

# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Posgrado en Ciencias Químicas

Maestría en Ciencias Químicas

**Diseño y desarrollo de un panel de identificación molecular para  
patógenos de importancia respiratoria**

TESIS

Para obtener el título de

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

con especialidad en BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Presenta

**QFB. Julián Hernández Martínez**

Directora de tesis

**D.C. Nidia Gary Pazos Salazar**

Comisión Revisora

**Dr. Eduardo Miguel Brambila Colombres**

**Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta**

**Dr. Joaquín Manzo Merino**

**Dr. Gerardo Santos López**

Puebla, Pue., Noviembre 2025

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis representa la culminación de un largo y significativo camino, no solo en mi formación académica, sino también en mi crecimiento personal. Así que quiero comenzar este espacio agradeciéndome a mí mismo. Por todo el esfuerzo y la dedicación, especialmente en los momentos más difíciles. Por la perseverancia y la motivación constante para salir adelante y no rendirme.

Este logro no sería nada sin mi familia:

A mis padres, Mamá y Papá, ¡Los amo demasiado! Esto es por y para ustedes. Gracias por ser mi mayor motivo cada día, por su apoyo incondicional y por el esfuerzo inmenso con el que han logrado sacarnos adelante. Gracias por creer en mí, siempre.

A mis hermanos, Ángeles, Héctor y Roberto, gracias por todo su apoyo, por ser mis compañeros de vida. Ustedes son, sin duda, un motivo fundamental, para seguir aquí y esforzarme.

A mis amigos, que son la familia que elegí:

- Lili, mi mejor amiga. Te quiero mucho. Siempre le agradeceré a la vida por permitirme conocerte desde aquel primer día de universidad y, sobre todo, por mantenerte tan firme y siempre a mi lado.
- Frida, te has convertido en mi hermana. Gracias por siempre escucharme, por aconsejarme con tanta sabiduría y por estar presente en los buenos y en los malos momentos, sin fallar.
- Gali, valoro infinitamente tu sinceridad y tu gran amistad, gracias por ser también una hermana para mí y por estar siempre conmigo, por todas las risas, recuerdos y momentos de mucho apoyo.
- A Bryam, un gran amigo. Agradezco profundamente tu perspectiva, tus consejos siempre certeros y tu honestidad, que me han ayudado a crecer y a ver las cosas con mayor claridad.
- A Alberto, amigo. Aunque tu presencia física ya no nos acompañe, tu memoria y tu amistad perduran en mi corazón. Atesoro cada recuerdo compartido y el lazo que forjamos. Donde quiera que estés, te abrazo siempre.

- A Sergio, sin duda tu llegada a mi vida ha sido fundamental en esta etapa. Debo agradecerte infinitamente por tu apoyo incondicional, por tus palabras de aliento que llegaron siempre en el momento preciso y por ser un pilar durante los momentos más difíciles de este proceso.
- A l@s chic@s de Microbiología: Leonardo, Melissa, Erika y Alexa. Gracias por adoptarme en su círculo. Las risas, el apoyo incondicional y por considerarme siempre es sus planes hicieron toda la diferencia.

Al laboratorio de Infectología Molecular:

A la Dra. Nidia, muchísimas gracias por su confianza y por seguir creyendo en mí. Su guía, paciencia y apoyo incondicional fueron muy importantes para el desarrollo y culminación de este trabajo. Ha sido un honor aprender de usted.

A Williams, por aguantarme siempre como equipo de trabajo. Gran parte de este logro te lo debo a ti. Gracias por tu paciencia, tu gran talento y por ser un gran equipo de trabajo.

A Alam, Brandon, Briz, Esli, Sebastián y Tania, gracias por hacer del laboratorio un segundo hogar. Disfruté cada momento, cada risa y cada aventura compartida. Gracias por hacer el trabajo del laboratorio mucho más ameno y divertido.

A la Dra. Lobo, una mentora y guía fundamental en mi formación universitaria. Agradezco de corazón el tiempo que me dedicó, sus valiosos consejos, su disposición para escucharme y, sobre todo, el cariño y el apoyo que siempre me brindó.

A todos aquellos que, de una u otra forma, han dejado una huella en mi vida y contribuyeron con un pequeño pedacito de su ser, a la persona que soy hoy.

Muchísimas gracias.

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	9
2. INTRODUCCIÓN.....	11
2.1 Infecciones respiratorias agudas.....	11
2.2 Clasificación.....	11
2.3 Epidemiología.....	11
2.4 Etiología.....	12
3. ANTECEDENTES.....	20
3.1 Diagnóstico de las IRA.....	20
3.2 Métodos convencionales.....	20
3.3 Métodos Moleculares.....	25
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
5. JUSTIFICACIÓN.....	30
6. OBJETIVOS.....	30
6.1 Objetivo general.....	30
6.2 Objetivos específicos.....	30
7. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.....	31
8. METODOLOGÍA.....	31
8.1 <i>Diseño In silico</i> .....	31
8.1.1 Identificación de los principales patógenos causantes de infecciones respiratorias agudas en México.....	31
8.1.2 Selección de biomarcadores.....	32
8.1.3 Diseño de <i>primers</i> .....	32
8.2 <i>Desarrollo de la fase húmeda del panel de identificación molecular</i> .....	33
8.2.1 Validación del funcionamiento de los <i>primers</i> en amplificaciones individuales.....	33
8.2.2 Construcción de plásmidos de resguardo para cada uno de los biomarcadores.....	34
8.2.3 Evaluación de la especificidad analítica de los <i>primers</i> .....	35

8.2.4 Determinación de la sensibilidad analítica (Límite de detección).....	36
8.2.5 Estandarización del panel de identificación molecular.....	36
8.2.6 Construcción del control positivo.....	37
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
9.1. Identificación de los principales patógenos causantes de infecciones respiratorias agudas en México.....	38
9.2 Selección de biomarcadores.....	44
9.3 Diseño de <i>primers</i> .....	62
9.4 Análisis de estructuras secundarias.....	63
9.5 Análisis de especificidad <i>In silico</i> .....	64
9.6 Desarrollo de la fase húmeda.....	64
9.6.1 Validación del funcionamiento de los primers en amplificaciones individuales .....	64
9.6.2 Validación del funcionamiento de los primers en diferentes especies y subtipos de un mismo patógeno respiratorio.....	66
9.6.3 Construcción de controles positivos para cada blanco.....	67
9.6.4 Validación de la especificidad analítica del panel.....	69
9.6.5 Límite de detección (Sensibilidad analítica).....	72
9.6.6 Estandarización del panel de identificación molecular.....	73
9.6.7 Validación del panel en muestras clínicas.....	79
9.6.8 Generación del control positivo.....	84
10. CONCLUSIONES.....	88
11. PERSPECTIVAS.....	89
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Veinte principales causas de enfermedad nacional por fuente de notificación. Estados Unidos Mexicanos 2024.....	12
<b>Tabla 2.</b> Caracterización de los virus humanos más extendidos que causan infecciones respiratorias agudas .....	17
<b>Tabla 3.</b> Datos demográficos recabados de los estudios epidemiológicos realizados en México antes y después de la pandemia.....	40
<b>Tabla 4.</b> Rangos de prevalencia de los patógenos respiratorios detectados en los estudios analizados en México. ....	43
<b>Tabla 5.</b> Resumen de los criterios de selección para los biomarcadores de identificación del panel molecular.....	61
<b>Tabla 6.</b> Características fisicoquímicas de los primers diseñados para el panel de identificación molecular .....	62
<b>Tabla 7.</b> Protocolo de amplificación estandarizado para el panel de identificación molecular .....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de las IRA del tracto superior e inferior y los principales agentes etiológicos asociados a ellas.....	20
<b>Figura 2.</b> Distribución geográfica de los estudios epidemiológicos realizados en México durante el periodo 2013-2024.....	40
<b>Figura 3.</b> Prevalencia de los patógenos respiratorios detectados en diversos estudios realizados en México antes y después de la pandemia.....	42
<b>Figura 4.</b> Rangos de prevalencia de los patógenos respiratorios detectados en diversos estudios de México Pre y Post Pandemia.....	43
<b>Figura 5.</b> AMS del gen <i>l2</i> de las especies B, C y E de AdV.....	45
<b>Figura 6.</b> Variantes de SARS-CoV-2 circulantes en México.....	47
<b>Figura 7.</b> AMS del gen <i>M</i> de las variantes de SARS-CoV-2 circulantes en México.....	47
<b>Figura 8.</b> AMS del gen <i>M</i> de los distintos subtipos de influenza A circulantes en población humana y subtipos IAAP.....	48
<b>Figura 9.</b> AMS del gen <i>M</i> del virus de la influenza B.....	49
<b>Figura 10.</b> AMS del gen <i>F</i> de los linajes genéticos A y B del metapneumovirus.....	50
<b>Figura 11.</b> AMS del gen <i>N</i> de los genotipos A y B del VSR.....	51
<b>Figura 12.</b> AMS del del gen <i>L</i> del virus de la parainfluenza humana 1 y 3.....	52
<b>Figura 13.</b> AMS del gen <i>L</i> del virus de la parainfluenza humana 2.....	53
<b>Figura 14.</b> AMS del gen <i>L</i> del virus de la parainfluenza humana 4.....	53
<b>Figura 15.</b> AMS de la <i>región 5'UTR</i> de las especies B, C y E de rinovirus.....	54
<b>Figura 16.</b> AMS de la <i>región 5'UTR</i> de enterovirus-D68.....	54
<b>Figura 17.</b> AMS del gen <i>mpn372</i> de <i>M. pneumoniae</i> .....	56
<b>Figura 18.</b> AMS del gen <i>hpd</i> de <i>H. influenzae</i> .....	58
<b>Figura 19.</b> AMS del gen <i>spy1258</i> de <i>S. pyogenes</i> .....	59
<b>Figura 20.</b> AMS del gen <i>lytA</i> de <i>S. pneumoniae</i> .....	60
<b>Figura 21.</b> Análisis de estructuras secundarias de los <i>primers</i> Sentido (F) y Antisentido (R) de <i>S. pyogenes</i> .....	63
<b>Figura 22.</b> Validación del funcionamiento de los <i>primers</i> .....	65
<b>Figura 23.</b> Detección de especies de AdV y subtipos de VIA.....	66

<b>Figura 24.</b> Caracterización por PCR de clonas candidato con constructo de cada amplicón .....	68
<b>Figura 25.</b> Vector de clonación pJET1.2 .....	68
<b>Figura 26.</b> Validación de la especificidad analítica del panel de identificación molecular (Reactividad cruzada interna).....	70
<b>Figura 27.</b> Validación de la especificidad analítica del panel de identificación molecular (Reactividad cruzada externa) .....	71
<b>Figura 28.</b> Determinación por PCR del límite de detección para cada amplificado puro ...	72
<b>Figura 29.</b> Acoplamiento de un sistema 4-plex de PCR múltiple utilizando el kit Mezcla maestra para PCR DreamTaq (2X).....	75
<b>Figura 30.</b> Acoplamiento de un sistema 8-plex de PCR múltiple utilizando el kit Mezcla maestra para PCR DreamTaq (2X).....	77
<b>Figura 31.</b> Acoplamiento y estandarización del panel de identificación molecular .....	79
<b>Figura 32.</b> Aplicación del panel de identificación molecular en muestra de exudado nasofaríngeo y faríngeo del paciente clínicamente sano 1 .....	80
<b>Figura 33.</b> Aplicación del panel de identificación molecular en muestra de exudado nasofaríngeo del paciente clínicamente sano 2.....	82
<b>Figura 34.</b> Aplicación del panel de identificación molecular en muestra de exudado nasofaríngeo de paciente con sintomatología respiratoria.....	83
<b>Figura 35.</b> Generación del fragmento de ligación SARS-CoV-2 - betaglobina .....	85
<b>Figura 36.</b> Generación del fragmento de ligación <i>S. pneumoniae</i> - influenza A.....	85
<b>Figura 37.</b> Ligación por pares de los fragmentos <i>H. influenzae</i> - influenza B y <i>S. pyogenes</i> - VRS .....	86

## 1. RESUMEN

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) representan un problema de salud pública muy importante en México y en el mundo, constituyéndose como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todos los grupos de edad, especialmente en los grupos que conforman los extremos de vida. La etiología de las IRA es compleja e incluye una amplia y diversa variedad de virus y bacterias. Uno de los grandes retos en el diagnóstico clínico actual es identificar de manera específica, rápida y oportuna el agente causal para guiar el manejo terapéutico, optimizar el uso de antimicrobianos y realizar una vigilancia epidemiológica. Ante esta necesidad, en el presente trabajo se planteó el diseño y desarrollo de un panel de identificación molecular capaz de identificar simultáneamente los principales agentes etiológicos responsables de las IRA en nuestro país.

El diseño inició con un análisis de la literatura para determinar los patógenos de mayor prevalencia e impacto en México. Posteriormente, para cada patógeno, se llevó a cabo la selección de biomarcadores moleculares basados en secuencias de ADN de acuerdo con su rendimiento diagnóstico reportado (sensibilidad y especificidad) y el grado de conservación. Para este último, se utilizaron secuencias genéticas de las bases de datos del NCBI y GISAD, las cuales se sometieron a alineamientos múltiples con el software Clustal Omega para identificar las regiones más conservadas. A continuación, se diseñaron *primers* universales sobre estas regiones ajustándolos a los requerimientos de una amplificación simultánea: se aseguró una diferencia mínima de 20 pb entre los tamaños de los amplicones para su correcta resolución en electroforesis en gel de agarosa y una temperatura de fusión ( $T_m$ ) con una variación no mayor a 2°C entre todo el conjunto de *primers*. Finalmente, la especificidad *In silico* de cada *primer* fue verificada en la plataforma BLAST, asegurando un alineamiento exclusivo con sus secuencias de interés.

La fase del desarrollo experimental demostró la utilidad del panel. Se logró la validación funcional de 9 pares de *primers* para la detección de adenovirus, SARS-CoV-2, virus de la influenza A, virus de la influenza B, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y el virus sincitial respiratorio, además del control interno de beta globina. Se confirmó tanto de manera *In silico* como de manera experimental la capacidad del panel para detectar de manera incluyente diferentes especies, genotipos, variantes y subtipos de patógenos. La determinación del límite de detección (LOD) arrojó

valores en el rango de 6 a 35 copias, lo cual es inferior a las cargas virales y bacterianas reportadas en infecciones activas. La evaluación de la especificidad analítica no reveló reactividad cruzada interna (entre los mismos patógenos del panel) o externa (con patógenos no incluidos en el panel, microbiota del tracto respiratorio o material genético de la propia muestra). Se logró el acoplamiento de todos los *primers* en una única reacción de RT-PCR múltiple, y los resultados en muestra clínicas preliminares fueron prometedores, logrando identificar coinfecciones y casos asintomáticos. Aunque se encontraron desafíos técnicos en la construcción de un único control positivo que contuviera todas las secuencias diana, se implementó una solución alternativa funcional que consiste en una mezcla de los plásmidos de resguardo individuales, previamente caracterizados por PCR y por secuenciación, que puede cumplir adecuadamente la función de control positivo.

En conclusión, este trabajo finalizó con el desarrollo de un panel de PCR múltiple estandarizado que puede ser validado en un futuro como una herramienta de diagnóstico sensible y específica para mejorar la vigilancia y el diagnóstico de las IRA en México.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Infecciones respiratorias agudas**

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) se definen como enfermedades de etiología infecciosa que involucran el sistema respiratorio. El espectro clínico varía desde una infección asintomática o leve hasta una enfermedad grave o mortal, y la gravedad es el resultado de la interacción entre tres factores: el agente causal, las condiciones ambientales y el huésped (Calderaro et al., 2022). Estas infecciones generalmente ocurren como una enfermedad aguda con un inicio clínico rápido que va desde horas a días después de la infección e incluye una variedad de síntomas como fiebre, tos, dolor de garganta, congestión nasal, coriza, falta de aire, sibilancias y/o dificultad para respirar (WHO, 2020).

### **2.2 Clasificación**

El sistema respiratorio se divide en dos ambientes anatómicos contiguos: el tracto respiratorio superior, que comprende las amígdalas, la nasofaringe, la cavidad oral, el oído medio, la orofaringe y la laringe, y el tracto inferior, que incluye la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y los alvéolos. Por lo tanto, las IRA se clasifican en infecciones de las vías respiratorias superiores (IVRS) e infecciones de las vías respiratorias inferiores (IVRI), según la región anatómica afectada (Calderaro et al., 2022; Simoes et al., 2006)

### **2.3 Epidemiología**

Las IRA son las infecciones adquiridas más comunes en la población general con una incidencia de hasta 6 episodios por persona al año, representando una importante carga socioeconómica (Petat et al., 2025). Su impacto es tan significativo que, de acuerdo con los datos del último estudio del Global Burden of Disease (GBD), publicado en *The Lancet* en 2021, la COVID-19 se posicionó como la segunda causa de muerte a nivel mundial, mientras que las IVRI fueron la séptima. Además, estas mismas enfermedades ocuparon el primer y quinto lugar, respectivamente, como causas de morbilidad global (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2024). En México, de acuerdo con datos de la Secretaría de Salud, en el año 2024, cuatro enfermedades del tracto respiratorio se posicionaron dentro de las 20 principales causas de enfermedad nacional. Las IRA ocuparon la primera posición con 16,973,497 casos. Otras patologías asociadas también mostraron una alta incidencia. La otitis media aguda se ubicó en la novena posición, mientras que las faringitis y amigdalitis estreptocócicas se

registraron en el decimotercer lugar y finalmente, las neumonías y bronconeumonías, que representan las formas más severas de infección del tracto respiratorio inferior, se encontraron en la decimonovena posición, La distribución detallada de los casos se muestra en la Tabla 1 (Secretaría de Salud, 2024). Por otro lado, en lo que respecta a las causas de mortalidad, en el año 2024, la influenza y neumonía se ubicaron en la sexta posición de defunción nacional, mostrando un ascenso a la cuarta posición durante el primer trimestre del 2025 (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2025).

**Tabla 1.** Veinte principales causas de enfermedad nacional por fuente de notificación. Estados Unidos Mexicanos 2024

Número	Padecimiento	Código de la lista detallada CIE10a. Revisión	Fuente de notificación									TOTAL
			SSA	IMSS Ord	ISSSTE	IMSS Bienest.	SNDIF	PEMEX	SEDENA	SEMAR	OTRAS	
1	Infecciones respiratorias agudas	J00-J06, J20, J21 excepto J02.0 y J03.0	5 339 270	5 395 465	934 979	816 760	224 157	173 452	69 967	32 245	3 987 202	16 973 497
2	Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas	A04, A08-A09 excepto A08.0	1 111 403	1 341 706	270 710	139 096	58 136	14 458	26 549	10 124	1 231 078	4 203 260
3	Infecciones de vías urinarias	N30, N34, N39.0	1 172 885	1 369 395	210 354	196 492	25 584	33 334	19 371	10 392	540 037	3 577 844
4	Gingivitis y enfermedad periodontal	K05	394 006	556 106	64 456	47 998	9 381	11 783	910	4 819	99 543	1 189 002
5	Úlceras, gastritis y duodenitis	K25-K29	363 347	197 39	78 327	52 096	12 865	3 982	4 277	2 293	230 160	944 738
6	Conjuntivitis	H10	199 949	344 119	47 879	31 757	6 830	14 059	5 751	3 976	210 286	864 606
7	Vulvovaginitis	N76	281 499	191 165	21 487	65 612	1 743	731	3 850	1 117	78 993	646 197
8	Obesidad	E66	167 628	292 573	65 747	17 987	6 166	3 620	5 521	5 856	78 189	643 287
9	Otitis media aguda	H65.0-H65.1	217 132	46 946	42 568	36 730	9 512	1 640	3 260	2 428	282 155	642 371
10	Hipertensión arterial	I10-I15	191 226	163 699	89 546	12 106	4 418	3 303	7 496	2 913	117 221	591 928
11	Diabetes mellitus tipo 2	E11-E14	183 252	134 053	87 663	12 233	3 074	2 870	6 349	2 824	76 097	508 415
12	Dengue no grave	A97.0, A97.9	116 524	135 138	6 423	7 625	11	485	395	323	4 664	271 588
13	Faringitis y amigdalitis estreptocócicas	J02.0, J03.0	124 734	12 880	20 773	4 477	5 042	59	1 842	1 548	92 157	263 512
14	Accidentes de transporte en vehículos con motor	V20-V29, V40-V79	99 405	7 727	3 141	5 716	189	624	313	547	107 449	225 111
15	Insuficiencia venosa periférica	I87.2	38 272	106 469	21 757	3 049	909	676	5 152	648	36 126	213 058
16	Intoxicación por picadura de alacrán	T63.2, X22	131 018	17 448	375	7 604	0	10	10	31	319	156 815
17	Depresión	F32	77 035	20 045	23 510	2 994	1 218	261	1 871	784	25 110	152 828
18	Asma	J45, J46	54 084	33 642	20 775	1 521	1 373	1 695	2 137	1 169	29 515	145 911
19	Neumonías y bronconeumonías	J12-J18 excepto J18.2, J13 y J14	55 142	38 754	8 325	2 565	518	1 115	2 337	698	32 159	141 613
20	Mordeduras por perro	W54	78 331	27 565	4 615	5 667	1 065	1 093	510	320	12 118	131 284
	Total 20 principales causas		10 396 142	10 432 286	2 023 410	1 470 085	372 191	269 250	167 868	85 055	7 270 578	32 486 865
	Otras causas		799 685	477 602	126 733	91 598	9 603	9 770	14 484	5 263	219 822	1 754 560
	<b>Total, Global</b>		<b>11 195 827</b>	<b>10 909 888</b>	<b>2 150 143</b>	<b>1 561 683</b>	<b>381 794</b>	<b>279 020</b>	<b>182 352</b>	<b>90 318</b>	<b>7 490 400</b>	<b>34 241 425</b>

Nota. Adaptado de *20 principales causas de enfermedad nacional por fuente de notificación*, por Secretaría de Salud, 2024, <https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2024/principales/nacional/institucion.pdf>

## 2.4 Etiología

Las IRA son causadas por una amplia variedad de virus y bacterias (Figura 1), siendo los primeros responsables del 80 al 90 por ciento de estas infecciones (Chirinos-Saire et al., 2021; Núñez-Samudio & Landires, 2021). Los virus mayormente asociados son el virus sincitial respiratorio (VSR), el virus de la influenza A (VIA), el virus de la influenza B (VIB), el virus de la parainfluenza humana 1, 2, 3 y 4 (VPIH1-4), el adenovirus (AdV), el metapneumovirus humano (MPVH), los coronavirus (CoV), el bocavirus (BoV), el rinovirus (RV), el enterovirus (EV) y el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), por otro lado, los patógenos bacterianos más comunes en las IRA son *S. pneumoniae*,

*S. pyogenes*, *H. influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophilla* y *Bordetella pertussis* (Inma et al., 2024; Siddik et al., 2023)

✓ Virus de la influenza

Los virus de la influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y se dividen en cuatro tipos: virus de la influenza A, B, C y D. Los VIA y VIB son agentes causales de epidemias estacionales en humanos, el VIA puede provocar pandemias cuando una cepa zoonótica infecta humanos, y el virus de la influenza C causa una enfermedad leve y poco frecuente en humanos, mientras que el virus de la influenza D infecta principalmente ganado. Los virus de la influenza contienen un genoma de ARN monocatenario de sentido negativo segmentado, con cada segmento de ARN empaquetado en un complejo de ribonucleoproteína viral (vRNP) (Zhu et al., 2023). Aproximadamente el 20% de los niños y el 5% de los adultos en todo el mundo desarrollan influenza sintomática, con unas 250 000 muertes al año (Böhm et al., 2014). La OMS estima que las epidemias anuales de influenza resultan en aproximadamente mil millones de infecciones, entre 3 y 5 millones de casos de enfermedad grave y entre 290,000 y 650,000 muertes. Los síntomas comunes son inicio súbito de fiebre, tos, dolor de garganta, dolor corporal y fatiga, en la mayoría de los casos los síntomas desaparecen en una semana, no obstante, en personas con alto riesgo, la influenza puede ser una enfermedad grave e incluso mortal (WHO, 2025).

