTACACTGTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGA  120
                        ************************** ** ** ************************

GenBank:MZ555969.1      CCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGAAATTA  420
GenBank:MW795690.1      CCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGAAATTA  420
GenBank:MW795682.1      CCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGAAATTA  420
GenBank:MZ555985.1      CCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGAAATTA  420
GenBank:MW713232.1      CCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGAAATTA  420
GenBank:MW713216.1      CCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGAAATTA  420
GenBank:MW619869.1      CCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGAAATTA  420
GenBank:MH706598.1      CCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGAAATTA  413
GenBank:MT343522.1      CCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGAAATTA  420
GenBank:MT466614.1      CCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGAAATTA  420
GenBank:MZ555953.1      CCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGAAATTA  420
GenBank:MZ556037.1      CCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGAAATTA  420
GenBank:MT342911.1      CCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGAAATTA  420
```

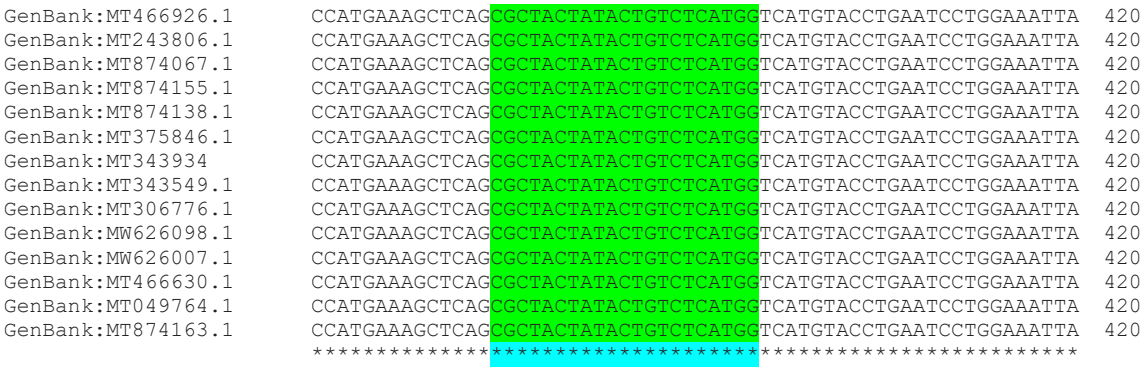
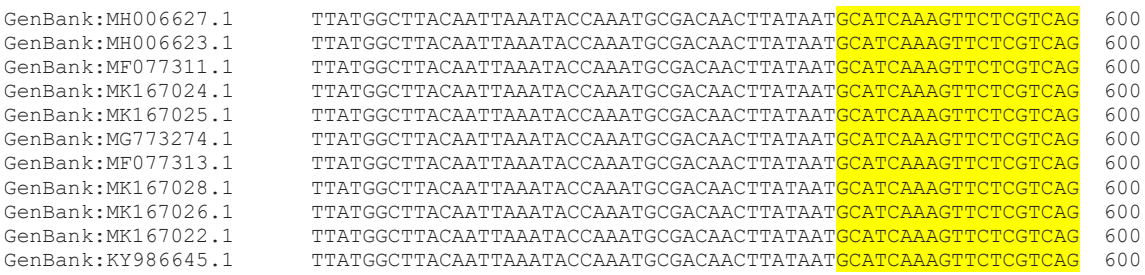


Figura 39. *Alineamiento de la secuencia del gen M del virus de la influenza B.*

Figura 40. *Alineamiento de la secuencia de la región 5'UTR del enterovirus D68.*

Figura 41. *Alineamiento de la secuencia del gen lytA de Streptococcus pneumoniae.*