✓ Enterovirus

El género *Enterovirus* es uno de los 35 géneros de la familia *Picornaviridae* e incluye 13 especies, siete de las cuales son patógenos humanos: enterovirus A-D (más de 100 tipos) y rinovirus A-C (más de 160 tipos). Los EV son un grupo abundante de patógenos con una alta tasa de mutación y frecuencia de recombinación, lo que conduce a la aparición de nuevas cepas virales. Los EV se transmiten por vía fecal-oral o respiratoria. Pueden propagarse desde el foco primario de infección (tracto gastrointestinal o respiratorio) para infectar otros órganos, incluido el sistema nervioso central. La mayoría de las personas con EV respiratorio no se enferman o presentan síntomas leves similares a los del resfriado común. Los síntomas pueden incluir fiebre, goteo nasal, estornudos, tos, sarpullido, ampollas en la boca o dolores musculares. El EV-D68 es el tipo más común de EV respiratorio (Howley et al., 2023; Ilyicheva et al., 2022).

✓ Rinovirus

Los RV, de manera similar a todos los miembros de la familia *Picornaviridae*, son virus con una sola cadena de ARN de sentido positivo que tiene aproximadamente 7200 pb en su genoma. El genoma viral consiste en un solo gen traducido en un solo polipéptido que es escindido por proteasas virales para producir 11 proteínas individuales. Con base en la similitud del genoma, más de 160 cepas de RV se clasificaron en tres clados genéticos, que ahora se reconocen como tres especies (A, B y C): RV-A (80 serotipos), RV-B (32 serotipos) y RV-C (55 serotipos). La infección por RV se transmite principalmente por contacto directo u objetos infectados (fómites). Los RV son principalmente los agentes etiológicos de las infecciones del tracto respiratorio superior porque crecen mejor a 34°C que a 37°C. Los RV son los agentes causantes de entre la mitad y dos tercios de los resfriados comunes. Aunque la mayoría de las infecciones por rinovirus son leves, el RV es un patógeno asociado a bronquiolitis en bebés, neumonía con inmunosupresión y exacerbaciones inducidas por virus de enfermedades respiratorias, como asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Howley et al., 2023; Ilyicheva et al., 2022).

✓ Virus de la parainfluenza

Los VPIH pertenecen a la familia *Paramyxoviridae*. Los VPIH se clasifican antigénica y genéticamente en cuatro tipos (VPIH-1,-2,-3 y -4) y dos subtipos (VPIH-4a y VPIH-4b). Los subtipos 1 y 3 de VPIH se clasifican como pertenecientes al género *Respirovirus*, mientras que los tipos 2 y 4 de VPIH pertenecen al género *Rubulavirus*. Los VPIH pueden infectar a personas de cualquier edad y suelen causar enfermedades respiratorias leves en adultos, pero con frecuencia resultan, en hospitalizaciones pediátricas por infecciones de las vías respiratorias bajas en niños de hasta 5 años. El VPIH-1 es la causa más común (en más del 50% de los casos) de *crup* grave (laringotraqueobronquitis). El VPIH-3 es la segunda causa, después del virus respiratorio sincitial, de neumonía y bronquiolitis en niños pequeños (Howley et al., 2023; Ilyicheva et al., 2022).

✓ Virus sincitial respiratorio

A partir de 2016, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, *por sus siglas en inglés*) dio nuevos nombres en latín a los virus, por ejemplo, el VSR

(*Orthopneumovirus humano*) se clasificó en el género *Orthopneumovirus* dentro de la familia *Pneumoviridae*. El VSR es una de las principales causas globales de infección del tracto respiratorio inferior en bebés. El virus se aisló por primera vez en 1956. El nombre del virus se deriva de su capacidad para producir sincitios, es decir, las células grandes que se forman cuando las células infectadas se fusionan. El genoma del VSR es un genoma de ARN lineal, no segmentado y monocatenario de polaridad negativa de 15.2 kb de tamaño. En comparación con los virus de la influenza, los VSR son antigénicamente relativamente estables, y solo la proteína G es importante antigénicamente y exhibe una deriva antigénica similar a la hemaglutinina y neuraminidasa de los virus de la influenza. Esta variabilidad antigénica condujo a la aparición de dos grupos antigénicos principales de VSR circulante: A y B. El grupo A consta de 11 genotipos, mientras que para el VSR-B se describieron 23 genotipos. Se cree que esta diversidad genética y serológica es la principal causa de un gran número de infecciones repetidas a lo largo de la vida. Las diferencias antigénicas y serológicas que ocurren entre estos virus pueden contribuir a la capacidad de los VSR de establecer reinfecciones a lo largo de la vida y la falta de inmunidad a largo plazo (Howley et al., 2023; Ilyicheva et al., 2022).

✓ Metapneumovirus humano

El MPVH se informó por primera vez en muestras tomadas de niños con enfermedades agudas del tracto respiratorio inferior. Los síntomas comúnmente asociados con MPVH incluyen tos, fiebre, congestión nasal, y dificultad para respirar. Los síntomas clínicos de la infección por MPVH pueden progresar a bronquitis o neumonía y son similares a otras infecciones del tracto respiratorio superior e inferior. Los MPVH pueden causar enfermedades de las vías respiratorias superiores e inferiores en personas de todas las edades, especialmente entre niños pequeños, adultos mayores y personas con sistemas inmunitarios debilitados. La organización genómica del MPVH y el VSR es similar, pero el MPVH posee varios genes diferentes a los del VSR, además de carecer de las proteínas no estructurales NS1 y NS2 (Howley et al., 2023; Ilyicheva et al., 2022).

✓ Adenovirus humanos

Los AdV son un amplio grupo de virus con un genoma de ADN bicatenario. Estos virus pertenecen a la familia *Adenoviridae*, del género *Mastadenovirus*. Hasta la fecha, se

han clasificado más de 100 serotipos de AdV, divididos en siete tipos, A-G. El genoma de los AdV tiene una longitud de aproximadamente 36 Kb. El genoma codifica entre 10 y 12 proteínas. Los AdV causan una amplia gama de enfermedades según la especie, pero las infecciones respiratorias se encuentran entre las más comunes, especialmente en niños menores de 5 años. Las infecciones adenovirales suelen causar solo síntomas leves de resfriado común y mejoran por sí solas sin tratamiento médico. Sin embargo, en grupos de alto riesgo, los AdV también pueden causar enfermedades graves, como neumonía, bronquitis y *crup* (Howley et al., 2023; Ilyicheva et al., 2022).

✓ Bocavirus humanos

Los BoV pertenecen a la familia *Parvoviridae*, que está representada por virus con ADN monocatenario y se clasifican dentro del género *Bocaparvovirus*. Los parvovirus son un grupo de virus muy pequeños, ya que empaquetan un genoma de aproximadamente 5-5.5 kb, además de tener un tamaño de partícula viral pequeño. Se ha demostrado que el BoV se detecta en aproximadamente el 6% de los casos de infecciones respiratorias y más del 50% de los casos son una infección combinada. La infección respiratoria por BoV es clínicamente indistinguible de otras infecciones respiratorias y solo puede diagnosticarse mediante ensayos moleculares. Los síntomas asociados con el BoV varían desde una enfermedad respiratoria leve hasta afecciones graves. Los síntomas más comunes reportados en estudios clínicos son tos, fiebre, rinorrea, exacerbación del asma, bronquiolitis, sibilancias agudas y neumonía (Howley et al., 2023; Ilyicheva et al., 2022).

✓ Coronavirus

Los coronavirus (CoV) son miembros de la subfamilia *Orthocoronavirinae* (Familia *Coronaviridae*, orden *Nidovirales*). Son virus envueltos con un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo. Según el ICTV, la subfamilia consta de cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. Los coronavirus alfa y beta infectan solo mamíferos. Los coronavirus gamma y delta se asocian en gran medida con huéspedes aviares, pero algunos de ellos también se pueden detectar en especies de mamíferos. Los primeros coronavirus humanos (HCoV-229E y HCoV-OC43) se aislaron hace casi 50 años, mientras que HCoV-NL63 y HCoV-HKU se aislaron solo después del brote de SARS-CoV en 2002-2003. Por lo general, los coronavirus estacionales causan

resfriados comunes leves. Son más peligrosos para los pacientes de grupos de alto riesgo (Howley et al., 2023; Ilyicheva et al., 2022).

La Tabla 2 resume las principales características de los virus más comunes causantes de las IRA.

**Tabla 2.** Caracterización de los virus humanos más extendidos que causan infecciones respiratorias agudas

Agente causante	Familia y género	Tipo/Subtipo/Serotipo	Ácido nucleico	Tamaño del virión/Tamaño del genoma	Envoltura lipídica	Enfermedad	Medicamentos/vacunas
VIA - VIB	Familia <i>Orthomyxoviridae</i> Género <i>Alphainfluenzavirus</i> , <i>Betainfluenzavirus</i> , <i>Gammainfluenzavirus</i>	Tipos (especies) A, B, C. Tipo A: 18 subtipos de HA, 11 subtipos de NA. Tipo B: B/Victoria, B/Yamagata	ARN monocatenario segmentado (-)	90–120 nm/ 13.6 kb*	Sí	Resfriado común, laringitis, faringitis, bronquitis, bronquiolitis, neumonía	Inhibidores de la riboflavina/vacunas antigripales vivas, inactivadas y de subunidades
CoV	Familia <i>Coronaviridae</i> Género <i>Alphacoronavirus</i> , <i>Betacoronavirus</i>	$\alpha$ -coronavirus 229E, NL63; $\beta$ -coronavirus OC43, HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2	ARN monocatenario (+) no segmentado	120–125 nm/ 27–33.5 kb	Sí	Resfriado común, faringitis, laringitis, bronquitis, bronquiolitis, neumonía, SARS, MERS, COVID-19	Ninguna/Hasta la fecha de elaboración de este artículo no hay una vacuna desarrollada
RV	Familia <i>Picornaviridae</i> Género <i>Enterovirus</i>	Tipos (especies): A, B, C. Cerca de 160 serotipos	ARN monocatenario (+) no segmentado	25 nm/7.2 kb	No	Resfriado común, faringitis, bronquiolitis, bronquitis, neumonía	Ninguna/Ninguna
EV	Familia <i>Picornaviridae</i> Género <i>Enterovirus</i>	Tipos A, B, D. Más de 100 serotipos	ARN monocatenario (+) no segmentado	30 nm/7.2–8.5 kb	No	Resfriado común, conjuntivitis, faringitis aguda, meningitis serosa (aséptica), encefalitis	Ninguna/vacuna basada en EV-A71 inactivado (China)
VPIH	Familia <i>Paramyxoviridae</i> Género <i>Respirovirus</i>	Tipos 1, 2, 3, 4	ARN monocatenario (-) no segmentado	150–200 nm/15 kb	Sí	Resfriado común, laringitis, otitis media, faringitis, bronquiolitis, bronquitis, laringotraqueobronquitis (crup), neumonía	Ninguna/Ninguna
VSR	Familia <i>Pneumoviridae</i> Género <i>Orthopneumovirus</i>	Serotipos: A y B. 11 genotipos del serotipo A, 23 genotipos del serotipo B	ARN monocatenario (-) no segmentado	210 nm/13.3 kb	Sí	Resfriado común, otitis media, bronquiolitis, bronquitis, neumonía	Ninguna/Ninguna (solo ribavirina en situaciones críticas)
MPVH	Familia <i>Pneumoviridae</i> Género <i>Metapneumovirus</i>	Genotipos A y B. 4 subtipos	ARN monocatenario (-) no segmentado	150–250 nm/ 36 kb	Sí	Resfriado común, laringitis, bronquiolitis, bronquitis, neumonía	Ninguna/Ninguna
AdV	Familia <i>Adenoviridae</i> Género <i>Mastadenovirus</i>	Especies A, B, C, D, E, F, G. Más de 50 serotipos	ADN bicatenario no segmentado	80–110 nm/ 36 kb	No	Pharyngitis, laryngitis, bronchitis, bronchiolitis, pneumonia	Ninguno/ninguno para uso extensivo
BoV	Familia <i>Parvoviridae</i> Género <i>Bocaparvovirus</i>	Subtipos (serotipos) 1, 2, 3, 4	ADN monocatenario no segmentado	18–26 nm/ 5.5 kb	No	Resfriado común, exacerbación del asma, bronquiolitis, neumonía	Ninguna/Ninguna

Nota. Adaptado de *COVID-19, Influenza, and Other Acute Respiratory Viral Infections: Etiology, Immunopathogenesis, Diagnosis, and Treatment. Part 2. Other Acute Respiratory Viral Infections* por Ilyicheva et al., 2022. <https://link.springer.com/article/10.3103/S0891416822030053>

✓ *S. pyogenes*

*S. pyogenes* es un importante patógeno humano global que causa una amplia variedad de infecciones agudas, como infecciones de tejidos blandos; infecciones graves potencialmente mortales, como el síndrome de shock tóxico estreptocócico; secuelas postinfecciosas devastadoras, como fiebre reumática y glomerulonefritis; y la infección más común, la faringitis estreptocócica. *S. pyogenes* es un estreptococo anaerobio facultativo, Gram positivo, betahemolítico y catalasa negativo. Se han identificado más de 150 cepas

diferentes según los distintos tipos de proteína *M*. Se trata de un estreptococo del grupo A según su estructura de carbohidratos, según la tipificación de Lancefield de cepas betahemolíticas (Bryant & Stevens, 2014).

✓ *S. pneumoniae*

Es un coco grampositivo encapsulado, sus células tienen un diámetro que oscila entre los 0,5 y 1,2  $\mu\text{m}$ , tienen una forma ovalada y se pueden agrupar en parejas o en cadenas cortas. Las colonias de estas cepas encapsuladas son de gran tamaño, de 1 a 3 mm de diámetro en agar sangre, y en otros medios como el agar chocolate o agar sangre son de menor tamaño, y además aparecen con forma redonda y de consistencia mucoide. *S. pneumoniae* carece de actividad de la enzima catalasa. El microorganismo se desarrolla en medios enriquecidos complementados con productos sanguíneos y puede fermentar varios hidratos de carbono liberando como derivado metabólico al ácido láctico. La mayor parte de las infecciones están producidas por la diseminación endógena desde la nasofaringe o la orofaringe colonizadas a regiones alejadas (p. ej., pulmones, senos, oídos, sangre y meninges) causando neumonía neumocócica (Murray et al., 2017).

✓ *Legionella pneumophila*

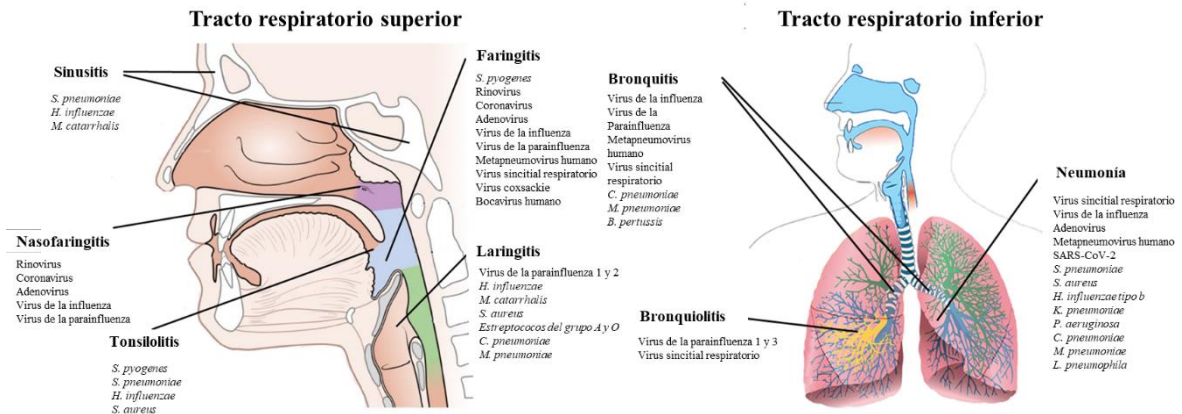
Son bacilos gramnegativos delgados que presentan múltiples formas. Se tiñen débilmente con los reactivos habituales y se consideran microorganismos nutricionalmente exigentes al requerir de L-cisteína y de sales de hierro que favorecen su crecimiento. Tienen un metabolismo no fermentativo y son capaces de replicarse en los macrófagos alveolares. Produce infecciones esporádicas, epidémicas y nosocomiales. Se encuentra con frecuencia en las reservas naturales de agua y conducciones de agua (incluidas las hospitalarias). Aquellos pacientes con afectación de la función pulmonar son los que tienen mayor probabilidad de generar una infección sintomática. Las infecciones sintomáticas se presentan en dos principales formas. La primera es una enfermedad semejante a la gripe conocida como fiebre de Pontiac y la segunda una forma grave de neumonía (legionelosis) (Murray et al., 2017).

✓ *M. pneumoniae*

Son las bacterias pequeñas, de vida libre y su característica principal es que no poseen pared celular, pero presentan una cantidad abundante de esteroides en su membrana celular (principalmente ácidos micólicos). Estas bacterias forman filamentos pleomorfos de un tamaño entre 0,1 y 0,3 µm. Se consideran anaerobios facultativos (excepto *M. pneumoniae*, un aerobio estricto) y necesitan esteroides exógenos presentes en el suero animal que se añade al medio de cultivo. Tienen un crecimiento lento, con una velocidad de generación desde 1 hasta 6 horas. Su morfología colonial incluye que crecen de un tamaño pequeño y poseen el aspecto de un huevo frito. La neumonía producida por *M. pneumoniae* tiene una distribución universal durante todo el año. Infecta a niños de entre 5 y 15 años, pero todos los grupos de población son susceptibles a desarrollar la enfermedad debido a que su vía de transmisión es por la inhalación de las gotitas aerosolizadas y ocasiona infecciones de las vías respiratorias inferiores incluyendo traqueo bronquitis y bronconeumonías (Murray et al., 2021).

✓ *H. influenzae*

Son cocobacilos gramnegativos pleomorfos de pequeño tamaño. Son anaerobios facultativos y nutricionalmente exigentes que necesitan del factor X (NAD) y/o V (hemina) para su crecimiento. Las especies pertenecientes al género *Haemophilus*, en especial *H. parainfluenzae* y las cepas de *H. influenzae* no encapsulado llegan al tracto respiratorio superior los primeros meses de vida de todos los individuos. Estos microorganismos se pueden diseminar localmente y producir otitis media, sinusitis, bronquitis y neumonía. Sin embargo, la diseminación de la enfermedad no es frecuente. Por el contrario, *H. influenzae* encapsulado (serotipo b) aparece de forma infrecuente o en un número muy bajo en el tracto respiratorio superior. *H. influenzae* tipo b es el serotipo que produce enfermedad sistémica con mayor frecuencia, aunque rara vez se aísla en niños sanos (un hecho que destaca la virulencia de esta bacteria). Es causante de neumonía, un proceso acompañado de inflamación y consolidación de los pulmones observada principalmente en ancianos con un trastorno pulmonar crónico de base (Murray et al., 2021).



**Figura 1.** Clasificación de las IRA del tracto superior e inferior y los principales agentes etiológicos asociados a ellas. Adaptado de *Respiratory Tract Infections and Laboratory Diagnostic Methods: A Review with A Focus on Syndromic Panel-Based Assays*, por Calderaro et al, 2022

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Diagnóstico de las IRA

La capacidad de detectar e identificar simultáneamente los agentes causales de las infecciones polimicrobianas a partir de muestras clínicas resulta útil para la atención al paciente, en las prácticas de control de infecciones hospitalarias y en los estudios epidemiológicos. La presentación clínica inespecífica de estas infecciones plantea un desafío considerable para estos objetivos y para el diagnóstico diferencial de patógenos. (Hanson & Couturier, 2016).

Actualmente existe una amplia gama de métodos de diagnóstico para la identificación de los agentes causantes de las IRA, 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.

#### 3.2 Métodos convencionales

##### *Cultivo bacteriano y celular*

Las técnicas tradicionales de cultivo bacteriano siguen siendo una herramienta de diagnóstico fundamental en los laboratorios (Murdoch et al., 2019), por otro lado, durante décadas el cultivo celular se consideró el estándar de oro para la detección de virus

respiratorios (VIA, VIB, VSR, AdV, HPIV) mediante la observación del efecto citopático (Das et al., 2018); sin embargo, ahora se realiza con poca frecuencia como prueba rutinaria, ya que requiere de mucho tiempo, un laboratorio especializado y ha sido prácticamente reemplazado por las técnicas de diagnóstico molecular (Murdoch et al., 2019).

El cultivo viral ofrece datos cruciales para la evolución genética, para el análisis de la resistencia a los fármacos y es ventajoso para aislar una amplia variedad de virus incluyendo aquellos que son nuevos o desconocidos (Qian et al., 2025). Sin embargo, su sensibilidad es baja en comparación con los métodos moleculares y algunos de los registros en la literatura mencionan que la sensibilidad del cultivo para el diagnóstico de VPIH y VSR es del 16 % - 37 % y del 46% respectivamente, en comparación con pruebas como la PCR que con frecuencia alcanzan un 100% (Kraupp & Aberle, 2011; Lau et al., 2005).

Los cultivos virales están limitados por los largos ciclos de separación celular y las altas demandas operativas ya que después del aislamiento hay que aplicar métodos serológicos o moleculares para identificar al virus, lo que los hace inadecuados para el diagnóstico clínico rápido. Por otro lado, el cultivo desempeña un papel importante en la investigación posterior de fármacos, en la elaboración de vacunas y en el estudio del mecanismo de infecciones virales (Qian et al., 2025).

Se han hecho modificaciones a esta técnica, como el cultivo en shell-vial, que combina el aislamiento del virus con la detección rápida de antígenos mediante inmunofluorescencia. Esta modificación ha incrementado la sensibilidad del método (73 % - 87 %) y reducido los tiempos de respuesta a 24 horas, sin embargo, no es el mejor método para la detección de virus respiratorios (Das et al., 2018; Murdoch et al., 2019)

Algunos de los virus como los CoV y RV son difíciles de cultivar y presentan una gran variabilidad en la obtención de los resultados (Das et al., 2018). Esto se menciona porque se ha demostrado que los RV son algo exigentes *in Vitro*, y, debido a las condiciones específicas requeridas para un cultivo óptimo y las tasas de aislamiento que se han reportado han sido generalmente bajas (Jacobs *et al.*, 2013). Otro desafío ha sido el aislamiento de MPVH en cultivos celulares convencionales ya que el proceso suele ser muy largo (2 semanas o más) debido a las condiciones que se requieren para su correcto desarrollo, además

de que los efectos citopáticos suelen ser difíciles de reconocer (Feregrino *et al.*, 2013; Landry *et al.*, 2008).

El cultivo bacteriano se considera una herramienta fundamental para los laboratorios de diagnóstico microbiológico (Murdoch *et al.*, 2019). Dentro de los patógenos respiratorios más importantes se encuentran *H. influenzae*, *M. pneumoniae* y *S. pyogenes*. *H. influenzae* se identifica mediante el desarrollo de colonias típicas de esta bacteria en conjunto con la tinción de Gram y pruebas confirmatorias (Khattak & Anjum, 2021). *M. pneumoniae* puede diagnosticarse mediante el cultivo, pero los medios que se requieren son más complejos, tienen una composición especializada, este microorganismo es relativamente insensible, y se requiere de una gran experiencia para realizar el cultivo. Además, tarda de varios días a semanas en completarse debido a su naturaleza y al lento desarrollo del microorganismo (Leal *et al.*, 2020). *S. pyogenes* se cultiva en medios de agar suplementados con sangre y hoy en día esta técnica sigue siendo el estándar de oro y el método de referencia para el diagnóstico de las faringitis y amigdalitis estreptocócicas en la mayoría de los laboratorios y se sabe que la sensibilidad de detección e identificación oscila por encima del 90 % (Spellerberg & Brandt, 2016).

La sensibilidad de un cultivo bacteriano 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 y 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).

Además, la baja abundancia de patógenos dentro de una muestra o la baja abundancia resultante de diferentes tipos de muestras respiratorias, por ejemplo, el hisopado nasofaríngeo con respecto al esputo, podrían ser factores que lleven a una detección errónea por cultivo con la posibilidad de arrojar falsos negativos (Gavillet *et al.*, 2021).

#### *Ensayos serológicos: 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. No requieren de virus viables y los tiempos de entrega son cortos (menos de 4 horas), sin embargo, presentan varias desventajas ya que son muy laboriosos, requieren de una persona calificada con un alto nivel de experiencia y juicio para interpretar los resultados, se necesita de un microscopio de fluorescencia, y pueden 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)

Por ejemplo, estos métodos se utilizan en la detección de VPIH y presentan una sensibilidad del 74% a diferencia del cultivo celular y la RT-PCR cuyos valores de sensibilidad oscilan entre 16-37% y 100% respectivamente (Lau et al., 2005). También se han utilizado en la identificación del MPVH (ensayo por DFA) con una sensibilidad de 85.4% y una especificidad cercana al 100% (Aslanzadeh et al., 2008; Landry et al., 2008). Los sistemas comerciales de DFA han demostrado alta sensibilidad y especificidad para múltiples virus respiratorios como hMPV (95 y 100%), adenovirus (62 y 100%), RSV (94 y 96%) y virus de parainfluenza (88 y 99.7%), aunque los resultados pueden ser subjetivos y requieren experiencia técnica para una interpretación precisa (Das et al., 2018).

- Técnicas de detección rápida de antígenos (Inmunoensayos rápidos)

Proporcionan resultados en un tiempo de 30 minutos y generalmente se utilizan en entornos fuera de un laboratorio o en urgencias como Pruebas en Punto de Atención (POC) lo que permite que los resultados de las pruebas se incorporen al algoritmo de la toma de decisiones clínicas. Actualmente se limitan principalmente a la detección del VIA, el VIB y el VSR. Dentro de las ventajas de estas pruebas es que no se requieren de habilidades técnicas especiales y se pueden realizar por operadores sin formación y sin experiencia en el laboratorio, y son relativamente económicas (Charlton et al., 2019; Das et al., 2018). El uso de este método ha sido muy controversial debido a los niveles bajos de sensibilidad ya que se ha demostrado que varían en cuanto al tipo de paciente, el fabricante, la muestra que se utilice (se observan mucho mejores resultados con aspirados/lavados nasofaríngeos que con muestras tomadas con escobillón), el tiempo de evolución de la enfermedad y la época del año en que se apliquen para el diagnóstico (Das et al., 2018; Murdoch et al., 2019).

Se han realizado diversos estudios sobre la confiabilidad de las pruebas rápidas de antígenos. En las pruebas utilizadas para el diagnóstico de influenza 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-Tagawa 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 (D. Green & George, 2018).

Para el caso del diagnóstico de VSR, las dos pruebas comerciales más utilizadas para diagnóstico son la prueba rápida de detección de antígenos, que son muy sensibles en niños, pero no en adultos, y la qRT-PCR (Center for disease control and prevention, 2020). En un estudio realizado por Chartrand et al, (2015), en el cual se realizó una revisión para evaluar la 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 %).

La identificación de *S. pyogenes* 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*. La confirmación se realiza con otras pruebas como la prueba de PYR y la susceptibilidad a la bacitracina. Aunque las pruebas rápidas de antígenos proporcionan resultados inmediatos, la sensibilidad oscila entre un 58 % y 96 % (Spellerberg & Brandt, 2016).

#### *Ensayos serológicos: Pruebas de detección de anticuerpos*

Estas pruebas permiten detectar los anticuerpos contra la mayoría de los virus respiratorios (VSR, AdV, VIA, VIB, VPIH 1–3), no obstante, presentan una menor sensibilidad respecto a otros métodos de diagnóstico (Das et al., 2018)

Para la identificación de bacterias estas pruebas representan un gran desafío, sobre todo para detectar agentes atípicos como *M. pneumoniae*. Con una sensibilidad (14% - 77%) y especificidad (49 % – 97 %) variada en comparación con pruebas de PCR (que se acercan

al 100%), la utilidad clínica de las pruebas de detección de anticuerpos para la identificación de bacterias es limitada, sobre todo en la detección de bacterias respiratorias en donde se puede dar el caso de reacciones cruzadas. Además, las pruebas serológicas no son relevantes para identificar infecciones virales frecuentemente recurrentes, ya que los niveles séricos de IgM son más bajos debido a la exposición repetida a vacunas o virus circulantes (Das et al., 2018; Murdoch et al., 2019).

En el caso de las pruebas de detección de anticuerpos para bacterias como *S. pyogenes*, estas se miden únicamente con fines de investigación y por lo general no tienen uso clínico en el diagnóstico de la infección estreptocócica (Spellerberg & Brandt, 2016). Por otro lado, en el diagnóstico de *S. pneumoniae*, estas pruebas son de poca ayuda en entornos agudos de la infección ya que se requiere suero de la fase de convalecencia para garantizar un resultado confiable (Vernet et al., 2011).

### **3.3 Métodos Moleculares**

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos se han convertido en el estándar de referencia en el diagnóstico viral y actualmente representan lo mismo para el diagnóstico bacteriano, lo cual representa un enorme avance en el campo de la medicina respiratoria. Mas recientemente, el diagnóstico molecular ha jugado un papel esencial en la respuesta de salud global a la pandemia del nuevo SARS-CoV-2 (Hanson et al., 2020). Al no involucrar antígenos virales o bacterianos ni anticuerpos se presentan como una herramienta de diagnóstico clínico poderosa en etapas tempranas de la enfermedad (Qian et al., 2025)

Estas pruebas presentan ventajas considerables sobre las herramientas de diagnóstico convencionales, entre las que se incluyen un tiempo de respuesta rápido, la capacidad de detectar niveles bajos de todos los patógenos conocidos, la falta de dependencia de la viabilidad del microorganismo objetivo y la poca influencia de la terapia con antibióticos o antivirales en la sensibilidad diagnóstica. Además, con estos métodos se puede obtener información adicional como datos de susceptibilidad a antimicrobianos, se pueden tipificar cepas e identificar un amplio número de microorganismos que presentan variaciones genéticas dentro del mismo género o especie (Murdoch et al., 2019).

Se ha informado que las pruebas moleculares presentan un mayor rendimiento diagnóstico (60% frente a 35%), mayor especificidad (de 80 % - 100 %) y mayor sensibilidad

(de 82 % - 100 %) para estos ensayos en comparación con las herramientas de diagnóstico convencionales como el cultivo viral e inmunoensayos (inmunofluorescencia e inmunocromatografía) (Das et al., 2018; Somerville et al., 2015).

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. 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).

Dentro de estas pruebas se encuentran la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), la amplificación mediada por transcripción (TMA), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), la amplificación por círculo rodante (RCA), y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), entre otras. (Das et al., 2018; Somerville et al., 2015)

La PCR se utiliza frecuentemente para la detección de cualquier secuencia de nucleótidos del genoma viral y se ha utilizado para detectar patógenos respiratorios durante más de dos décadas, sin embargo, su aplicación para diagnóstico por parte de los laboratorios ha sido reciente gracias a la disponibilidad de ensayos comerciales (Kabir, 2018; Murdoch et al., 2019)

#### *Papel de la PCR múltiple en el diagnóstico de las IRA*

La utilización de una PCR monoplex para la detección de microorganismos individuales tiene ciertas limitaciones, 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).

Los métodos de PCR multiplex permiten la detección de múltiples patógenos simultáneamente (El Kholy *et al.*, 2016). Esta modalidad permite analizar numerosos patógenos en paralelo en un solo análisis y por lo tanto, 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).

La incorporación de ensayos multiplex en los laboratorios disminuye significativamente el tiempo de respuesta en comparación con el que se requiere cuando se realizan todos los ensayos de manera individual, además de que al ser utilizados como una opción de pedido de pruebas de rutina o por parte de un médico pueden eliminar parte de la indecisión descrita al solicitar pruebas para un número más cerrado de objetivos individualmente. El uso de paneles respiratorios permite una caracterización más completa de los virus que contribuyen a la vigilancia epidemiológica en general y en la investigación de brotes. Otros beneficios, menos tangibles pero importantes, es que su uso genera una mayor satisfacción tanto del paciente como del médico gracias a un menor tiempo de respuesta de las pruebas (Charlton *et al.*, 2019). Los virus respiratorios se detectan en paneles de PCR multiplex que en su mayoría incluyen al VIA, VIB, VSR, VPIH, MPVH, RV, EV, parechovirus, BoV y varios coronavirus (OC43, 229E, NL63, HKU1) (Murdoch *et al.*, 2019).

La rapidez de los resultados, la detección simultánea de una variedad de patógenos y la superior sensibilidad de los ensayos moleculares multiplex y monoplex han permitido la reducción de la estancia hospitalaria del paciente, las pruebas diagnósticas que se le solicitan y se ha logrado el acortamiento de la administración intravenosa de antibióticos cuando no son necesarios (Ling *et al.*, 2018).

Actualmente existe una gran cantidad de paneles sindrómicos respiratorios, estos paneles multiplex presentan variaciones en términos de: su complejidad (alta, moderada o exenta), rendimiento, patógenos detectados, capacidad de subtipificación, flujo de trabajo, facilidad de uso y tiempo para obtener resultados que puede ir varias horas a minutos. En su mayoría estos ensayos se clasifican como de alta complejidad de acuerdo con las Enmiendas para la Mejora de los Laboratorios Clínicos (CLIA, *por sus siglas en inglés*) y su implementación en un laboratorio requiere de conocimientos amplios del área, de capacitación y una experiencia considerable para llevar a cabo correctamente la metodología de ejecución, el procesamiento de las muestras y la interpretación de resultados. Se ha observado que los paneles de alto rendimiento son ideales en situaciones de brotes y en

temporadas virales respiratorias cuando los volúmenes de muestra son altos (Das et al., 2018).

Para el diagnóstico de infecciones respiratorias se mencionan a continuación algunos de los paneles sindrómicos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y su respectivo método: *NxTAG*® *respiratory pathogen panel* (RT-PCR en tiempo real), *Verigene RP Flex* (RT-PCR y microarreglos de hibridación), *BD MAX* (PCR en tiempo real), *FilmArray respiratory panel*® (PCR anidada con análisis de curva de fusión), *Verigene*® *RP flex* (PCR con matriz de nucleótidos de baja densidad) y *Luminex*® (PCR con matriz de perlas en fase líquida) (Das et al., 2018; Hanson & Couturier, 2016)

Estos métodos pueden detectar hasta 22 patógenos y ofrecen un tiempo aproximado para obtener resultados desde 1 hasta 8 horas, dependiendo de la prueba, con un rendimiento que puede ser medio o alto, y con una complejidad de moderada a alta, además de que el lugar de prueba puede ser un laboratorio clínico o se pueden realizar en las instalaciones del paciente. (Hanson, K.E., & Couturier, M.R., 2016).

Otros sistemas como aquellos que utilizan tecnología Luminex permiten procesar hasta 96 muestras y detectar simultáneamente 22 patógenos diferentes (19 virus y 3 bacterias), obteniendo resultados en aproximadamente 4 horas, pero la necesidad de utilizar tres equipos distintos en el procesamiento dificulta su uso como técnica rápida (Marimón & Navarro-Marí, 2017)

Una de las tecnologías más recientes que incorpora la tecnología de la PCR múltiple es el panel respiratorio FilmArray® desarrollado por BioFire®. Este sistema permite detectar 22 patógenos respiratorios (virales y bacterianos) en un tiempo aproximado de 45 minutos (BioMérieux México, 2024). Este panel se considera una POC ya que es una técnica completamente automatizada, en bolsa cerrada y desechable (Andrews *et al.*, 2017). Este sistema utiliza para la extracción de ácidos nucleicos y la amplificación mediante PCR anidada. Mediante el análisis de datos en una bolsa desechable, se identifica un amplio número de patógenos virales y bacterianos. Esta reacción se realiza en dos pasos: el primero consiste en una PCR multiplex que contiene *primers* dirigidos a múltiples secuencias diana, y el segundo se dirige a un patógeno específico (Kabir, 2018).

Sin embargo, la implementación de esta prueba es costosa y suele ser la principal desventaja y limitante para la mayoría de los laboratorios clínicos. Para adquirir la plataforma FilmArray® se requieren de aproximadamente de 35,000 a 37,500 USD (\$643,187.65 – \$689,129.63 MX) para la instalación y uso del equipo cuya capacidad de procesamiento es de 1 muestra a la vez. Además, deben de adquirirse por separado las bolsas de reactivo que contienen el panel respiratorio y cuyo precio de lista por unidad es de aproximadamente 129 USD (\$2,398.74 MX) para cada muestra que se vaya a procesar. Tomando en cuenta estos datos, y haciendo ajustes en los costos, el precio de una prueba para un paciente se ha establecido en aproximadamente los 214.44 a 417 USD (\$3,996.79 – \$7,663.12 MX) (Bennett & Bissailon, 2023; Soucek et al., 2019).

Por otro lado, algunos paneles respiratorios mencionan en las especificaciones el método de extracción adecuado para el procesamiento de muestras y pueden o no especificar el medio de transporte. Un laboratorio que desee implementar estos métodos de diagnóstico y hacer alguna modificación debe de realizar un estudio de verificación que demuestra la recuperación de los ácidos nucleicos y el rendimiento de la prueba, y para ello debe de contar con el personal calificado y una infraestructura adecuada para dicha finalidad (Charlton et al., 2019).

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las infecciones respiratorias agudas son el primer motivo de consulta médica en nuestro país y se encuentran entre las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños y adultos mayores, su diagnóstico se realiza en la mayoría de los casos empleando métodos convencionales, que resultan laboriosos, tardados, con niveles de sensibilidad y especificidad bajos y muchas veces limitados a un patógeno en particular, lo que aumenta los tiempos de respuesta; existen también los ensayos moleculares monoplex y multiplex, los monoplex son poco prácticos y rentables, en especial cuando se tratan de infecciones con una amplia variedad de agentes causales como lo son las infecciones respiratorias, y los multiplex son de elevado costo y difícil implementación en la mayoría de los laboratorios y por ende de bajo acceso en los sistemas de salud.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones respiratorias agudas generan un impacto negativo en la salud humana. Su alta incidencia en la población, su capacidad de contagio y sus niveles de mortalidad reflejan la importancia de realizar un diagnóstico etiológico específico y rápido, y aunque se cuenta con métodos convencionales para la identificación de los patógenos, existen obstáculos que limitan el adecuado manejo clínico del paciente. Por ello mejorar el diagnóstico se vuelve todo un reto. Considerando la gran variedad de agentes etiológicos causantes de las IRA, desarrollar y estandarizar un panel de diagnóstico molecular sensible, específico, capaz de identificar simultáneamente a diferentes patógenos y con tiempos respuesta cortos, puede contribuir a optimizar el manejo y tratamiento del paciente.

## 6. OBJETIVOS

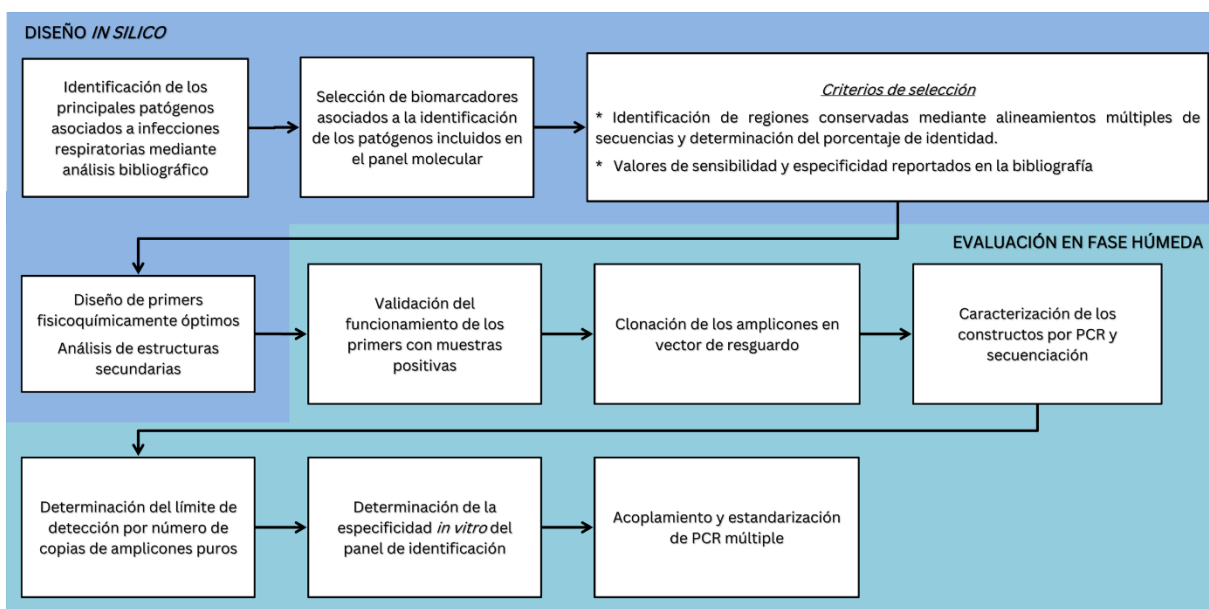
### 6.1 Objetivo general

Diseñar y desarrollar un panel de identificación molecular para patógenos de importancia respiratoria.

### 6.2 Objetivos específicos

- Seleccionar los patógenos respiratorios que se incluirán en el diseño del panel de identificación molecular de acuerdo con su importancia clínica y epidemiológica.
- Diseñar *In silico* un panel de identificación molecular para detectar los biomarcadores asociados a los patógenos seleccionados.
- Desarrollar en fase húmeda la estandarización del panel de identificación molecular.
- Construir plásmidos de resguardo que sirvan como control positivo de cada uno de los blancos del panel.
- Determinar la especificidad y límite de detección de cada secuencia blanco.
- Construir un plásmido de resguardo como control positivo de todas las secuencias blanco incluidas en el panel.

## 7. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 Diseño In silico

#### 8.1.1 Identificación de los principales patógenos causantes de infecciones respiratorias agudas en México

Se llevó a cabo una revisión exhaustiva y sistemática de la literatura científica y de informes oficiales. La búsqueda se definió a estudios y documentos publicados de México en el periodo comprendido entre los años 2010 y 2025, con el fin de abarcar las tendencias epidemiológicas pre y post pandémicas. La recolección de la información bibliográfica se realizó utilizando los motores de búsqueda y bases de datos especializados como Google Scholar, PubMed y EBSCO. La información se complementó con una búsqueda dirigida de información oficial y datos epidemiológicos de la Secretaría de Salud a través de los boletines epidemiológicos, informes técnicos y anuarios de morbilidad emitidos por esta entidad. Se emplearon las palabras clave “*Infección respiratoria aguda*”, “*Virus respiratorios*”, “*Bacterias respiratorias*”, “*México*”, “*Prevalencia*”, “*Epidemiología*”, “*Vigilancia epidemiológica*” y “*Patógenos respiratorios*” usando diversas combinaciones tanto en idioma inglés como en español.

### 8.1.2 Selección de biomarcadores

#### ✓ Revisión bibliográfica

Una vez identificados los patógenos de interés, se procedió a la selección de los biomarcadores para su identificación. Para ello se efectuó una búsqueda bibliográfica enfocada en la detección, estudio y comparación de diversos genes o regiones genómicas empleadas como biomarcadores en ensayos moleculares. Los criterios de selección empleados fue su desempeño diagnóstico (sensibilidad y especificidad) reportado en la literatura científica.

#### ✓ Identificación de regiones conservadas

Para corroborar el grado de conservación de las regiones candidatas, se construyeron alineamientos múltiples de secuencias empleando la plataforma CLUSTAL W. A conveniencia del estudio, se alinearon como mínimo 20 secuencias genéticas representativas para cada patógeno respiratorio obtenidas de la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y de la plataforma Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) en el caso específico de SARS-CoV-2. La selección incluyó los diferentes genotipos, serotipos, subtipos variantes y/o especies de cada patógenos con relevancia clínica en infecciones respiratorias con el fin de asegurar la representatividad de la diversidad genética circulante. La selección final de los biomarcadores se basó en la combinación de ambos análisis: se eligieron aquellas secuencias con un alto rendimiento diagnóstico previamente documentado, así como un alto porcentaje de identidad, asegurando la fiabilidad para la detección específica de cada agente patógeno. En aquellos casos donde se observó discordancia entre los datos del rendimiento diagnóstico y el grado de conservación, se priorizó este último como criterio de selección.

### 8.1.3 Diseño de *primers*

El diseño de los *primers* para cada blanco molecular se realizó con el programa informático Oligo Explorer ver1.5, específicamente sobre las regiones altamente conservadas identificadas en los alineamientos múltiples. El diseño cumplió con los criterios fisicoquímicos recomendados para la obtención de *primers* óptimos:

- Contenido de guanina y citocina (GC) de entre 40 y 60 %

- Una longitud de 17 a 25 pares de bases (pb)
- La presencia de una guanina (G) o citocina (C) en las últimas 5 bases del extremo 3'OH
- Una temperatura de fusión (Tm) superior a 55°C

Además, para asegurar un acoplamiento en una reacción múltiple, se verificó que la diferencia de Tm entre todo el conjunto de *primers* no excediera los 2°C y que la diferencia de tamaño entre los amplicones generados fuera de al menos 20 pb, permitiendo su fácil diferenciación en un gel de agarosa. Posteriormente, se utilizó la herramienta Oligo Analyzer 1.5 para evaluar la formación de estructuras secundarias como heterodímeros, homodímeros u horquillas, que pudieran interferir con la eficiencia y rendimiento de la reacción de PCR múltiple.

Finalmente, para confirmar la especificidad de los *primers* diseñados, cada uno fue validado *In silico* utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides (BLASTn) mediante alineamientos locales contra las secuencias presentes en la base de datos del NCBI. Este análisis permitió verificar que las secuencias no presentaron hibridación inespecífica significativa.

## **8.2 Desarrollo de la fase húmeda del panel de identificación molecular**

### **8.2.1 Validación del funcionamiento de los *primers* en amplificaciones individuales**

Para la validación de cada par de *primers* diseñado, se utilizaron muestras positivas previamente caracterizadas.

*Controles de patógenos virales:* Se emplearon cultivos de AdV (especies B y C), VSR (Genotipo B), VIA (Subtipos H1N1pdm, H1N1 y H3N2), VIB y SARS-CoV-2 (cepa Wuhan), los cuales fueron facilitados por el Dr. Carlos Cabello Gutiérrez del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

*Control positivo interno:* Para la validación de los *primers* dirigidos al gen de la subunidad beta de la hemoglobina humana (*HBB*), se trabajó con cultivos de células HeLa, proporcionados por el Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR).

*Controles bacterianos:* Las cepas de *H. influenzae* (ATCC), *S. pneumoniae* (ATCC) y *S. pyogenes* (cepa caracterizada bioquímicamente) fueron facilitadas por el Hospital Universitario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

A partir de los cultivos virales infectados y de las células HeLa, se realizó la extracción de ARN utilizando el sistema comercial PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La concentración del RNA extraído se determinó en el equipo NanoDrop™ 2000, y su integridad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (EGA) al 1%. Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN mediante el sistema comercial RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific).

La amplificación de los blancos bacterianos se realizó directamente mediante PCR de colonia. Para los blancos virales y el control interno, se utilizó el cDNA como plantilla. Ambas estrategias de amplificación se llevaron a cabo con el producto DreamTaq™ PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Las reacciones se prepararon de forma individual para cada patógeno en un volumen final de 10µL. El protocolo de amplificación se describe en la sección de resultados.

### **8.2.2 Construcción de plásmidos de resguardo para cada uno de los biomarcadores**

La secuencia de cada biomarcador fue amplificada mediante PCR utilizando la enzima Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) para minimizar la introducción de errores. El amplicón resultante fue clonado en el vector pJET1.2/blunt utilizando el producto CloneJET PCR Cloning kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente, el ADN recombinante generado se propagó en células competentes de *E. coli* Top 10 mediante transformación bacteriana por choque térmico. Las colonias candidatas se seleccionaron y caracterizaron mediante reacciones de PCR de colonia para confirmar la correcta inserción del biomarcador.

- PCR-1 (Presencia del Inserto): Se realizó una amplificación utilizando el par de *primers* específicos del biomarcador para verificar su presencia dentro de la secuencia del plásmido.

- PCR-2 (Integridad del inserto ): Se emplearon *primers* que hibridan en el plásmido y flanquean el sitio de clonación múltiple para confirmar que el inserto se encontraba en una sola copia.