Figura 42. *Alineamiento de la secuencia del gen N del virus sincitial respiratorio.*



GenBank:KY674972.1 TTATGGCTTACAATTAAATACCAAATGCGACAACTTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG 600
GenBank:KY986646.1 TTATGGCTTACAATTAAATATCAAATGCGACAACTTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG 600
GenBank:KY674948.1 TTATGGCTTACAATTAAATACCAAATGCGACAACTTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG 600
GenBank:MG836419.1 TTATGGCTTACAATTAAATACCAAATGCGACAACTTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG 600
GenBank:MG836416.1 TTATGGCTTACAATTAAATACCAAATGCGACAACTTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG 600
GenBank:MG836417.1 TTATGGCTTACAATTAAATACCAAATGCGACAACTTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG 600
GenBank:MN369034.1 TTATGGCTTACAATTAAATACCAAATGCGACAACTTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG 600
GenBank:MH892406.1 TTATGGCTTACAATTAAATACCAAATGCGACAACTTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG 600
GenBank:MF077312.1 TTATGGCTTACAATTAAATACCAAATGCGACAACTTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG 600
GenBank:MH006627.1 CCGACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTAATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MH006623.1 CCGACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTAATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MF077311.1 CCAACTGATTTAGTTCATATTGTTGACACAAGATCTGGTCTAATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MK167024.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTGATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MK167025.