Las colonias que presentaron el perfil de amplificación esperada fueron seleccionadas para su resguardo en caldo de soya tripticaseína suplementado con ampicilina y 30% de glicerol y se almacenaron a -30°C. A partir de estas, se generaron cultivos para la posterior extracción del ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina. Los plásmidos purificados sirvieron como plantilla para una nueva amplificación de cada biomarcador. Finalmente, los amplicones fueron purificados a partir de gel de agarosa de bajo punto de fusión mediante el método de matriz de sílice. Estos productos purificados se enviaron para su secuenciación por el método Sanger al Laboratorio de Servicios Genómicos del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) para comprobar la identidad del biomarcador.

### 8.2.3 Evaluación de la especificidad analítica de los *primers*

Se evaluó la especificidad analítica del conjunto de *primers* diseñados para descartar reacciones cruzadas y, por ende, la generación de falsos positivos. La evaluación se llevó a cabo en dos fases, utilizando en ambas el sistema comercial LunaScript® Multiplex One-Step RT-PCR (New England Biolabs, NEB)

- ✓ Especificidad entre biomarcadores del panel (reactividad cruzada interna). Para asegurar que cada par de *primers* reconociera únicamente su blanco molecular específico dentro del panel, se prepararon nueve reacciones de RT-PCR multiplex. Cada reacción contenía la mezcla completa de todos los *primers* diseñados. Sin embargo, a cada tubo se le añadió como molde una única muestra positiva correspondiente a uno de los patógenos de interés (ejemplo, el tubo 1 contenía el molde de AdV, el tubo 2 el de VIA, y así sucesivamente). De esta manera se evaluó que, en presencia de una platilla específica, solo el par de *primers* diseñado para su detección generara una amplificación, mientras que el resto de los oligonucleótidos presentes en la reacción, permanecieran sin generar un reconocimiento inespecífico.
- ✓ Especificidad con potenciales fuentes ajenas al panel de falsos positivos (reactividad cruzada externa). Con el objetivo de determinar si los *primers* podrían hibridar con secuencias de microorganismos no incluidos en el panel, se evaluó su especificidad

frente a potenciales fuentes de falsos positivos. Se prepararon reacciones de RT-PCR multiplex utilizando la misma mezcla completa de *primers*. En esta fase, los moldes utilizados fueron plantillas de secuencias genéticas de microorganismos presentes en la microbiota habitual del tracto respiratorio, y otros patógenos taxonómicamente relacionados con los patógenos de interés, pero que no fueron considerados en el diseño de este panel.

#### **8.2.4 Determinación de la sensibilidad analítica (Límite de detección)**

La sensibilidad analítica o límite de detección (LOD), se determinó para cada biomarcador de forma individual. Este proceso se llevó a cabo para establecer la mínima cantidad de amplicón puro que el ensayo de PCR es capaz de detectar. A partir de una concentración stock de 10 ng/ $\mu$ L de amplicón purificado se prepararon diluciones seriadas con un factor de 10 (1:10, 1:100, 1:1000, etc.). Para asegurar la reproducibilidad del ensayo, cada dilución se realizó por triplicado. Posteriormente, se tomó 1  $\mu$ L de cada dilución como plantilla para preparar reacciones de PCR, manteniendo el esquema de triplicado para cada concentración evaluada. Los productos de la amplificación se analizaron mediante EGA. El LOD se definió como la última dilución en la que se pudo observar una banda de amplificación clara y reproducible en el gel. A partir de la concentración de esta última dilución positiva se calculó el LOD expresado en número de copias para cada biomarcador utilizando la siguiente fórmula:

*El número de copias / l = (6,022 x 10<sup>23</sup> x [amplicón]) / (longitud amplicón x 10<sup>9</sup> x 660 [peso medio de un par de bases])*

#### **8.2.5 Estandarización del panel de identificación molecular**

Para el acoplamiento y estandarización del panel de identificación molecular, se utilizó el producto comercial LunaScript<sup>®</sup> Multiplex One-Step RT-PCR Kit (New England Biolabs). Se seleccionó este sistema dado que su formulación, con concentraciones ajustadas de dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, ADN polimerasa y Retrotranscriptasa, está diseñado para amplificar simultáneamente hasta 20 blancos en una sola reacción. La estandarización del panel se centró en la optimización de dos parámetros para asegurar una amplificación adecuada de todos los biomarcadores:

- La temperatura de alineamiento de todo el conjunto de *primers*

- La concentración final de cada para de *primers* en la mezcla de reacción

El protocolo de amplificación final, incluyendo los tiempos y temperaturas de los ciclos de amplificación, así como las concentraciones de trabajo para cada par de *primers*, se describen en detalle en la sección de resultados.

### 8.2.6 Construcción del control positivo

Se exploraron dos estrategias de clonación molecular basadas en enzimas de restricción con el objetivo de construir un único plásmido de control positivo que contuviera las nueve secuencias de los biomarcadores. En cada estrategia el objetivo fue ligar 4 amplicones juntos y posteriormente unir esos dos fragmentos y añadir al final el amplicón de AdV.

#### *Estrategia 1: Ligación dirigida*

1. Generación de fragmentos por digestión: Se realizaron cuatro reacciones de digestión con enzimas de restricción.
  - a. Los plásmidos de resguardo con las secuencias de influenza A y betaglobina se digirieron con XhoI y XbaI respectivamente para linealizar el vector.
  - b. Los plásmidos de resguardo de SARS-CoV-2 y *S. pneumoniae* se digirieron con BglII/XbaI y BglII/XhoI respectivamente para liberar los fragmentos de interés. Estos productos de liberación fueron posteriormente purificados.
2. Ligación de pares de biomarcadores: Se prepararon dos reacciones de ligación utilizando la enzima T4 ADN ligasa
  - a. *Reacción A*: Se ligó el plásmido linealizado de betaglobina (con extremo XbaI) con el fragmento liberado de SARS-CoV-2 (con extremos BglII y XbaI)
  - b. *Reacción B*: Se ligó el plásmido linealizado de influenza A (con extremo XhoI) con el fragmento liberado de *S. pneumoniae* (con extremos BglII y XhoI)
3. Verificación por PCR: Para confirmar el éxito de la ligación, se tomó una alícuota de cada reacción y se utilizó como platilla para una PCR. Se utilizó un par de *primers* donde uno hibrida en el extremo del biomarcador presente en el vector y otro en el extremo del inserto. Los tamaños de amplicón esperados que incluían el tamaño de

ambos biomarcadores más las secuencias de los sitios de restricción se confirmaron en EGA.

4. Ensamblaje final: Los productos de ligación se clonaron en el vector pGEM-T Easy y se transformaron en *E. coli* para su propagación. Posteriormente, los plásmidos extraídos se digirieron con la enzima NotI para intentar la ligación final de los dos fragmentos.

#### *Estrategia 2. Ligación no dirigida con extremos cohesivos únicos*

1. Generación de fragmentos: Los cuatro plásmidos de resguardo para *H. influenzae*, *S. pyogenes*, influenza B y VSR se digirieron de forma individual con la enzima de restricción BglII. Esto generó 4 fragmentos lineales, cada uno con extremos cohesivos BglII idénticos. Los fragmentos se purificaron y cuantificaron.
2. Ligación inicial en pares: Se prepararon dos reacciones de ligación separadas, ajustando la concentración de los fragmentos para favorecer la ligación intermolecular.
  - a. *Reacción C*: Ligación del fragmento de *H. influenzae* con el de influenza B.
  - b. *Reacción D*: Ligación del fragmento de *S. pyogenes* con el de VSR.
3. Verificación por PCR: Se confirmó la formación de los pares mediante la misma estrategia descrita en la estrategia 1. Los tamaños de amplicón esperados fueron confirmados por EGA.
4. Ensamblaje final: Una vez confirmada la presencia de los fragmentos esperados, las reacciones de ligación C y D se mezclaron y se añadió T4 ADN ligasa adicional para promover la unión de estos dos fragmentos y formar el constructo final de cuatro biomarcadores.

## **9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **9.1. Identificación de los principales patógenos causantes de infecciones respiratorias agudas en México**

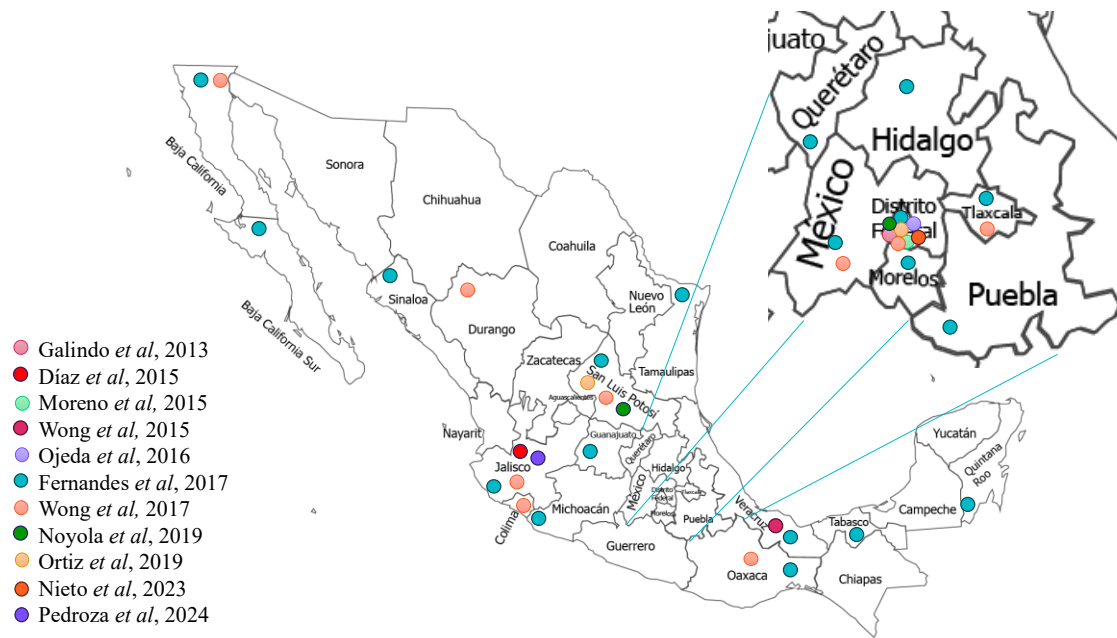
La evidencia epidemiológica histórica en nuestro país sugiere que, antes de la pandemia, la vigilancia se centraba casi exclusivamente en el VIA (Fernandes-Matano et al., 2017; Pedroza-Uribe et al., 2024). Posteriormente esta vigilancia se amplió para incluir

también al SARS-CoV-2. Para estos agentes se ha generado una descripción epidemiológica minuciosa con datos que pueden ser fácilmente consultados en los diversos boletines epidemiológicos emitidos por la Secretaría de Salud, en contraste, para otros patógenos respiratorios, los informes son poco frecuentes y no se dispone de suficiente información. Durante el año 2024, se reportaron más de 16 millones de casos de infecciones respiratorias en México, sin embargo, estas no fueron categorizadas de acuerdo con el agente causal (Secretaría de Salud, 2024).

Esta revisión sintetizó la evidencia de 11 estudios clave publicados entre 2013 y 2024 para definir la epidemiología molecular de los principales agentes patógenos causantes de las IRA en México.

El consenso metodológico en los 11 artículos aborda el uso de la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR), en su mayoría en formato múltiple. El uso de estos paneles (que detectan simultáneamente de 12 a más de 20 patógenos) permitió no solo la detección del virus de la influenza, si no la caracterización completa de los virus “no influenza”.

Los estudios abarcaron todos los grupos poblacionales, la mayoría se enfocó en el grupo de los niños y adolescentes, mientras que algunos incluyeron a todas las edades. Es importante mencionar que hay una fuerte concentración de datos en la Ciudad de México, sin embargo, la cobertura se amplió con estudios en Jalisco y Veracruz y solo un par fueron estudios multicéntricos nacionales (Figura 2). Los datos demográficos y poblacionales se resumen en la Tabla 3.



**Figura 2.** Distribución geográfica de los estudios epidemiológicos realizados en México durante el periodo 2013-2024.  
Nota: Elaboración propia

**Tabla 3.** Datos demográficos recabados de los estudios epidemiológicos realizados en México antes y después de la pandemia

Estudio	Lugar/tipo de estudio	Edad de la población	Sexo		Muestras (n)	Método de diagnóstico	Pacientes ambulatorios	Pacientes hospitalizados	Positividad
			H	M					
<b>PRE - PANDEMIA</b>									
(Fernandes-Matano et al., 2017)	Multicéntrico nacional	0->60 años	451 (51.7%)	421 (48.3%)	872	qRT-PCR monoplex	60 (6.9%)	812 (93.1%)	312 (35.8%)
(Galindo-Fraga et al., 2013)	Ciudad de México	0 - 96 años	439 (41.2%)	626 (58.8%)	1065	qRT-PCR multiplex	629 (59.1%)	436 (40.9%)	678 (63.6%)
(Moreno-Valencia et al., 2015)	Ciudad de México	15 años <	222 (51.4%)	210 (48.6%)	432	qRT-PCR multiplex	0	432 (100%)	258 (59.7%)
(Ojeda et al., 2016)	Ciudad de México	18 años <	142 (56.6%)	109 (43.4%)	251	qRT-PCR multiplex FilmArray	0	251 (100%)	170 (67.7%)
(Ortiz-Hernández et al., 2019)	Ciudad de México y SLP	5 años <	829 (55.8%)	657 (44.2%)	1486	qRT-PCR multiplex	408 (27.4%)	1078 (72.5%)	1227 (82.6%)
(Wong-Chew et al., 2015)	Veracruz	5 años <	291 (56%)	228 (44%)	519	qRT-PCR multiplex	519 (100%)	0	371 (71.48%)
(Wong-Chew et al., 2017)	Multicéntrico nacional	1 mes - 5 años	870 (62%)	534 (38%)	1404	qRT-PCR multiplex	136 (9.7%)	1268 (90.3%)	1146 (81.6%)
(Díaz et al., 2015)	Jalisco	< 5 años	95 (58.6%)	67 (41.35%)	162	RT-PCR multiplex	162 (100%)	0	93 (57.4%)
(Noyola et al., 2019)	Ciudad de México y SLP	0 - >60 años	1673 (42.6%)	2253 (57.4%)	3926	PCR multiplex	2070 (53%)	1856 (47%)	3285 (83.67%)
<b>POST - PANDEMIA</b>									
(Nieto-Rivera et al., 2023)	Ciudad de México	0-19 años	>hombres	<mulheres	15552	qRT-PCR uniplex y multiplex	1325	817	2400 (15.43%)
(Pedroza-Uribe et al., 2024)	Jalisco	0 - >60 años	2651 (42.87%)	3533 (57.13%)	6184	qRT-PCR multiplex	6184	0	6184 (100%)

Nota: Elaboración propia

De acuerdo con el análisis de prevalencia realizado, se demostró que, en nuestro país, la etiología de las IRA se caracteriza por ser de origen polimicrobiano (Figura 3 y Tabla 4), además antes de la pandemia existía una codominancia clara entre el VSR y el RV. El VSR presentó un rango de detección del 10.30% al 33.50%, consolidándose como uno de los principales patógenos detectados en pacientes con infecciones respiratorias, como se evidenció en los altos porcentajes de Ojeda et al, (2016) y Fernandes-Matano et al, (2017).

El RV mostró un comportamiento similar o incluso superior, con un rango de 17.50% al 34.79%, destacando su prevalencia en estudios como el de Noyola et al, (2019). Un dato importante obtenido a partir de este análisis fue que en estudios enfocados mayoritariamente en niños y lactantes hospitalizados (Ojeda et al., 2016; Ortiz-Hernández et al., 2019), el VSR se consolidó como el principal agente confirmando su rol como principal causa de IRA en la infancia, por el contrario, en estudios que incluyeron un espectro de edad más amplio, abarcando poblaciones de todas las edades (Galindo-Fraga et al., 2013; Noyola et al., 2019), el RV muestra una clara ventaja sobre el VSR. Esto sugiere que, si bien el VSR es el patógeno mayormente detectado en poblaciones pediátricas, el RV es el virus de mayor circulación en la población general.

Otros patógenos como el MPVH también jugaron un papel crucial, con picos de prevalencia muy significativos de hasta 38.7% (Diaz et al., 2015), superando a RV y VSR en ese estudio en particular. Los VIA, VIB, AdV, y VPIH mantuvieron una circulación constante, contribuyendo de forma importante a la carga de la enfermedad.

La llegada del SARS-CoV-2 no solo añadió un patógeno, si no que generó un fenómeno de sustitución virológica, alcanzando un rango de detección del 66.79% al 92.04% (Nieto-Rivera et al., 2023; Pedroza-Uribe et al., 2024), convirtiéndolo prácticamente en el principal agente etiológico. Esto coincidió con un colapso en la circulación de los virus históricamente prevalentes. El VSR se desplomó a un rango del 0.02% - 8.38%, y el RV a un 0.05%. Similarmente, el resto de los patógenos incluyendo MPVH, VIA, VIB, EV y VPIH presentaron una prevalencia drásticamente disminuida (Figura 4).

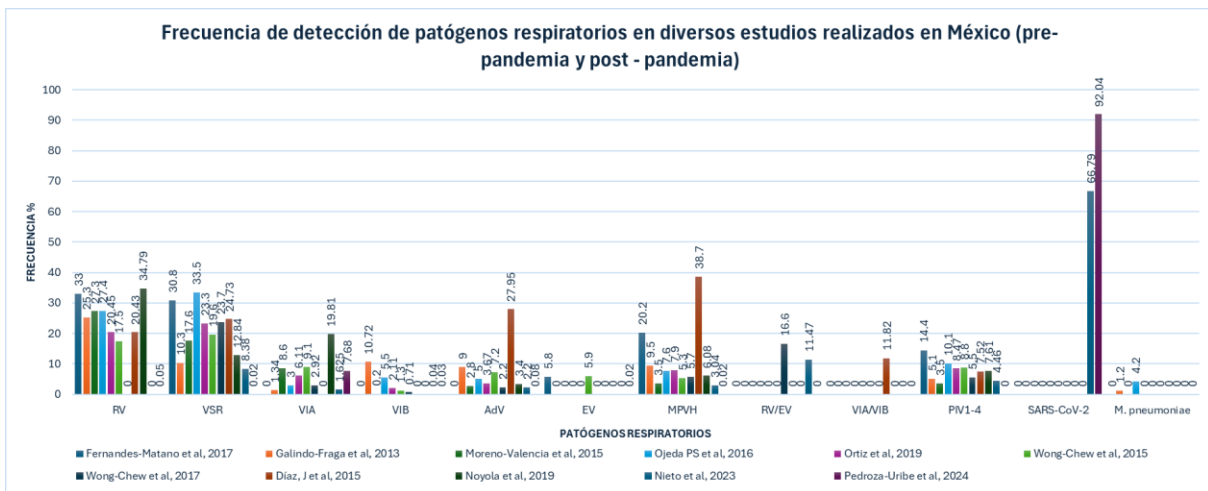
Un punto débil del conjunto de datos analizados es su enfoque casi exclusivo en patógenos virales, mencionando solo a *M. pneumoniae*. Se omitió la vigilancia de bacterias de enorme relevancia clínica y epidemiológica en México.

- *S. pyogenes*: Causante de la faringitis estreptocócica, enfermedad que ocupa el 15° lugar dentro de las 20 principales causas de enfermedad nacional (Secretaría de Salud, 2024), y cuyas complicaciones pueden ser graves.
- *S. pneumoniae* y *H. influenzae*: Principales responsables de la neumonía adquirida en la comunidad (NAC), otitis media aguda y meningitis (Krause et al., 2014).

La no inclusión de estas bacterias deja un punto ciego en la comprensión de la etiología de las infecciones respiratorias, especialmente en casos graves que requieren manejo antibiótico.

Los hallazgos de este análisis justificaron el diseño y desarrollo de un panel de diagnóstico molecular sindrómico respiratorio, en que el cual se incluyeron:

1. Los virus históricamente dominantes VSR y RV, por su alta prevalencia,
2. El agente pandémico y ahora endémico SARS-CoV-2 por su actual relevancia,
3. Los virus de importancia clínica y epidemiológica; VIA, VIB, MPVH, AdV, VPIH 1-4, EV, por su capacidad de causar epidemias y brotes, así como cuadros graves de enfermedad, y
4. Las bacterias clave mencionadas (*S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. pneumoniae*) para permitir un diagnóstico diferencial preciso.

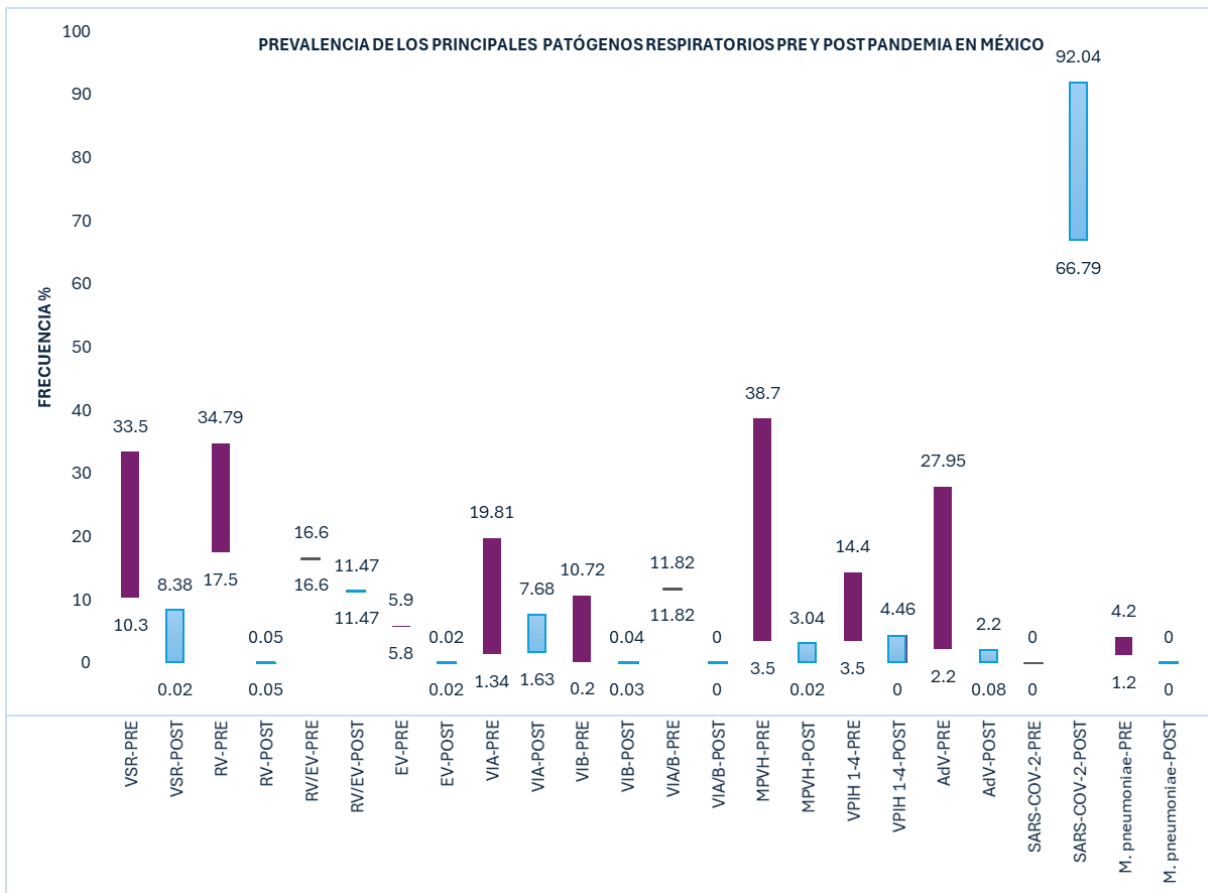


**Figura 3.** Prevalencia de los patógenos respiratorios detectados en diversos estudios realizados en México antes y después de la pandemia. Elaboración propia

**Tabla 4.** Rangos de prevalencia de los patógenos respiratorios detectados en los estudios analizados en México.

Patógeno respiratorio	Frecuencia de detección (%)	
	Pre - pandemia	Post - pandemia
Virus sincitial respiratorio	10.30 - 33.50	0.02 - 8.38
Rinovirus	17.50 - 34.79	0.05
Rinovirus/Enterovirus	16.6	11.47
Enterovirus	5.80 - 5.90	0.02
Virus de la influenza A	1.34 - 19.81	1.63 - 7.68
Virus de la influenza B	0.20 - 10.72	0.03 - 0.04
Virus de la influenza A/B	11.82	0
Metapneumovirus	3.50- 38.70	0.02 - 3.04
Virus de la parainfluenza 1-4	3.50 - 14.40	4. 46
Adenovirus	2.20 - 27.95	0.08 - 2.20
SARS-COV-2	0	66.79 - 92.04
<i>M. pneumoniae</i>	1.20 - 4.20	0

Nota: Elaboración propia



**Figura 4.** Rangos de prevalencia de los patógenos respiratorios detectados en diversos estudios de México Pre y Post Pandemia

## 9.2 Selección de biomarcadores

La base sobre la que se construye la fiabilidad, reproducibilidad y utilidad diagnóstica de cualquier prueba molecular recae en la selección adecuada de los biomarcadores. El objetivo no solo implica la detección de la presencia de un patógeno, sino asegurar que el ensayo sea lo suficientemente robusto para reconocer la diversidad genética de las poblaciones de estos. Por esta razón, la elección de los nueve blancos moleculares en este diseño no fue un proceso sencillo, sino el resultado de un análisis profundo para equilibrar el desempeño diagnóstico previamente reportado y la estabilidad genómica de la diana molecular.

El proceso de selección se realizó en dos fases complementarias. En primer lugar, se realizó una revisión bibliográfica para identificar los genes más comúnmente empleados en ensayos moleculares para patógenos respiratorios. De esta revisión se recabaron datos de desempeño, específicamente los valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica reportados, que sirvieron como el primer filtro para la selección de candidatos.

La segunda fase, implicó mediante análisis bioinformático, evaluar el grado de conservación de los blancos moleculares candidatos. Mediante AMS que incluyeron un amplio rango de variantes, especies, genotipos, subtipos o serotipos de relevancia clínica para cada patógeno, se calculó el porcentaje de identidad.

La decisión final, en la mayoría de los casos, fue un equilibrio entre estos tres criterios. Sin embargo, en algunos casos se encontró una discordancia: algunos biomarcadores con valores de sensibilidad y especificidad altos y que han sido reportados como los blancos ideales en pruebas validadas, mostraron variabilidad genética considerable en los análisis de los alineamientos, lo cual representó un riesgo diagnóstico significativo, ya que podría ocasionar mal apareamiento (*mismatches*) entre los *primers* y la secuencia diana en nuevas variantes, resultando en una disminución de la eficiencia de la amplificación, y en el peor de los escenarios, en la generación de falsos negativos. En estos casos se priorizó la selección de regiones con un mayor grado de conservación. En los siguientes párrafos se detallará, para cada uno de los nueve biomarcadores, el análisis específico realizado y la justificación final que condujo a la elección del biomarcador implementado en el panel.

Los genes seleccionados para el diseño de *primers* son ampliamente reconocidos en la literatura como marcadores moleculares estables y específicos para la identificación de estos patógenos. Las secuencias del cebador deben ser únicas para identificar un organismo específico o un grupo de organismos. La secuencia de ácidos nucleicos diana también debe estar conservada en el organismo que se va a identificar (Espy et al., 2006).

✓ **Gen *l2* de Adenovirus**

La literatura científica ha centrado la detección y, sobre todo, la clasificación de los más de 103 tipos de AdV, en los genes que codifican para las proteínas estructurales externas, principalmente el gen *h* (hexón) y en menor medida, el gen *f* (fibra). En particular el gen *h* es el blanco más citado en estudios de epidemiología (dos Santos Alves et al., 2024) y en la caracterización viral debido a variabilidad que presenta y que a la vez es la base de la serotipificación. El análisis bioinformático inicial corroboró este problema: al realizar los AMS de los genes *h* y *f* de las especies de AdV de importancia respiratoria (B, C y E), no se lograron identificar regiones con un grado de conservación suficiente para diseñar *primers* universales.

Ante esta evidencia se tomó la decisión de buscar un blanco molecular alternativo, con menor variabilidad genética. Este análisis se extendió a otros genes del genoma adenoviral, revelando que el gen *l2*, que codifica para la proteína de la base del pentón, presentaba un grado de conservación notablemente superior entre las tres especies respiratorias (Figura 5).



**Figura 5.** AMS del gen *l2* de las especies B, C y E de AdV. Resaltado en azul y verde se muestran las secuencias de reconocimiento de los primers diseñados.

La base del pentón es una proteína estructural crucial para el ensamblaje de la cápside y su función fundamental se refleja en una mayor estabilidad de su secuencia a nivel genómico sobre todo en las tres especies respiratorias (Akello et al., 2021; Dhingra et al., 2019; Robinson et al., 2013).

#### ✓ **Gen *M* de SARS-CoV-2**

Desde el inicio de la pandemia de COVID-19, la mayoría de los ensayos de RT-PCR autorizados por agencias regulatorias a nivel mundial se han centrado en la detección de un conjunto de blancos moleculares bien establecidos, entre los que se incluyen los genes de las proteínas de la nucleocápside (*N*), la envoltura (*E*), la espícula (*S*) y la ARN polimerasa dependiente de ARN (*RdRp*), así como diversas regiones del marco de lectura abierto (*ORF*) (Barreto et al., 2020; CDC, 2025; Shabani et al., 2021; Zimmerman et al., 2021). Si bien estos blancos moleculares fueron cruciales para la respuesta inicial, la rápida y continua evolución de SARS-CoV-2 ha revelado una vulnerabilidad en esta estrategia. La aparición de múltiples variantes de preocupación ha estado acompañada de la acumulación de mutaciones en todo el genoma, incluidas las regiones diana de muchos ensayos diagnósticos comerciales y de laboratorio. De hecho, un dato a considerar es que la tasa de mutación y evolución de los virus de ARN es dramáticamente alta, hasta un millón de veces más alta que la de sus huéspedes, y esta alta tasa está correlacionada con la modulación de la virulencia y la capacidad de evolución, y rasgos considerados beneficiosos para la adaptación viral (Islam et al., 2020). Diferentes estudios han documentado extensamente cómo ciertas variaciones nucleotídicas han ocasionado *mismatches* con los *primers* y sondas, comprometiendo la eficiencia de la amplificación y generando preocupación con respecto a la posibilidad de resultados falsos negativos (Afzal, 2020; Artesi et al., 2020; Osorio & Correia-Neves, 2021; Wang et al., 2020; Zimmerman et al., 2021).

Este escenario planteó el desafío y la búsqueda de una región genómica con mayor estabilidad evolutiva. Se identificó el gen de la proteína de matriz (*M*) como un candidato ideal, ya que de acuerdo con diversos estudios presenta una tasa de mutación y variabilidad más baja en comparación con los genes que se utilizan comúnmente para el diagnóstico del SARS-CoV-2 (Abavisani et al., 2022; Abbasian et al., 2023; Islam et al., 2020; Wang et al., 2020). Para comprobar lo anterior, se realizaron AMS utilizando secuencias del gen *M*



mutación en genes no estructurales como el gen *M*, normalmente no son tan altas como las observadas en genes bajo presión inmunitaria selectiva (Stellrecht, 2018). El gen *M* es el gen diana recomendado por las directrices de la OMS y los CDC (CDC, 2025; WHO, 2024), y su utilización como blanco arroja valores de sensibilidad y especificidad del 85% al 100% y del 98.9% al 100% respectivamente en diferentes ensayos moleculares (Stellrecht et al., 2017). Este gen codifica dos proteínas esenciales, *M1* y *M2*, ambas críticas para la integridad estructural y la replicación del virus. Si bien el gen *M* es altamente conservado, no es estático evolutivamente. Se han descrito variaciones genéticas, sin embargo, estas son puntuales y bien caracterizadas (Stellrecht, 2018), y de acuerdo con el análisis realizado las regiones seleccionadas para el diseño de *primers* no se ven afectadas por estas mutaciones (Figura 8), por ello el análisis *In silico* y la posterior validación experimental confirman que el gen *M* es un blanco prometedor para diagnóstico. Los *primers* diseñados no solo detectaron de manera consistente los subtipos de circulación estacional en humanos reportados por la CDC (2024): H1N1pdm, H1N1 estacional y H3N2, sino que también mostraron la capacidad *In silico* para amplificar secuencias de los subtipos de influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP), como H5N1, H7N9, H2N2 y H9N2 que se sabe que causan infecciones en humanos (CDC, 2024a).



**Figura 8.** AMS del gen *M* de los distintos subtipos de influenza *A* circulantes en población humana y subtipos IAAP. Resaltado en azul y verde se muestran las secuencias de reconocimiento de los primers diseñados.

### ✓ Gen *M* del virus de la influenza B

La selección de un biomarcador para este virus siguió una estrategia dual; adherirse a las recomendaciones de organizaciones internacionales de salud y verificar la estabilidad genómica del blanco molecular deseado. La OMS y los CDC, a través de sus protocolos de

vigilancia y diagnóstico han establecido el gen de la proteína de matriz (*M*) como uno de los blancos moleculares de elección para la detección de VIB (WHO, 2024). Esta recomendación se basa en extensos análisis genómicos globales que demuestran que el gen *M* es una de las regiones más altamente conservadas entre ambos linajes, B/Yamagata y B/Victoria (Leong et al., 2020). El análisis *In silico* mediante AMS corroboró esta afirmación (Figura 9), revelando un muy alto porcentaje de identidad en las regiones seleccionadas para el diseño de nuestros *primers* a lo largo de una amplia muestra de secuencias de ambos linajes. La justificación se sustenta en mayor grado cuando se compara su variabilidad genética con otros blancos potenciales, como los genes *HA* y *NA*, que al igual que el *VIA*, se encuentran bajo una fuerte presión selectiva inmunológica, lo que impulsa una continua dinámica evolutiva (Vijaykrishna et al., 2015).



**Figura 9.** AMS del gen *M* del virus de la influenza B. Resaltado en azul y verde se muestran las secuencias de reconocimiento de los *primers* diseñados.

### ✓ Gen *F* del metapneumovirus humano

A diferencia de otros virus de ARN, el MPVH no parece exhibir una evolución genética progresiva (Yang et al., 2009). La literatura describe a los genes *N* (nucleoproteína), *M* (matriz), *L* (polimerasa) y *F* (proteína de fusión) como los principales blancos de detección molecular (Mahony et al., 2011). De todos estos, el gen *F* es uno de los genes más conservados del MPVH. Estudios filogenéticos demuestran que el porcentaje de identidad entre los principales linajes genéticos del virus (A1, A2, B1 y B2) suelen ubicarse entre el 89 % (Yang et al., 2009), un valor que se encuentra dentro del rango del 83.02 al 99.63% obtenido en los AMS (Figura 10). Estos datos junto con la evolución lenta y su alta conservación justificaron el uso del gen *F* como biomarcador para la detección de este patógeno.

	Primer sentido		Primer antisentido			
MH428626.1HMPVB	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	ACACCCCTATCAGCATGGTTGCACCTACACCCCTCGGTGCT	GACAACACTGTGTATCAACTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	GATAAAAGGGAGA	1320
MG431259.1HMPVB	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	ACACCCCTATCAGCATGGTTGCACCTACACCCCTCGGTGCT	GACAACACTGTGTATCAACTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	GATAAAAGGGAGA	1320
KJ627397.1HMPVB	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	ACACCCCTATCAGCATGGTTGCACCTACACCCCTCGGTGCC	GACAACACTGTGTATCAACTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	GATAAAAGGGAGA	1320
KJ627414.1HMPVB	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	ACACCCCTATCAGCATGGTTGCACCTACACCCCTCGGTGCT	GACAACACTGTGTATCAACTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	AATAAAAGGGAGA	1320
KJ627409.1HMPVB	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	ACACCCCTATCAGCATGGTTGCACCTACACCCCTCGGTGCT	GACAACACTGTGTATCAACTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	AATAAAAGGGAGA	1320
KJ627432.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	ACACCCCTATCAGCATGGTTGCACCTACACCCCTCGGTGCT	GACAACACTGTGTATCAACTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	AATAAAAGGGAGA	1320
MT118689.1HMPVB	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	ACACCCCTATCAGCATGGTTGCACCTACACCCCTCGGTGCT	GACAACACTGTGTATCAACTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	AATAAAAGGGAGA	1320
MT118717.1HMPVB	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	ACACCCCTATCAGCATGGTTGCACCTACACCCCTCGGTGCT	GACAACACTGTGTATCAACTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	AATAAAAGGGAGA	1320
MK588637.1HMPVB	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	ACACCCCTATCAGCATGGTTGCACCTACACCCCTCGGTGCT	GACAACACTGTGTATCAACTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	AATAAAAGGGAGA	1320
MF045425.1HMPVB	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	ACACCCCTATCAGCATGGTTGCACCTACACCCCTCGGTGCT	GACAACACTGTGTATCAACTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	AATAAAAGGGAGA	1320
MK588634.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320
MK588633.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320
KY474539.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320
MN306028.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320
MN306024.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320
MT118670.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320
MK167040.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320
MF045424.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320
GQ153651.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320
MK167039.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320
KY474545.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320
KY474541.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320
KY474542.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320
MN867464.1HMPVA	TGCAAAGTCAGCACAGGAAG	GCATCCCTATCAGTATGGTTGCACGTGTCACCCCTCGGGGCT	GACAACACTGTATATCAGCTAAGCAAAG	TGABGGTGAACAGCATGTG	TATAAAAGGCAGA	1320

Figura 10. AMS del gen *F* de los linajes genéticos *A* y *B* del metapneumovirus. Resaltado en azul y verde se muestran las secuencias de reconocimiento de los primers diseñados

### ✓ Gen *N* del virus sincitial respiratorio

El VSR circula principalmente en dos subtipos, VSR-A y VSR-B, que a menudo co-circulan durante las epidemias estacionales. Por lo tanto, el ensayo diseñado debe tener la capacidad de detectar ambos subtipos para garantizar un diagnóstico preciso. La selección del gen de la nucleoproteína (*N*) como blanco molecular se fundamentó en dos características: su grado de conservación y su alta expresión génica. En primer lugar, los genomas del VSR-A y VSR-B comparten aproximadamente un 90% de homología dentro de la región objetivo elegida (Agustiningsih, 2021; Eboigbodin et al., 2017), y los AMS confirmaron dicha estabilidad genómica. Esta alta identidad de secuencias es la que permitió el diseño de un único para de *primers* capaces de detectar ambos subtipos (Figura 11). En segundo lugar, y de manera crucial, la elección del gen *N* maximiza la sensibilidad analítica del panel. El VSR sigue un mecanismo de expresión basado en un gradiente polar de transcripción. La ARN polimerasa viral inicia la transcripción en el extremo 3' del genoma y transcribe los genes de manera secuencial, con una probabilidad de atenuación en cada unión intergénica. Al ser el tercer gen, el gen *N* es uno de los más transcritos (Collins et al., 2013). Esta alta abundancia de transcritos tiene una implicación muy directa y favorable para el diagnóstico molecular al proporcional un número mayor de moléculas diana para la reacción de amplificación.

	Primer sentido		Primer Antisentido	
KY249672.1.HRSVB	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACATTAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCC	CTATGTATAGCTGCCCTTGTAAATACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
MN582529.1.HRSVB	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACATTAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCC	CTATGTATAGCTGCCCTTGTAAATACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
OR466389.1.HRSVB	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACATTAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCC	CTGTGTATAGCTGCCCTTGTAAATACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
MK989761.1.HRSVB	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACATTAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCC	CTGTGTATAGCTGCCCTTGTAAATACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
PP785481.1.HRSVB	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACATTAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCC	CTGTGTATAGCTGCCCTTGTAAATACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
PP795127.1.HRSVB	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACATTAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCC	CTGTGTATAGCTGCCCTTGTAAATACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
PP795125.1.HRSVB	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACATTAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCC	CTGTGTATAGCTGCCCTTGTAAATACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
OR666591.1.HRSVB	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACATTAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCC	CTGTGTATAGCTGCCCTTGTAAATACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
MH327947.1.HRSVB	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACATTAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCC	CTGTGTATAGCTGCCCTTGTAAATACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
MT107528.1.HRSVB	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACATTAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCC	CTGTGTATAGCTGCCCTTGTAAATACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
NC_001803.1	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACACTCAACAAGATCAACTTCTATCATCC	CTGTGTATAGCTGCCCTTGTAAATACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
PP795139.1.HRSVA	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACACTCAACAAGATCAACTTCTATCATCC	TTATGTATAGCAGCATTAGTAATAACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
PP795138.1.HRSVA	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACACTCAACAAGATCAACTTCTATCATCC	TTATGTATAGCAGCATTAGTAATAACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
PP795132.1.HRSVA	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACACTCAACAAGATCAACTTCTATCATCC	TTATGTATAGCAGCATTAGTAATAACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
PP525307.1.HRSVA	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACACTCAACAAGATCAACTTCTATCATCC	TTATGTATAGCAGCATTAGTAATAACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
MZ516111.1.HRSVA	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACACTCAACAAGATCAACTTCTATCATCC	TTATGTATAGCAGCATTAGTAATAACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
OR666595.1.HRSVA	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACACTCAACAAGATCAACTTCTATCATCC	TTATGTATAGCAGCATTAGTAATAACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
MZ516096.1.HRSVA	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACACTCAACAAGATCAACTTCTATCATCC	TTATGTATAGCAGCATTAGTAATAACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
MH181982.1.HRSVA	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACACTCAACAAGATCAACTTCTATCATCC	TTATGTATAGCAGCATTAGTAATAACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
PP525326.1.HRSVA	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACACTCAACAAGATCAACTTCTATCATCC	TTATGTATAGCAGCATTAGTAATAACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
KY654517.1.HRSVA	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT	TGAATGATACACTCAACAAGATCAACTTCTATCATCC	TTATGTATAGCAGCATTAGTAATAACCAAAATTAGCA	TCAGGAGATAGATCAGG
	*****	*****	*****	*****

Figura 11. AMS del gen N de los genotipos A y B del VSR. Resaltado en azul y verde se muestran las secuencias de reconocimiento de los primers diseñados.

### ✓ Gen L del virus de la parainfluenza humana 1-4

La detección molecular de los virus de la parainfluenza humana (VPIH) presentó un desafío único al que no se enfrentó en otros patógenos del panel. A diferencia de un grupo viral homogéneo, los cuatro serotipos de VPIH pertenecen a dos géneros distintos dentro de la familia *Paramyxoviridae*: VPIH-1 y VPIH-3 son miembros del género *Respirovirus*, mientras que VPIH-2 y VPIH-4 pertenecen al género *Orthorubulavirus* (Branche & Falsey, 2016). Esta divergencia genética ocasionó que el objetivo inicial de diseñar un único par de primers universales para los cuatro serotipos fuera inviable, tal como se confirmó en los AMS realizados.

Ante este problema, la estrategia se definió hacia un enfoque por género, buscando regiones conservadas dentro del genoma que permitieran una detección confiable. El gen *L*, que codifica para la *ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp)*, fue seleccionado como el principal objetivo.

Para los VPIH-1 y 3, se logró identificar una zona común altamente conservada dentro del gen *L*. Sin embargo, para abarcar la variabilidad nucleotídica existente entre ambas especies, fue necesario el diseño de primers degenerados, incorporando una base degenerada en el primer sentido y dos en el antisentido (Figura 12). El uso de primers degenerados es una herramienta muy útil para aumentar la inclusividad en un ensayo de PCR, pero no está exento de consecuencias. La degeneración crea una población mixta de primers en la reacción, lo que efectivamente reduce la concentración de la secuencia perfectamente complementaria a la diana. Esto puede, en algunos casos, disminuir la sensibilidad analítica

o la eficiencia de la PCR y aumentar el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Sin embargo, su uso en este diseño se justificó como una solución necesaria para la lograr la detección de ambos virus con un solo par de *primers*.

Sorprendentemente, para los VPIH-2 y 4, a pesar de pertenecer al mismo género, no se encontró una región común en el gen *L* que cumpliera con los estrictos criterios de diseño de un par de *primers* degenerados sin comprometer el rendimiento del ensayo. En consecuencia, se optó por la estrategia más específica: el diseño de dos pares de *primers* distintos y específicos para cada uno de estos virus (Figuras 13 y 14).

El resultado final fue una combinación de tres pares de *primers* que, en conjunto, pueden detectar los cuatro serotipos de VPIH. Es importante señalar que los amplicones generados, con tamaños de 569 pb y 574 pb, no son diferenciables en una EGA estándar. Sin embargo, esta aparente limitación es irrelevante en el contexto del objetivo de la prueba. El fin de este panel molecular es diagnóstico y no epidemiológico. Para el manejo clínico del paciente, la identificación de VPIH positivo es suficiente, además no existe un tratamiento específico para combatir la infección ocasionada por este patógeno, por lo cual solo se maneja un tratamiento sintomático, el cual es indiferente al serotipo (Branche & Falsey, 2016; Elboukari & Ashraf, 2023).



**Figura 12.** AMS del del gen *L* del virus de la parainfluenza humana 1 y 3. Resaltado en azul/amarillo y verde/rojo se muestran las secuencias de reconocimiento de los primers diseñados. Nótese la degeneración en una base del primer sentido y de 2 bases en el primer antisentido.

	Primer sentido	Primer Antisentido
MH006627.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MH006623.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MF077311.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MK167024.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MK167025.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MG773274.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MF077313.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MK167022.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MK167026.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
KY986645.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
KY674972.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
KY986646.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
KY674948.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MG836419.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MG836416.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MG836417.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MN369034.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MH892406.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC
MF077312.1.PIV-2	TTATGGCTTACAATTAATACCAAAATGCGACAACCTATAATGCATCAAAGTTCTCGTCAG	CGCAAGCTCAGGTAAGTGAAGAGAAATCATGTGTGCAGGTAAGTTGCTTGATTTCCC

**Figura 13.** AMS del gen L del virus de la parainfluenza humana 2. Resaltado en azul y verde se muestran las secuencias de reconocimiento de los primers diseñados.