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTGATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MG773274.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTGATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MF077313.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTGATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MK167028.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTGATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MK167026.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTGATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MK167022.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTGATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:KY986645.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTGATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:KY674972.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTGATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:KY986646.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTGATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:KY674948.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTAATAGTTATTACCCCTGAA 660
GenBank:MG836419.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTAATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MG836416.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTAATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MG836417.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTAATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MN369034.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTAATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MH892406.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTAATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MF077312.1 CCAACTGATTTAGTTCACATTGTTGACACACGATCTGGTCTAATAGTTATCACCCCTGAA 660
GenBank:MH006627.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MH006623.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MF077311.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MK167024.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MK167025.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MG773274.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MF077313.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MK167028.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MK167026.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MK167022.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:KY986645.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:KY674972.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:KY986646.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:KY674948.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MG836419.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MG836416.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MG836417.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MN369034.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MH892406.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MF077312.1 ATGTTGTGTCTCATGAGACTTTGGGGTCATCCCACTCTTACTGCTGCGCAAGCTGCAGGT 1140
GenBank:MH006627.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:MH006623.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:MF077311.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTACTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:MK167024.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:MK167025.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:MG773274.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:MF077313.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAATTGCTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:MK167028.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:MK167026.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:MK167022.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:KY986645.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:KY674972.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:KY986646.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:KY674948.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTACTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:MG836419.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTACTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200
GenBank:MG836416.1 AAAGTGAGAGAATCTATGTGTGCAGGTAAGTTACTTGATTTCCCTACAATAATGAAAACT 1200

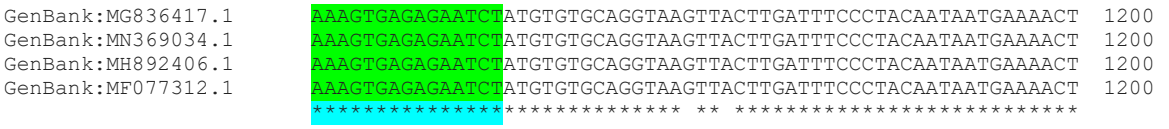


Figura 43. *Alineamiento de la secuencia del gen L del virus de la parainfluenza humana 2.*

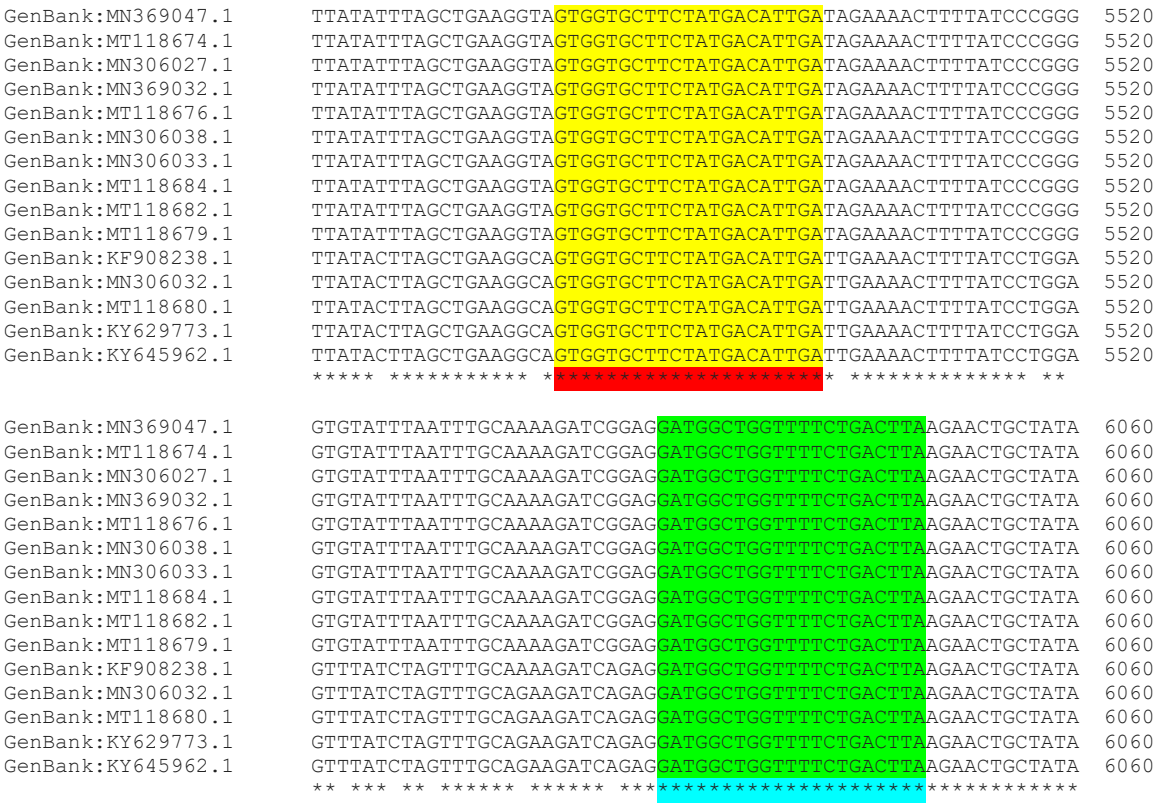


Figura 44. *Alineamiento de la secuencia del gen L del virus de la parainfluenza humana 4.*

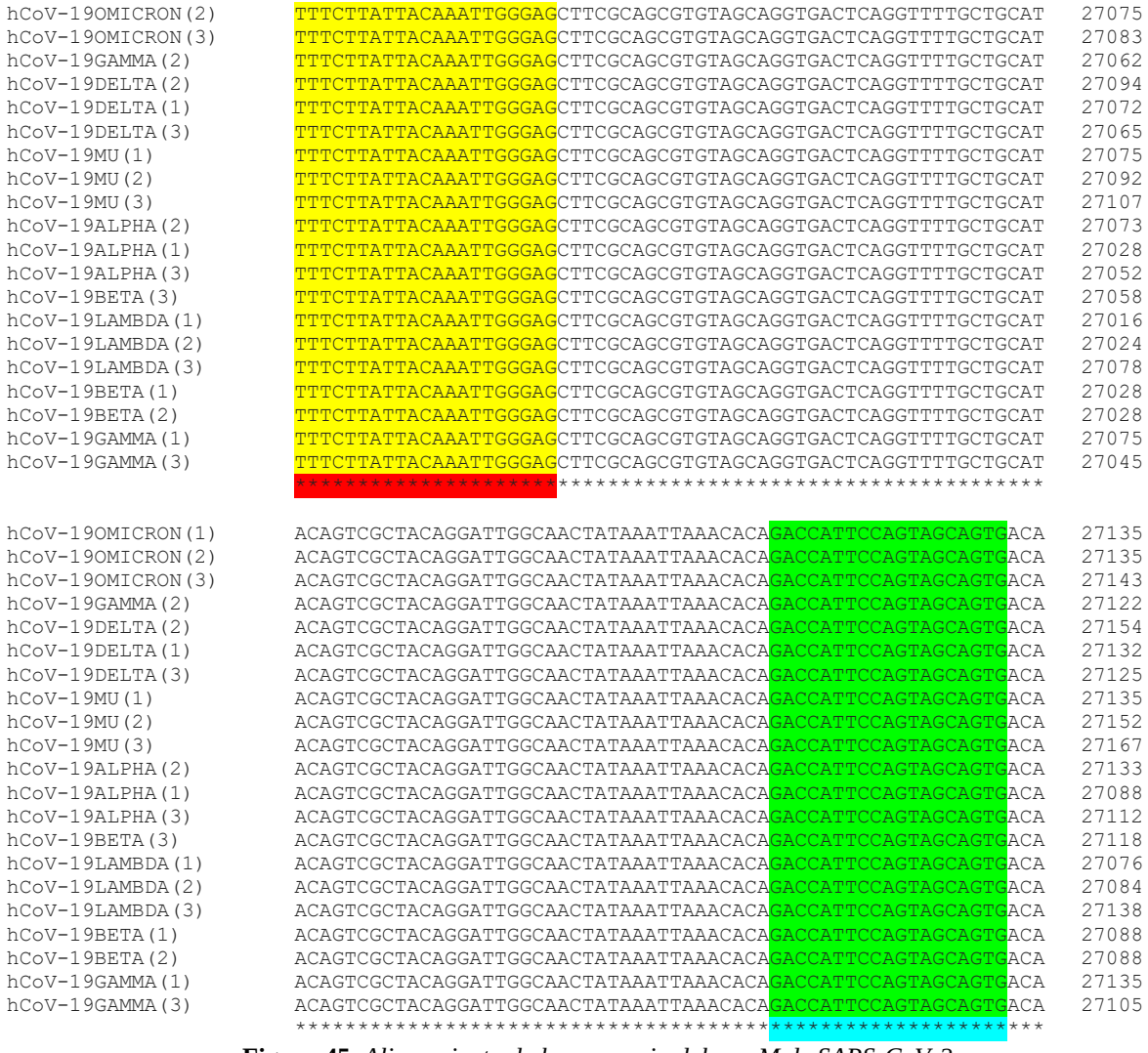
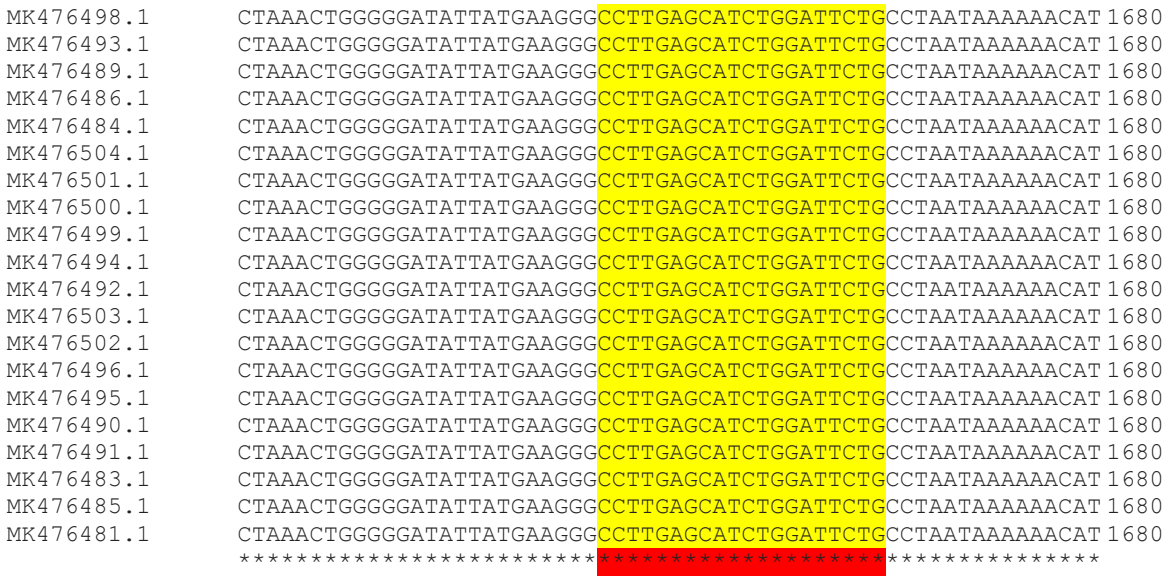


Figura 45. *Alineamiento de la secuencia del gen M de SARS-CoV-2.*



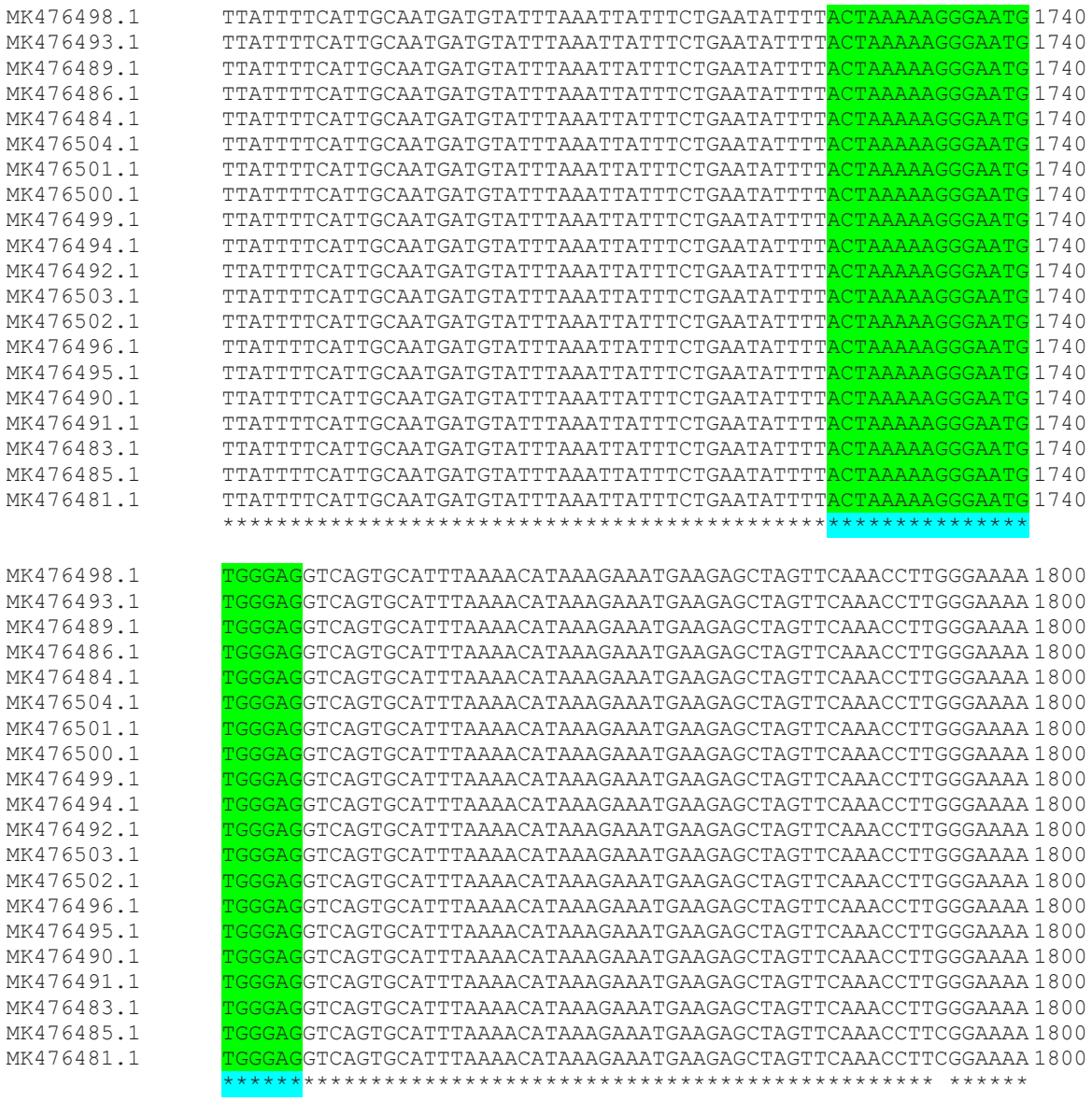


Figura 46. *Alineamiento de la secuencia del gen HBB de la subunidad beta de la hemoglobina humana.*