	Primer sentido	Primer antisentido
MN369047.1.PIV-4	TTATATTTAGCTGAAGGTAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCGGG	GTGTATTTAATTTGCAAAAGATCGGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
MT118674.1.PIV-4	TTATATTTAGCTGAAGGTAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCGGG	GTGTATTTAATTTGCAAAAGATCGGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
MN369027.1.PIV-4	TTATATTTAGCTGAAGGTAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCGGG	GTGTATTTAATTTGCAAAAGATCGGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
MN369032.1.PIV-4	TTATATTTAGCTGAAGGTAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCGGG	GTGTATTTAATTTGCAAAAGATCGGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
MT118676.1.PIV-4	TTATATTTAGCTGAAGGTAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCGGG	GTGTATTTAATTTGCAAAAGATCGGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
MN369038.1.PIV-4	TTATATTTAGCTGAAGGTAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCGGG	GTGTATTTAATTTGCAAAAGATCGGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
MN369033.1.PIV-4	TTATATTTAGCTGAAGGTAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCGGG	GTGTATTTAATTTGCAAAAGATCGGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
MT118684.1.PIV-4	TTATATTTAGCTGAAGGTAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCGGG	GTGTATTTAATTTGCAAAAGATCGGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
MT118682.1.PIV-4	TTATATTTAGCTGAAGGTAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCGGG	GTGTATTTAATTTGCAAAAGATCGGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
MT118679.1.PIV-4	TTATATTTAGCTGAAGGTAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCGGG	GTGTATTTAATTTGCAAAAGATCGGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
KF908238.1.PIV-4	TTATACTTAGCTGAAGGCAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCTGGA	GTTTATCTAGTTTGCAGAAAGATCAGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
MN369032.1.PIV-4	TTATACTTAGCTGAAGGCAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCTGGA	GTTTATCTAGTTTGCAGAAAGATCAGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
MT118680.1.PIV-4	TTATACTTAGCTGAAGGCAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCTGGA	GTTTATCTAGTTTGCAGAAAGATCAGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
KY629773.1.PIV-4	TTATACTTAGCTGAAGGCAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCTGGA	GTTTATCTAGTTTGCAGAAAGATCAGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA
KY645962.1.PIV-4	TTATACTTAGCTGAAGGCAATGGTGTCTTCTATGACATTGATAGAAAACTTTTATCCCTGGA	GTTTATCTAGTTTGCAGAAAGATCAGAGATGTCGTGTTCTCGACTTGAAGAATGCTATA

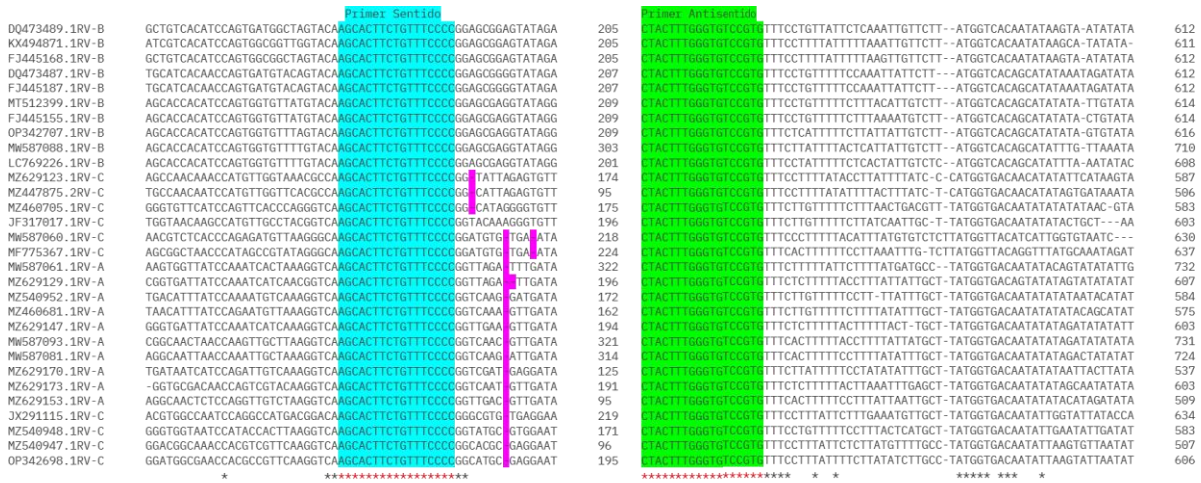
**Figura 14.** AMS del gen L del virus de la parainfluenza humana 4. Resaltado en azul y verde se muestran las secuencias de reconocimiento de los primers diseñados.

✓ **Región 5'UTR de los rinovirus y enterovirus**

La selección de un biomarcador para la detección de RV y EV presentó un desafío importante. La región genómica más conservada, y por lo tanto más atractiva para el diagnóstico, es también la fuente de mayor desafío de especificidad. Ambas especies, exhiben una gran similitud genómica (Fall et al., 2016), especialmente en la *región no codificante 5' (5'UTR)*. Esta región contiene el sitio interno de entrada al ribosoma (*IRES*), una estructura de ARN secundaria compleja y esencial para la iniciación de la traducción viral (Zell et al., 2017), además es un blanco por excelencia por lograr ensayos con alta sensibilidad (Silva et al., 2012), sin embargo, también es la región problema de la diferenciación.

A pesar de su naturaleza conservada, el análisis de los AMS de la *región 5'UTR* de los rinovirus reveló un fenómeno de hipervariabilidad genética, manifestada por la presencia de múltiples inserciones y eliminaciones (indels) (Figura 15). Este hallazgo es una característica bien documentada de la evolución de los picornavirus, ya que la *región 5'UTR* es un punto de recombinación genética (Bouزيد et al., 2022; Jiang et al., 2022). Como

consecuencia directa de estos indels, los amplicones generados presentaron una ligera variabilidad de tamaño (386-395 pb), la cual no comprometió la identificación de una bien diferenciada de los amplicones generados por la detección de los otros patógenos. El logro más significativo fue que a pesar de la variabilidad genética, fue posible diseñar dos *primers* universales capaces de reconocer de manera inclusiva las tres especies de RV (A, B y C).



**Figura 15.** AMS de la región 5'UTR de las especies B, C y E de rinovirus. Resaltado en azul y verde se muestran las secuencias de reconocimiento de los primers diseñados y en rosa se ubican zonas de variabilidad genética

El enfoque para EV se centró específicamente en EV-D68, dada su importancia como patógeno emergente asociado a enfermedad respiratoria grave. El diseño de *primers* dirigidos a su región 5'UTR fue exitoso (Figura 16), confirmando una alta especificidad sin reactividad cruzada con secuencias de RV.



**Figura 16.** AMS de la región 5'UTR de enterovirus-D68. Resaltado en azul y verde se muestran las secuencias de reconocimiento de los primers diseñados.

Sin embargo, el escenario contrario no fue así, los *primers* universales para RV sí mostraron hibridación cruzada con otras especies de enterovirus. Este hallazgo no es falla del diseño, si no la confirmación de un problema ampliamente conocido. La hibridación cruzada de iniciadores para la detección molecular entre RV y EV no es infrecuente (Andrés et al., 2019; Jansen et al., 2011; Lu et al., 2008). De hecho, es tan prevalente que muchos paneles comerciales no los diferencian y reportan un resultado combinado “rinovirus/enterovirus” (BioMérieux México, 2024; Leber et al., 2018; Marcone et al., 2015). La literatura científica incluso sugiere que la distinción absoluta entre las dos especies utilizando esta región puede ser un objetivo inalcanzable precisamente por la continua recombinación genética (Nikolaidis et al., 2019; Tapparel et al., 2009).

Considerando esta realidad biológica, el desempeño esperado por el panel logra dos objetivos:

1. Detecta de manera inclusiva las tres especies de RV, que es el agente causal más común del resfriado
2. Identifica específicamente el EV-D68, un patógeno de alta relevancia clínica

Aunque el ensayo de RV puede potencialmente detectar otros enterovirus no D68, esta limitación es compartida por la mayoría de las pruebas moleculares actuales. La ventaja de este panel reside en su capacidad de discriminar positivamente al patógeno que representa la amenaza más grave (EV-D68) del resto del complejo RV/EV.

#### ✓ **Gen *mpn372* de *M. pneumoniae***

Para la identificación molecular de *M. pneumoniae*, se han descrito varias dianas genómicas, incluyendo el gen de la *Adhesina PI* y el gen de la *ATPasa* (Leal et al., 2020; Muir et al., 2011; Thurman et al., 2011; Winchell et al., 2008). Si bien estos son blancos comunes, la elección del biomarcador para esta prueba se dirigió por un gen que no solo permite la identificación, sino que también está directamente ligado a la patogénesis de la enfermedad: el gen *mpn372* (Figura 17), que codifica para la *Toxina CARDS* (del inglés, Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome toxin). La ventaja más importante de este gen es su exclusividad en la especie, ya que se demostró que este gen se encuentra única y exclusivamente en el genoma de *M. pneumoniae*, estando ausente en otras especies

comensales o patógenas del género *Mycoplasma* que pueden colonizar el tracto respiratorio (Muir et al., 2011; Winchell et al., 2008). Esta característica es fundamental, ya que garantiza una especificidad analítica, y elimina el riesgo de resultados falsos positivos por reactividad cruzada.

Por otro lado, su sensibilidad diagnóstica es superior. Diversos estudios han informado que las pruebas moleculares dirigidas al gen *mpn372* son más sensibles en muestras clínicas en comparación con ensayos que apuntan a blancos más tradicionales como el gen de la *citoadhesina PI* (Muir et al., 2011; Winchell et al., 2008). Esto puede deberse a que la expresión de este gen se regula positivamente y aumenta de manera sustancial una vez que la bacteria establece una infección en el huésped (Ramasamy et al., 2021). Esto implica que, en una infección activa, el número de transcritos de ARNm del gen *mpn372* es probablemente mucho mayor que el de otros genes.



**Figura 17.** AMS del gen *mpn372* de *M. pneumoniae*. Resaltado en azul y verde se muestran las secuencias de reconocimiento de los primers.

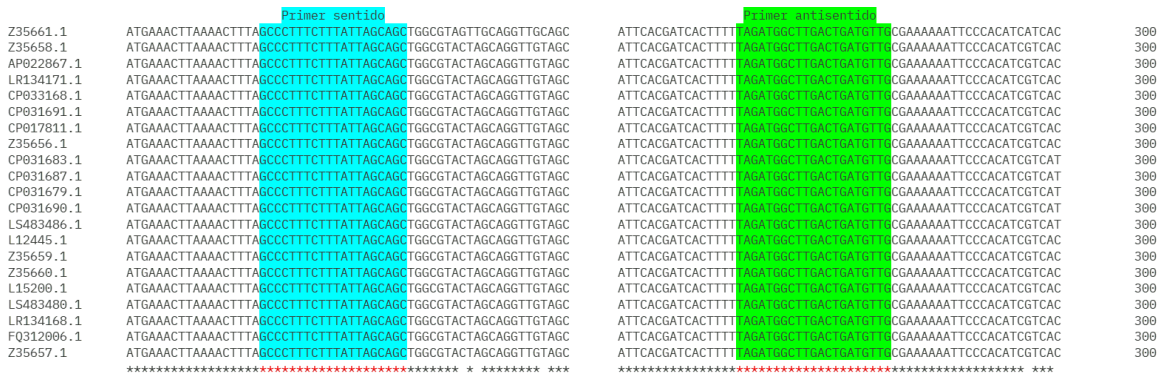
✓ **Gen *hpd* de *H. influenzae***

La identificación precisa de *H. influenzae* representó un desafío complejo debido a que este patógeno existe como seis serotipos encapsulados (a-f), incluido el históricamente relevante tipo b (Hib), y de manera predominante en la era post-vacunal, como cepas no tipificables (NTHi). Por lo tanto, para diseñar un ensayo molecular suficientemente inclusivo se debió identificar un gen presente en el amplio espectro de serotipos. La selección del gen *hpd*, que codifica para la *lipoproteína de superficie Proteína D*, se basó en la evidencia contundente que lo posiciona como el biomarcador molecular estándar de oro.

Múltiples blancos se han utilizado para la identificación molecular de *H. influenzae* incluidos los genes *bexA*, *ompP2*, *ompP6*, *licA*, *fuckK*, *sodC* (Pickering et al., 2014). Sin embargo, de todos ellos el gen *hpd* es el que presenta mayor rendimiento diagnóstico tanto en valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica que son consistentemente superiores a las de los otros blancos moleculares investigados (Diallo et al., 2021; Pickering et al., 2014) y además se encuentra altamente conservado y presente tanto en los serotipos capsulados como en los serotipos no capsulados (Castillo et al., 2011). Quizás la ventaja más poderosa del gen *hpd* es su capacidad para diferenciar entre NTHi y *H. haemolyticus*, esta última especie comensal del trato respiratorio que comparte una homología genética tan alta con los NTHi que a menudo es indistinguible mediante métodos convencionales, llevando a diagnósticos erróneos. La estrategia más aceptada para resolver esta ambigüedad es la detección del gen *hpd*, ya que está consistentemente ausente en el genoma de *H. haemolyticus* (Hu et al., 2016; Pickering et al., 2014).

Sin embargo, es importante abordar que esta diferenciación no está exenta de debate. Diversos estudios han evaluado los blancos moleculares más prometedores (incluyendo el gen *hpd*) para la diferenciación confiable de estas dos especies. Sin embargo, los hallazgos concluyeron que ningún objetivo genético único podía diferenciar de manera absoluta y completa entre NTHi y *H. hemolyticus*, debido a la presencia de cepas atípicas. A pesar de estos datos, los mismos estudios concluyen que el ensayo molecular dirigido al gen *hpd* fue el método con los resultados más fiables entre todos los evaluados para distinguir a estas especies tan estrechamente relacionadas (Diallo et al., 2021; Hu et al., 2016; Pickering et al., 2014).

Por lo tanto, aunque la especificidad del 100% en todos los escenarios posibles sigue siendo un desafío, la evidencia científica posicionan al gen *hpd* como la opción más confiable disponible en comparación con los resultados de otros marcadores y cuyos resultados no pueden igualarse.



**Figura 18.** AMS del gen *hpd* de *H. influenzae*. Resaltado en azul y verde se muestran las secuencias de reconocimiento de los primers

✓ **Gen *spy1258* de *S. pyogenes***

La identificación molecular de *S. pyogenes* requiere un nivel de especificidad muy alto dado que el género *Streptococcus* es amplio y complejo, e incluye tanto a especies comensales como patógenos oportunistas que comparten una considerable homología genética. Históricamente, el diagnóstico molecular de *S. pyogenes* se ha basado en la detección de genes de virulencia bien conocidos, como *dnaseB* (*DNasa B*), *speB* (*exotoxina pirogénica B*) o *sof* (*proteína de unión a fibronectina*) (Dunne et al., 2013; Kumar et al., 2011; Slinger et al., 2011). Sin embargo, la fiabilidad de estos marcadores ha sido cuestionada. Se ha demostrado que algunos de estos genes, particularmente *speB*, no son exclusivos de *S. pyogenes* y pueden estar presentes en otras especies de estreptococos (Abraham & Sistla, 2016).

Para superar esta limitación, la selección del biomarcador se centró en un blanco molecular cuya principal fortaleza es su absoluta especificidad de especie: el gen *spy1258*. Este gen, que codifica para un *regulador transcripcional hipotético de la familia TetR/AcrR*, fue descrito por primera vez por Liu et al. (2005) como un marcador presente única y exclusivamente en el genoma de *S. pyogenes*. La función de este gen, ligada a la regulación de procesos celulares fundamentales, probablemente impone una fuerte presión evolutiva que ha restringido su transferencia horizontal a otras especies. Diversos estudios han validado empíricamente esta especificidad, observando que los ensayos basados en *spy1258* solo amplifican el ADN de aislados de estreptococos del grupo A (Khalaf et al., 2020).

Nuestros propios análisis *In silico* corroboraron de manera independiente estos hallazgos. Los AMS del gen *spy1258* de diversas cepas de *S. pyogenes* confirmaron que es un gen muy conservado dentro de la especie, lo cual es ideal para el diseño de *primers* universales para este patógeno (Figura 19).

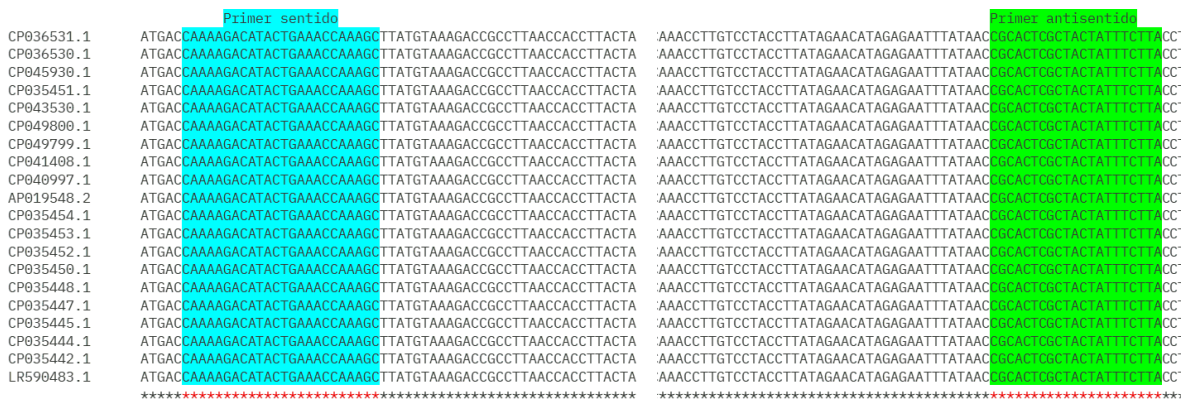


Figura 19. AMS del gen *spy1258* de *S. pyogenes*. Resaltado en azul y verde se muestran las secuencias de reconocimiento de los primers

### ✓ Gen *lytA* de *S. pneumoniae*

La identificación molecular de *S. pneumoniae*, al igual que la identificación de otros patógenos también representó un desafío, no por la detección de la bacteria en sí, sino por su diferenciación de especies comensales estrechamente relacionadas. El neumococo pertenece al grupo mitis del género *Streptococcus*, un conglomerado de especies filogenéticamente muy cercanas representados por múltiples linajes evolutivos con límites que son difíciles de definir (Wyllie et al., 2017). Se han evaluado diversos blancos moleculares a lo largo de los años. Genes como la *permeasa* (*piaB*), la *neumolisina* (*ply*) y la *adhesina* (*psaA*) han sido utilizados, pero estudios comparativos han demostrado que los ensayos basados en estas dianas arrojan valores de especificidad inferiores en comparación con el gen *lytA* (Sanz et al., 2018; Tavares et al., 2019). En este contexto, el gen *lytA*, que codifica para la autolisina principal de la bacteria, se ha consolidado como el biomarcador estándar para la identificación de *S. pneumoniae*. La autolisina es una enzima fundamental responsable de la lisis celular durante la fase estacionaria del crecimiento y liberación de factores de virulencia. La elección de este gen se fundamenta en su presencia ubicua y específica en todos los serotipos capsulares reconocidos, así como en los neumococos no tipificables (NTH), lo que garantiza una alta inclusividad del ensayo (Diallo et al., 2021). Este gen es ampliamente



Para este panel respiratorio, se seleccionó el gen que codifica para la *subunidad beta de la hemoglobina humana (HBB)*. La decisión de usar el gen *HBB* se fundamenta en sus altos niveles de expresión. Según la base de datos de expresión génica The Human Protein Atlas (2025), el gen *HBB* presenta un nivel de expresión en el sistema respiratorio de 3916.5 transcritos normalizados por millón (nTPM). Este valor es notablemente superior al de otros genes housekeeping como *ACTINB* (*Beta Actina/2788.3 nTPM*), *GAPDH* (*Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa/1103.3 nTPM*) y *G6PD* (*Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa/32.2 nTPM*) que también suelen ser utilizados como controles positivos. Por lo tanto, la incorporación del gen *HBB* se basa en la evidencia cuantitativa de su alta expresión, garantizando un control de calidad confiable, que minimizando el riesgo de reportar falsos negativos y aumentando la confianza en los resultados del diagnóstico.

Finalmente, en la Tabla 5, se resumen los criterios de selección para los biomarcadores seleccionados en el diseño del panel molecular. En algunos casos se puede ver la concordancia entre el alto rendimiento diagnóstico y el grado de conservación (% de identidad), en otros casos donde se determinó una baja fiabilidad de los blancos reportados en la literatura, se optó por proponer nuevos blancos moleculares donde se determinó que su alto grado de conservación permitió la identificación de variantes, genotipos, subtipos, especies de los patógenos detectados por el panel.

*Tabla 5. Resumen de los criterios de selección para los biomarcadores de identificación del panel molecular*

Agente etiológico	Biomarcador	% Sensibilidad	% Especificidad	% de identidad	Referencia
AdV	<i>L2</i>	No reportado	No reportado	69.60 - 100	Este trabajo
SARS-CoV-2	<i>M</i>	No reportado	No reportado	98.80-100	Este trabajo
VIA	<i>M</i>	85	98.9	84.98 - 100	Stellrecht et al., 2017
<i>M. pneumoniae</i>	<i>mpn372</i>	No reportado	No reportado	99.77 - 100	Este trabajo
MPVH	<i>F</i>	97	99	82.84 - 100	Feregrino et al., 2013
<i>H. influenzae</i>	<i>hpd</i>	90.91	100	95.25 - 100	Reddington et al., 2015
<i>S. pyogenes</i>	<i>spy1258</i>	100	100	99.26 - 100	Tintu & Sujatha, 2016
VIB	<i>M</i>	No reportado	No reportado	91.43 - 100	Este trabajo
RV	<i>Region 5' UTR</i>	82.9	93.4	52.50 - 100	Wright et al., 2007
EV-D68	<i>Region 5' UTR</i>	93.6	96.8	91.76 - 100	Chiang et al., 2012
<i>S. pneumoniae</i>	<i>lytA</i>	100	99.5	97.49 - 100	Tavares et al, 2019
VSR	<i>N</i>	82	100	85.20 - 100	Do et al., 2012
VPIH 1 y 3	<i>L</i>	No reportado	No reportado	63.13 - 99.94	Este trabajo
VPIH 2	<i>L</i>	No reportado	No reportado	95.61 - 99.96	Este trabajo
VPIH 4	<i>L</i>	No reportado	No reportado	89.69 - 100	Este trabajo

### 9.3 Diseño de *primers*

Una parte fundamental para el éxito de un ensayo de amplificación y en especial de una PCR múltiple recae en el diseño estricto de los *primers* (Bustin & Huggett, 2017). El requisito más crítico para este tipo de prueba implica que todos los *primers* se acoplen a la misma temperatura de alineamiento y para lograr esto es necesario que durante su diseño, todo el conjunto de cebadores presente una temperatura de fusión muy cercana. La Tabla 6 resume las características fisicoquímicas de los *primers* diseñados, siguiendo las recomendaciones de Green y Sambrook (2019) y Markoulatos y colaboradores (2002), donde se establece que la  $T_m$  de todo el conjunto de cebadores en una reacción múltiple no debe diferir en más de 2 °C con el fin de garantizar que durante la fase de alineamiento se hibriden a su secuencia diana con una estabilidad y cinética similares. Por otra parte, dado que el método de detección propuesto es una PCR de punto final, el tamaño de los amplicones juega un papel importante, por lo tanto, durante el diseño se generaron amplicones con una diferencia de al menos 20 pb garantizando una resolución adecuada de las bandas en una EGA. Una diferencia menor podría llevar a la superposición de las bandas, con interpretaciones confusas, especialmente en el rango de fragmentos de bajo peso molecular donde la resolución del gel puede ser menor.

**Tabla 66.** Características fisicoquímicas de los *primers* diseñados para el panel de identificación molecular

Agente etiológico	<i>Primers</i> 5'→3'	Tamaño nt	$T_m$ °C	%GC	$\Delta G$ (kcal/mol)	Tamaño Amplicón	Blanco molecular
Adenovirus	F-Sentido	18	57.6	55.6	-38.0	79	L2
	R-Antisentido	17	58.2	58.8	-35.6		
Subunidad beta de la hemoglobina humana	F-Sentido	20	58.6	45.0	-38.8	100	HBB
	R-Antisentido	20	57.9	50.0	-37.4		
SARS-CoV-2	F-Sentido	24	56.0	37.5	-40.2	120	M
	R-Antisentido	19	57.8	52.6	-38.0		
Virus de la influenza A	F-Sentido	20	57.3	45.0	-38.2	148	M
	R-Antisentido	21	56.8	42.9	-39.4		
<i>M. pneumoniae</i>	F-Sentido	19	57.8	47.4	-38.1	180	mpn372
	R-Antisentido	19	57.8	47.4	-36.8		
Metapneumovirus humano	F-Sentido	19	57.6	52.6	-37.7	226	F
	R-Antisentido	19	57.5	47.4	-38.0		
<i>H. influenzae</i>	F-Sentido	20	56.7	45.0	-36.7	259	hpd
	R-Antisentido	21	56.3	42.9	-39.4		
<i>S. pyogenes</i>	F-Sentido	24	56.0	38.0	-41.3	309	spy1258
	R-Antisentido	21	56.2	42.9	-37.4		
Virus de la influenza B	F-Sentido	20	56.2	45.0	-37.5	344	M
	R-Antisentido	21	57.8	47.6	-39.2		
Rinovirus	F-Sentido	17	56.1	52.9	-34.3	386-395	Región 5'UTR
	R-Antisentido	18	56.9	55.6	-35.4		

Enterovirus D68	F-Sentido	19	56.6	47.4	-36.3	440	Región 5'UTR
	R-Antisentido	18	56.2	55.6	-35.6		
<i>S. pneumoniae</i>	F-Sentido	18	58.1	55.6	-36.8	476	lytA
	R-Antisentido	18	57.4	55.6	-36.2		
Virus sincitial respiratorio	F-Sentido	20	57.0	45.0	-37.6	532	N
	R-Antisentido	18	56.2	50.0	-36.0		
Virus de la parainfluenza humana 1 y 3	F-Sentido	20	56	47.5	-38.1	570	L
	R-Antisentido	19	57.8	50	-38.5		
Virus de la parainfluenza humana 2	F-Sentido	20	57.2	50.0	-39.0	574	L
	R-Antisentido	21	56.6	42.9	-39.2		
Virus de la parainfluenza humana 4	F-Sentido	21	56.5	42.9	-39.9	569	L
	R-Antisentido	21	56.8	42.9	-39.4		

## 9.4 Análisis de estructuras secundarias

Todos los *primers* fueron analizados mediante el software Oligo Analyzer 1.5 para predecir y minimizar la probabilidad de formar estructuras secundarias intramoleculares (horquillas) o intermoleculares (homodímeros y heterodímeros). Estas estructuras no deseadas pueden reducir el rendimiento de la prueba al impedir su unión a la secuencia diana y competir por la DNA polimerasa, así como por los dNTPs generando la amplificación de artefactos conocidos como dímeros de *primers*. Mas adelante, en la etapa de validación, al hacer el análisis de los geles de agarosa, se logró observar solo la amplificación de las bandas de los blancos esperados, por lo que la “limpieza” de estas reacciones sugiere que este análisis se cumplió con éxito.

<b>F-S. pyogenes</b>	<b>R-S. pyogenes</b>	<b>R-S. pyogenes - F-S. pyogenes annealing:</b>
Name : F-S. pyogenes	Name : R-S. pyogenes	5'-TAAGAAATAGTAGCGAGTGCG-3'
Primer : 5'-CAAAGACATACTGAAACCAAAGC-3'	Primer : 5'-TAAGAAATAGTAGCGAGTGCG-3'	: :      : :
Reverse : 3'-CGAAACCAAGTCATACAGAAAAC-5'	Reverse : 3'-GCGTAGCGATGATAAAGRAAT-5'	3'-CGAAACCAAGTCATACAGAAAAC-5'
Length : 24 nt	Length : 21 nt	dG: -2.42 kcal/mol
Tm (basic) : 66.0 °C	Tm (basic) : 60.0 °C	5'-TAAGAAATAGTAGCGAGTGCG-3'
Tm (salt) : 60.1 °C	Tm (salt) : 57.4 °C	: :     :
Tm (NN) : 56.3 °C	Tm (NN) : 56.5 °C	3'-CGAAACCAAGTCATACAGAAAAC-5'
GC % : 37.5 %	GC % : 42.9 %	dG: -1.05 kcal/mol
dG : -41.3 kCal/mol	dG : -37.4 kCal/mol	
3'-tail GC % : 57.1 %	3'-tail GC % : 71.4 %	
3'-tail dG : -10.3 kCal/mol	3'-tail dG : -12.1 kCal/mol	
Molecular weight : 7402.8 g/mol	Molecular weight : 6605.3 g/mol	
1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 3.42 µM and contains 25.3 µg ssDNA	1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 3.95 µM and contains 26.1 µg ssDNA	
<b>F-S. pyogenes self annealing:</b>	<b>R-S. pyogenes self annealing:</b>	
None!	None!	
<b>F-S. pyogenes loops:</b>	<b>R-S. pyogenes loops:</b>	
None!	None!	

Figura 21. Análisis de estructuras secundarias de los primers sentido (F) y antisentido (R) de *S. pyogenes*

En la Figura 21 se muestra el análisis realizado al conjunto de *primers* para la identificación de *S. pyogenes*, si bien cada *primer* individual no presentan la formación de horquillas y homodímeros, se si puede observar la formación de heterodímeros, sin embargo, la dG de formación es mayor a -9 kcal/mol, lo que no implica mayor problema para la eficiencia de la PCR (Integrated DNA Technologies, 2024; ResearchGate, 2017).

## 9.5 Análisis de especificidad *In silico*

La especificidad es la capacidad de un *primer* para hibridarse exclusivamente a su secuencia diana. Previo a su síntesis, cada secuencia candidata a *primer* fue sometida a un análisis de especificidad *In silico* mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) contra bases de datos del GenBank del NCBI.

Los resultados de este análisis confirmaron que no existía reactividad cruzada significativa con:

- El genoma humano lo cual implica la no generación de amplificaciones inespecíficas de fondo con secuencias genéticas de la propia muestra
- Genomas de otros microorganismos comensales o patógenos del tracto respiratorio no incluidos en el panel
- Genomas entre los propios patógenos incluidos en el panel
- Otras regiones dentro del genoma del propio patógeno diana.

Esta validación bioinformática minimizó el riesgo de reactividad cruzada y la generación de amplicones inespecíficos, un asunto que puede ocasionar problemas en las reacciones de PCR múltiples.

## 9.6 Desarrollo de la fase húmeda

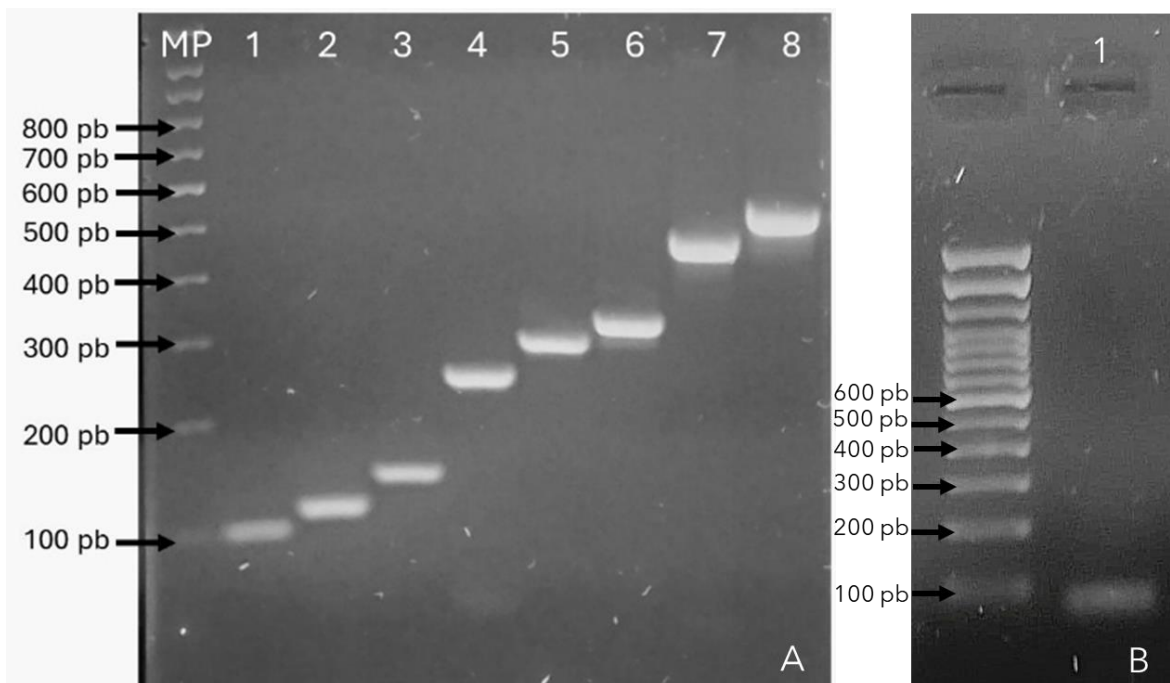
### 9.6.1 Validación del funcionamiento de los *primers* en amplificaciones individuales

El objetivo de la validación fue corroborar que los *primers* diseñados amplificaran exclusivamente su secuencia diana, generando un producto de PCR del tamaño esperado. Se emplearon cepas de referencia ATCC para los patógenos bacterianos, cultivos celulares infectados para los virus y células HeLa para el control interno. Con lo anterior se buscó minimizar la variabilidad y asegurar la identidad del material genético de partida. Los

resultados de la EGA se presentan en la Figura 22 y mostraron la presencia de bandas únicas y nítidas para cada una de las dianas, cuyo tamaño correspondió con la predicción del diseño *In silico*:

- ✓ Patógenos virales: Se obtuvieron amplicones de 79 pb para AdV, 120 pb para SARS-CoV-2, 148 pb para VIA, 344 pb para VIB y 532 pb para el VSR.
- ✓ Patógenos bacterianos: Se generaron productos de amplificación de 259 pb para *H. influenzae*, 309 pb para *S. pyogenes*, y 476 pb para *S. pneumoniae*.
- ✓ Control positivo interno: Se amplificó un fragmento de 100 pb para el gen de *Subunidad Beta de la Hemoglobina Humana*.

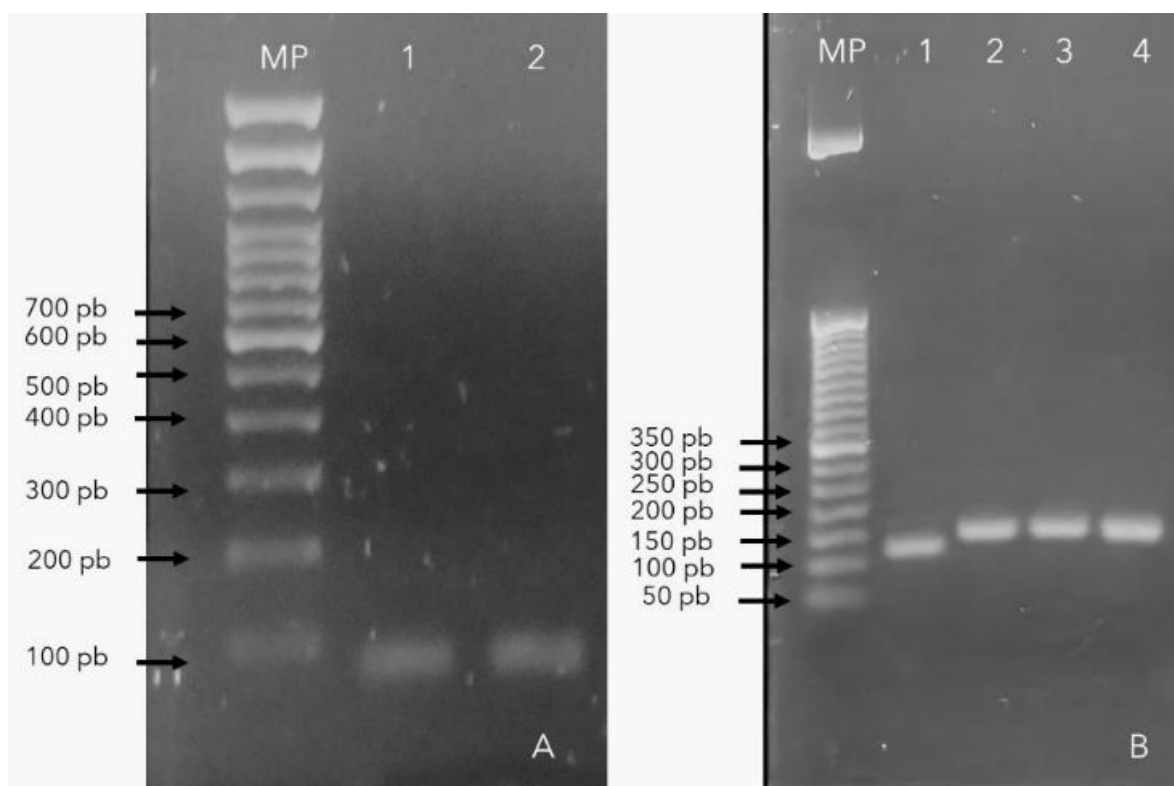
La concordancia entre el tamaño del amplicón predicho y el observado experimentalmente es la primera evidencia de que los *primers* hibridan específicamente en los sitios correctos de la secuencia diana y no generan amplificaciones inespecíficas, además se puede determinar que las condiciones de hibridación y en general del protocolo de amplificación fueron óptimas.



**Figura 22.** Validación del funcionamiento de los primers A) MP (Marcador de peso molecular) 100 pb, Carriles: 1; *Betaglobina* 100 pb, 2; SARS-CoV-2 120 pb, 3; VIA 148 pb, 4; *H. influenzae* 259 pb, 5; *S. pyogenes* 309 pb, 6; VIB 344 pb, 7; *S. pneumoniae* 476 pb, 8; VSR 532 pb. B) MP 100 pb, Carril: 1; AdV 79 pb. EGA 2.5%

### 9.6.2 Validación del funcionamiento de los primers en diferentes especies y subtipos de un mismo patógeno respiratorio

Como se mencionó en secciones anteriores, la estrategia del diseño del panel molecular se centró en la identificación de regiones altamente conservadas dentro del genoma de cada diana, ya que uno de los desafíos en el diagnóstico molecular es la elevada variabilidad genética de muchos patógenos, especialmente los virus de ARN. La validación experimental confirmó el éxito de esta estrategia, especialmente en los casos de AdV y VIA. Los resultados experimentales confirmaron la amplificación exitosa del gen *I2* (una región altamente conservada entre los adenovirus respiratorios) de las especies B y C, lo cual se alinea con la predicción *In silico* (Figura 23A). La ausencia de validación para la especie E no implicó un fallo en el diseño, si no una limitación por la no disponibilidad de una muestra de referencia en el laboratorio. Por otra parte, para VIA, el diseño y validación de los primeros permitió la amplificación exitosa de una región altamente conservada del gen *M* para los subtipos de mayor circulación e importancia epidemiológica: HINI estacional, H3N2 y HINIpdm09 (Figura 23B).



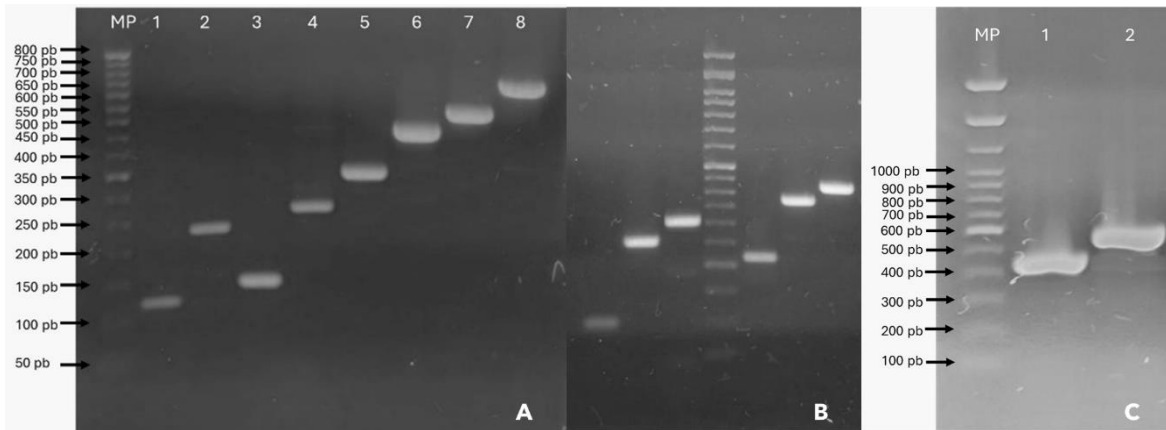
**Figura 23.** Detección de especies de Adenovirus y subtipos de VIA. A) MP 100 pb; Carriles 1: AdV especie B (79 pb); 2: AdV especie C (79 pb) B) MP 50 pb; Carriles 1: SARS-CoV-2 (120 pb); 2: VIA HINIpdm (148 pb); VIA HINI (148 pb); 4: influenza H3N2 (148 pb). EGA 2.5%

El mismo criterio fue aplicado a los demás patógenos incluidos en la detección del panel, aunque la validación experimental contra los múltiples serotipos, genotipos o variantes aún queda pendiente de realizar, la evidencia exitosa demostrada en AdV y VIA proporcionan una sólida prueba para esperar resultados muy similares.

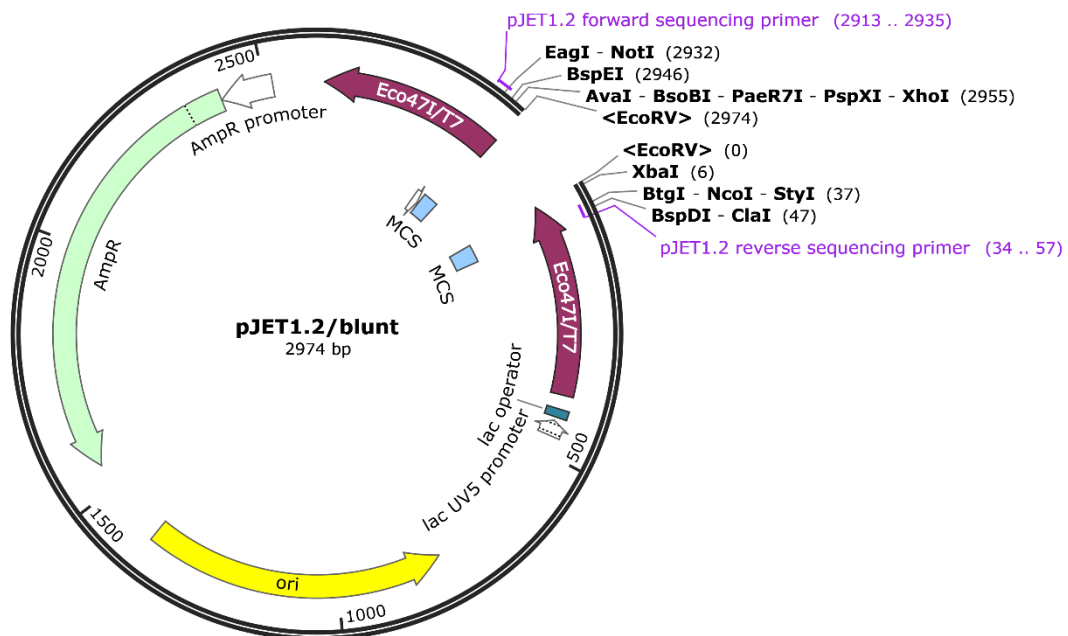
### **9.6.3 Construcción de controles positivos para cada blanco**

La creación de controles artificiales sintéticos para una variedad de ensayos de detección microbiana es una alternativa al uso de controles positivos *In vivo*. Los controles sintéticos basados en construcciones de plásmidos que albergan un inserto personalizado permiten mejorar la bioseguridad (existen riesgos bien documentados asociados con la manipulación o el envío de controles de muestras infectadas, en particular las que llevan microorganismos altamente patógenos), la velocidad de procesamiento y la detección general sin comprometer la sensibilidad y especificidad de la PCR (Caasi et al., 2013). Para superar las limitaciones del uso del material genómico, se procedió a la construcción de controles positivos individuales para cada uno de los nueve biomarcadores. La elección de este sistema de clonación radica en su alta eficiencia (>99% de clones recombinantes), la cual deriva del uso de estrategias de selección positiva. El vector pJET1.2 (Figura 25) emplea un gen letal que es interrumpido por la inserción del producto de PCR, asegurando que solo las colonias bacterianas que portan el plásmido recombinante puedan sobrevivir. La propagación en una cepa estándar como *E. coli* Top 10 asegura un alto rendimiento en la producción de ADN plasmídico (Thermo Fisher Scientific, 2025). La fase de caracterización inició con una PCR de colonia utilizando *primers* específicos de cada patógeno confirmando la presencia del inserto del tamaño correcto. Sin embargo, para validar la integridad del constructo se realizó una segunda PCR con *primers* que franquean el sitio de clonación del vector. La obtención de un amplicón con un tamaño correspondiente a la suma del inserto más 119 pb del vector fue la evidencia concluyente de que el biomarcador se había insertado correctamente (Figura 24). La confirmación definitiva de la identidad de los controles se logró mediante la secuenciación de Sanger, realizada en el Laboratorio de Servicios Genómicos del CINVESTAV, y representa el estándar de oro para la verificación de secuencias. Los resultados confirmaron, para los nueve constructos, una identidad del 100% entre la

secuencia del inserto y las secuencias de referencia de los patógenos depositadas en la base de datos del GENBANK.



**Figura 24.** Caracterización por PCR de clonas candidato con constructo de cada amplicón. **A)** MP (Marcador de peso) 50 pb; carriles nones amplificación con primers propios, carriles pares amplificación con primers pJET1.2; 1 y 2: Amplicones de SARS-CoV-2 (120pb/239pb); 3 y 4: Amplicones de influenza A (148pb/267pb); 5 y 6: Amplicones de influenza B (344pb/463pb); 7 y 8: Amplicones de VSR (532pb/651pb). **B)** MP 100pb; carriles 1,2 y 3 amplificación con primers propios, carriles 4,5 y 6 amplificación con primers pJET1.2; 1 y 4 Amplicones de Betaglobina (100pb/219pb); 2 y 5 Amplicones H. influenzae (259pb/378pb); 3 y 6 Amplicones S. pyogenes (309pb/428pb). **C)** MP 100pb; carril 1 amplificación con primers propios, carril 2 amplificación con primers pJET1.2; 1 y 2 Amplicones de S. pneumoniae (476pb/595pb). EGA 2.5%.



**Figura 25.** 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 que

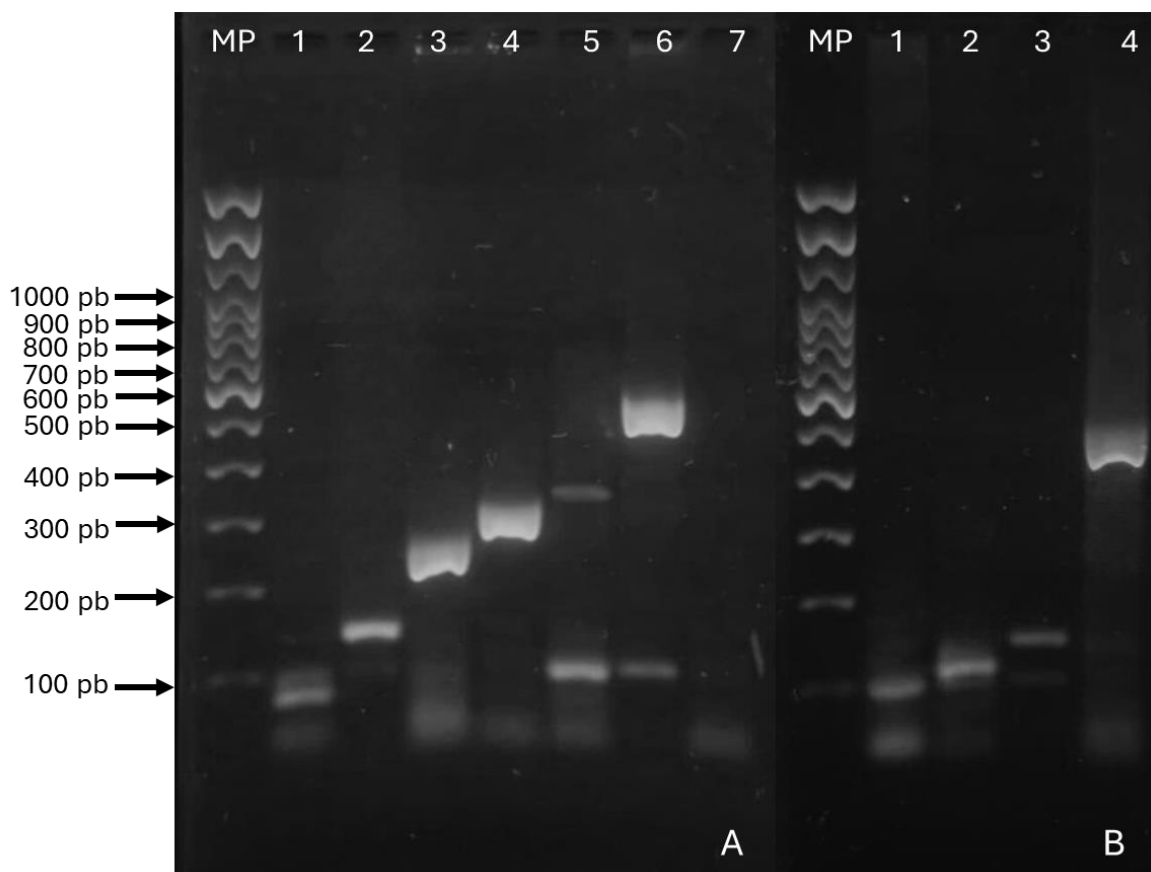
facilitan la inserción del fragmento que será clonado. Además, contiene un gen de resistencia a la ampicilina (*AmpR*) y un promotor de transcripción T7. Adaptado de: pJET1.2 por SnapGene, 2025, [www.snapgene.com/resources](http://www.snapgene.com/resources). Copyright

#### **9.6.4 Validación de la especificidad analítica del panel**

La especificidad analítica es uno de los parámetros que debe determinarse para la validación de cualquier método molecular y se refiere a la capacidad de un ensayo para detectar únicamente la diana prevista y que los resultados no se vean afectados por la reactividad cruzada de ácidos nucleicos relacionados o potencialmente interferentes o por condiciones relacionadas con la muestra, minimizando el riesgo de resultados falsos positivos (Burd, 2010; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2015). En el contexto de un panel multiplex, esta validación debe ser doble: por un lado, confirmar la ausencia de interferencia entre los *primers* con el genoma de los patógenos que son identificados por el panel (reactividad cruzada interna) y, por otro, asegurar que el ensayo no reacciona con otros patógenos o microorganismos no diana que pueden estar presentes en la muestra (reactividad cruzada externa).

##### **9.6.4.1 Validación de la especificidad analítica del panel (reactividad cruzada interna)**

El primer análisis para este ensayo múltiple fue asegurar que el conjunto de los pares de *primers* no interactuaran entre sí ni generaran amplificaciones inespecíficas con otros ácidos nucleicos diana presentes en la reacción. Al evaluar cada uno de los nueve materiales genéticos de referencia en una reacción que contenía el conjunto completo de los 18 *primers*, se observó constantemente la amplificación de una única banda correspondiente al patógeno evaluado. Este resultado, mostrado en la Figura 26 demuestra que no existe hibridación cruzada entre los *primers* y las secuencias de los otros ocho patógenos del panel. Un resultado importante, fue la co-amplificación del control interno de betaglobina junto a su diana viral específica en las reacciones que contenían material genético de cultivos celulares (Por ejemplo, virus de la influenza A). Este resultado esperado no solo confirma la correcta funcionalidad del control endógeno, sino que también demuestra que la amplificación simultánea de dos dianas es posible. La ausencia total de bandas adicionales en el gel confirma la alta fiabilidad y especificidad del conjunto de *primers* diseñados en el entorno de una reacción múltiple.



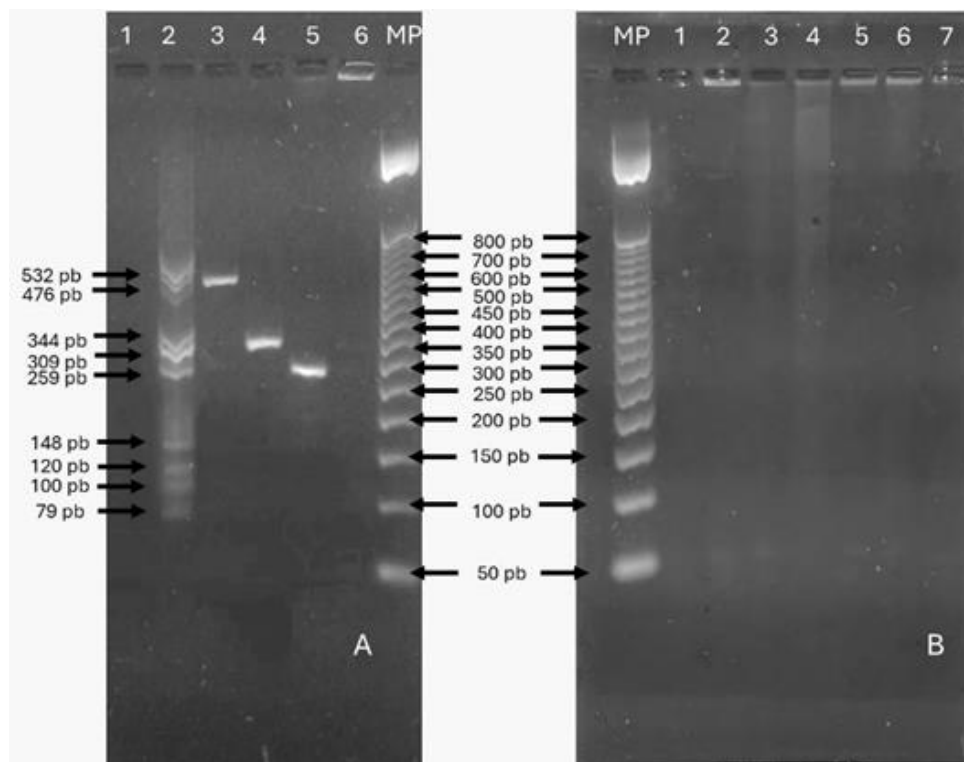
**Figura 26.** Validación de la especificidad analítica del panel de identificación molecular (Reactividad cruzada interna). A) MP (Marcador de peso) 100 pb; Carriles: 1; AdV 79 pb y betaglobina 100 pb, 2; VIA HINI 148 pb y betaglobina 100 pb, 3; *H. influenzae* 259 pb, 4; *S. pyogenes* 309 pb, 5; VIB 344 pb y betaglobina 100 pb, 6; VSR 532 pb y betaglobina 100 pb, 7; Control negativo B) MP 100 pb, Carril: 1; Betaglobina 100 pb, 2; SARS-CoV-2 120 pb y Betaglobina 100 pb, 3; VIA H3N2 148 pb y Betaglobina 100 pb. 4; *S. pneumoniae* 476 pb EGA 2.5%

#### 9.6.4.2 Validación de la especificidad analítica del panel (reactividad cruzada externa)

Un ensayo para identificar agentes infecciosos respiratorios debe ser evaluado frente a un panel de microorganismos filogenéticamente relacionados, patógenos oportunistas o microbiota que habitualmente se encuentra en el tracto respiratorio, ya que estos representan un desafío más realista para la especificidad del ensayo. El conjunto de microorganismos seleccionados para la evaluación de la reactividad cruzada externa incluyó a varios de los agentes más relevantes en el contexto mencionado anteriormente: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*.

Los resultados fueron los esperados, no se observó ninguna señal de amplificación en ninguna de las reacciones que contenían el ADN molde de estos microorganismos diana, la inclusión de controles positivos (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, y *H. influenzae*) que amplificaron correctamente en paralelo, confirma que la ausencia de señal no se debió a un

fallo de la reacción, si no a una falta de reconocimiento de los *primers* a la secuencia de los genomas de estos microorganismos (Figura 27A y 27B).

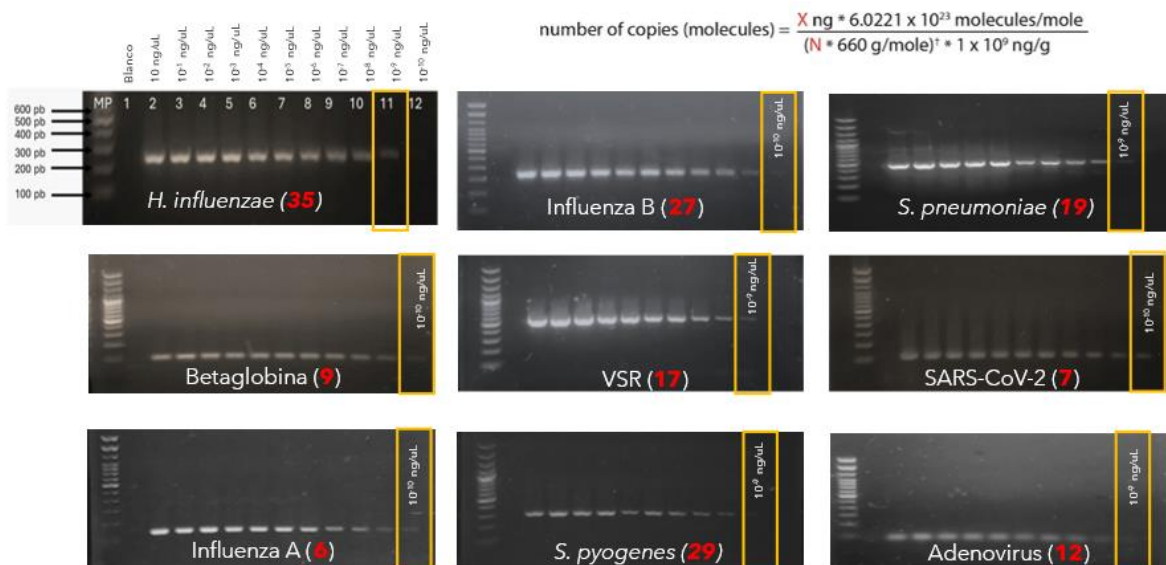


**Figura 27.** Validación de la especificidad analítica del panel de identificación molecular (Reactividad cruzada externa) A) C1: Blanco (Control negativo); C2: Control positivo; C3: *S. pneumoniae* 476 pb; C4: *S. pyogenes* 309 pb; C5: *H. influenzae* 259 pb; C6: *S. aureus*. B) C1: *S. agalactiae*; C2: *E. faecalis*; C3: *E. coli*; C4: *P. aeruginosa*; C5: *K. pneumoniae*; C6: *S. epidermidis*; C7: *S. saprophyticus*. EGA 2.5 %.

Un aspecto destacable de la evaluación de la especificidad analítica es la concordancia entre la predicción bioinformática y la validación experimental. Durante la fase de diseño *In silico*, el análisis de especificidad arrojado por BLAST con las bases de datos genómicas predijo que los *primers* diseñados no poseían sitios de unión secundarios significativos, ni dentro de los genomas diana ni en los genomas de microorganismos con alguna relación taxonómica cercana o pertenecientes a la microbiota del tracto respiratorio, o de aquellos patógenos que no fueron seleccionados en el diseño del panel. Estos resultados demuestran que un análisis *In silico* estricto es una herramienta poderosa y predictiva para minimizar el riesgo de interacciones ni deseadas y asegurar una alta probabilidad de éxito en el desarrollo de ensayos múltiples (Luzius et al., 2025; Singh et al., 2025).

### 9.6.5 Límite de detección (sensibilidad analítica)

La sensibilidad analítica, definida por el límite de detección (LOD), es una de las características de desempeño más importante de un ensayo molecular, ya que establece la mínima cantidad de un analito que puede ser detectada de manera fiable (Burd, 2010). En este análisis se determinó el LOD para cada uno de los 9 biomarcadores, utilizando diluciones seriadas por triplicado de amplicones puros.



**Figura 28.** Determinación por PCR del límite de detección para cada amplicado puro. MP; DNA Ladder 100 pb, Carriles: 1; Blanco, 2; Stock 10 ng/μL, 3-12; Diluciones 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>. Rodeado en amarillo se muestra la última dilución a la que se presentó una banda observable. En rojo se presenta el número de copias detectable por PCR. EGA 2.5%

Este método, aunque representa un escenario ideal, es un paso fundamental para establecer la sensibilidad para cada par de *primers*. Los resultados obtenidos, expresado en número de copias, se muestran en color rojo en la Figura 28. Estos valores, que se sitúan en el rango de 6 a 35 copias por reacción, son indicativos de una muy alta sensibilidad analítica.

La utilidad de estos resultados se manifiesta al comparar el LOD del ensayo con las cargas virales y bacterianas típicamente encontradas en muestras de pacientes sintomáticos. La utilidad de una prueba diagnóstica depende de que su límite de detección sea significativamente más bajo que la concentración del patógeno durante la fase aguda de la enfermedad.

Por ejemplo, se ha informado que para el SARS-CoV-2 las cargas virales medias detectadas en hisopados faríngeos o nasofaríngeos, se encontraron alrededor de  $6.76 \times 10^5$  copias de ARN/ mL (Wölfel et al., 2020). Mientras que, para VIA H1N1pdm, H1N1 y H3N2 las cargas virales por número de copias/mL del gen *M* detectadas en muestras de aspirado nasofaríngeo, hisopado nasal e hisopado faríngeo se ubicaron en;  $3.16 \times 10^7$ ,  $7.94 \times 10^6$ ,  $7.94 \times 10^4$ ;  $3.16 \times 10^8$ ,  $2.5 \times 10^6$ ,  $5.01 \times 10^7$ ;  $1.25 \times 10^8$ ,  $1.58 \times 10^7$ ,  $6.3 \times 10^6$ , respectivamente (Ngaosuwanukul et al., 2010). Los LOD obtenidos en este ensayo para estos virus son inferiores a las cargas virales encontradas en muestras clínicas, lo que sugiere que el panel posee una sensibilidad más que suficiente para detectar infecciones activas.

Es fundamental reconocer que estos LODs se determinaron utilizando amplicones de ADN purificado en una matriz sin interferentes. Este enfoque, si bien es estándar para establecer la sensibilidad analítica basal, no captura la complejidad de una muestra clínica real. Las muestras respiratorias como el exudado faríngeo constituyen una matriz biológica compleja que contiene potenciales inhibidores de la PCR (mucoproteínas, hemoglobina, etc.) y una cantidad enorme de ácidos nucleicos del huésped. Estos factores pueden disminuir la eficiencia de la extracción y de la amplificación, lo que significa que el LOD en una matriz clínica real podría ser ligeramente superior (menos sensible) que el determinado en este ensayo.

No obstante, la determinación del LOD con amplicones purificados sirve como una prueba inicial para establecer el rendimiento diagnóstico óptimo del sistema de *primers* y los componentes de la reacción de PCR. Estos resultados son un punto de partida robusto y un fuerte indicador del excelente potencial diagnóstico del panel, que deberá ser confirmado en una fase posterior mediante la validación con muestras clínicas caracterizadas.

#### ***9.6.6 Estandarización del panel de identificación molecular***

El objetivo de esta fase fue acoplar los nueve pares de *primers* validados previamente en una única reacción de RT-PCR múltiple de un solo paso, un formato que ofrece muchas ventajas en el campo del diagnóstico clínico, como la reducción del tiempo de respuesta y la disminución del riesgo de contaminación al minimizar los pasos de manipulación.

Previo a la estandarización final con un kit especializado, se realizó una fase de pre-estandarización utilizando una mezcla para PCR convencional (Thermo Scientific DreamTaq

PCR Master Mix 2X). El objetivo de este experimento no era desarrollar el protocolo final, sino comprender los desafíos implicados en la co-amplificación de múltiples blancos, especialmente al utilizar un sistema no optimizado para PCR múltiple. Los resultados del primer ensayo (Figura 29) utilizando solo 4 blancos (Betaglobina, SARS-CoV-2, VIA y *S. pneumoniae*) ilustran las complejidades de la PCR múltiple.

El resultado del carril 1, que representa las condiciones basales del sistema comercial de amplificación y con una concentración igual de *primers* (0.05 pmol) demuestran que, aunque se logró la amplificación de las 4 bandas esperadas, la banda de mayor tamaño, correspondiente a *S. pneumoniae* fue notablemente más tenue. Este es un ejemplo clásico de sesgo de amplificación (*amplification bias*), un desafío fundamental en la PCR múltiple. En una reacción donde múltiples pares de *primers* compiten por una concentración limitada de reactivos (polimerasa y dNTPs), los amplicones más pequeños se amplifican de manera más rápida y eficiente, dejando menos disponibilidad para la amplificación de los amplicones más grandes, lo que resulta en un menor rendimiento para estos últimos.

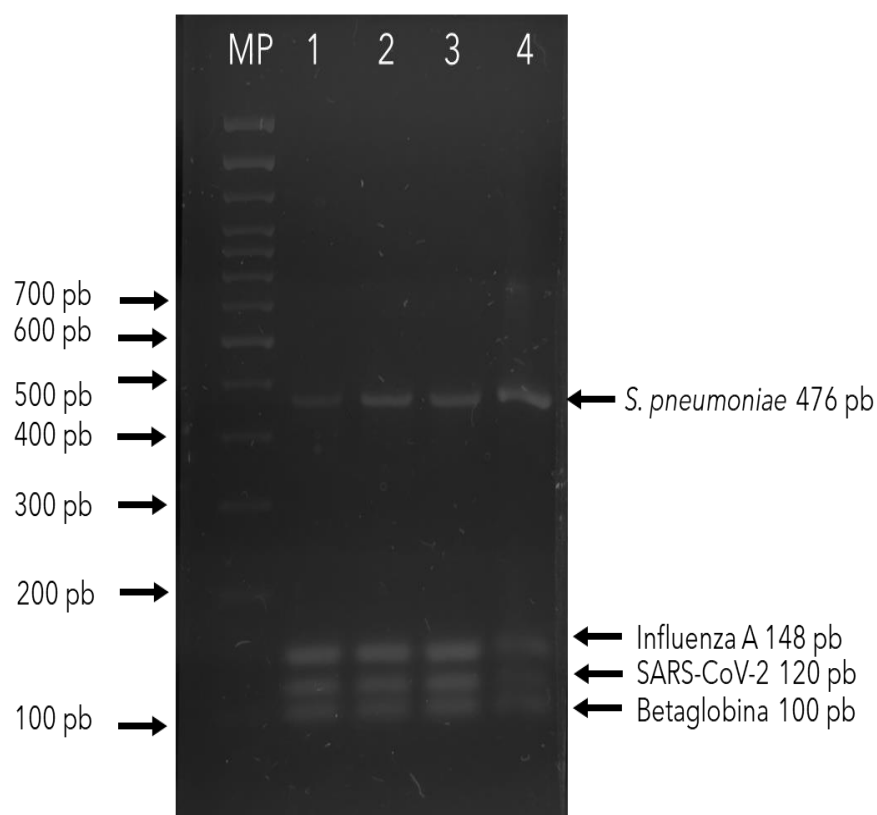
Los carriles 2 y 3 trabajan dos de las estrategias de optimización más comunes. Primero, se duplicó la concentración de los *primers* específicos para el amplicón de *S. pneumoniae* (de 0.05 pmol a 0.1 pmol). Esta es una herramienta estándar para contrarrestar el sesgo de amplificación. Al aumentar la concentración de los *primers* para el blanco menos eficiente, se incrementa la probabilidad de hibridación de estos con su secuencia diana equilibrando el rendimiento entre los diferentes amplicones.

Simultáneamente, se evaluó el efecto del MgCl<sub>2</sub>, un cofactor esencial para la actividad de la ADN polimerasa que también estabiliza el dúplex primer-plantilla. Un ligero aumento en su concentración (a 2.5 mM en el carril 2 y 3 mM en el carril 3) generó el rendimiento general de la PCR. Como se observó, la combinación de estas dos modificaciones resultó en una banda de *S. pneumoniae* significativamente más nítida y visible. La ausencia de una mejora adicional al pasar de 2.5 mM a 3.0 de mM de MgCl<sub>2</sub> sugiere que la concentración de 2.5 mM ya era suficiente para saturar la enzima en estas condiciones, y un aumento mayor no proporcionó beneficios adicionales.

El carril 4 investigó el uso del dimetilsulfóxido (DMSO), un co-solvente que facilita la desnaturalización del ADN y ayuda a resolver estructuras secundarias, tanto en la platilla

como entre los *primers*. El resultado fue la generación de una banda muy marcada para *S. pneumoniae*, lo que indicó que la presencia del DMSO fue altamente eficaz para mejorar la eficiencia de la amplificación de este amplicón más grande.

Sin embargo, la intensidad de las tres bandas más pequeñas disminuyó notablemente. Si bien la concentración del 4% de DMSO fue óptima para el amplicón más grande, probablemente desestabilizó la hibridación de los *primers* con sus plantillas para los amplicones más pequeños, reduciendo su eficiencia de amplificación.



**Figura 29.** Acoplamiento de un sistema 4-plex de PCR múltiple utilizando el kit Mezcla maestra para PCR DreamTaq (2X). MP 100 pb. Carriles: 1; Condiciones estándares e = [Primers], 2; MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM) y ≠ [Primers], 3; MgCl<sub>2</sub> (3 mM) y ≠ [Primers], 4; Condiciones estándares, ≠ [Primers] y 4% de DMSO. Ega 3 %

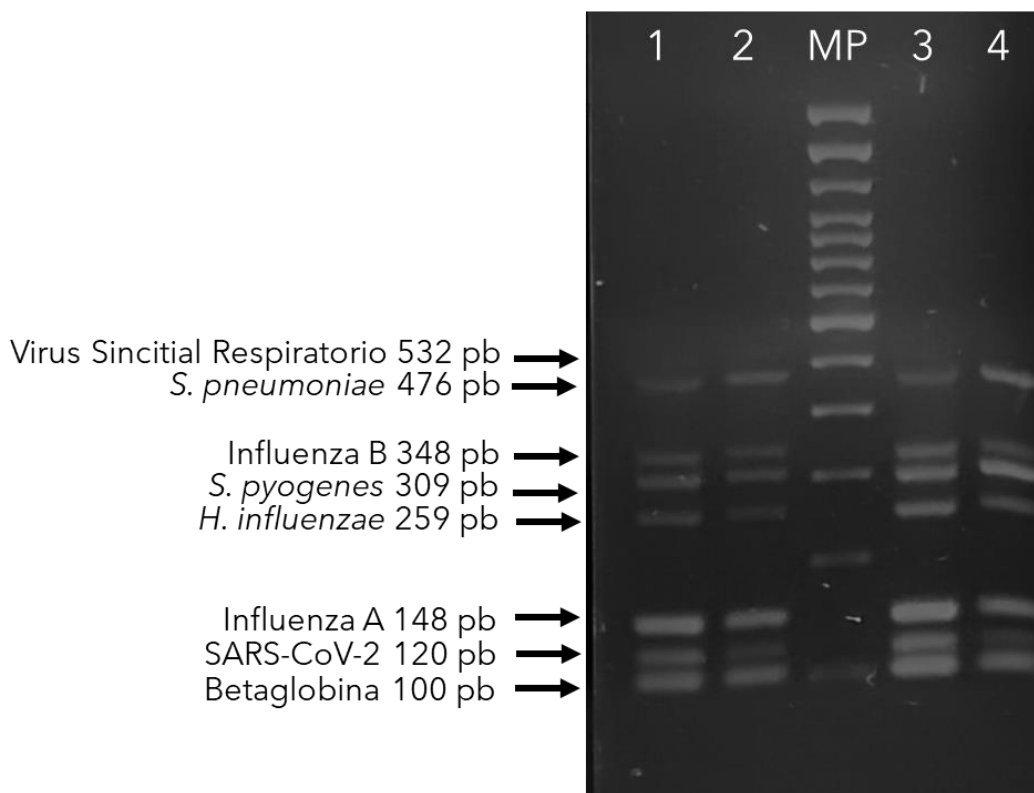
Tras la primera evaluación con un sistema 4-plex, se procedió a evaluar la viabilidad de una reacción más compleja de 8 blancos utilizando la misma mezcla maestra de PCR convencional, manteniendo una concentración de 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> e introduciendo la temperatura de alineamiento (TA) como una nueva variable (Figura 30). La comparación directa entre 60 °C (Carriles 1 y 3) y 62°C (Carriles 2 y 4) demostró que una TA de 60°C fue

la óptima, ya que una temperatura más alta reducía la eficiencia de la reacción, al ser más restrictiva durante la fase de alineamiento para el conjunto de los 16 *primers*. En este contexto, al realizar la comparación entre los carriles 1 y 2, ambos con concentraciones de *primers* iguales, se observó que a 62°C hubo una disminución general en la intensidad de las bandas, incluidas las de los amplicones pequeños que fueron muy nítidas a 60°C.

Por otro lado, al aplicar la estrategia de incrementar al doble la concentración (Balanceo en la concentración de *primers*) de los 5 pares de *primers* que amplificaban los fragmentos más grandes (*H. influenzae*, *S. pyogenes*, VIB, *S. pneumoniae* y VSR) se observó una mejora significativa en la visibilidad y nitidez de la mayoría de los amplicones grandes, validando los hallazgos del primer experimento.

La comparación del carril 1 con el carril 3 (60°C y concentración balanceada de *primers*) demostró y confirmó lo dicho anteriormente. Por otro lado, el carril 4, que combinaba los *primers* balanceados con la temperatura subóptima de 62°C, confirmó también las observaciones anteriores: aunque el balance de *primers* mejoró el rendimiento de los amplicones grandes, en comparación con el carril 2, la eficiencia global de la reacción fue inferior a la obtenida en el carril 3, reafirmando que la combinación de 60°C y *primers* balanceados fue la condición más exitosa.

También, es importante mencionar que incluso bajo las condiciones más optimizadas que se lograron (TA a 60°C, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y *primers* balanceados), el amplicón de mayor tamaño (VSR, 532 pb) no logró ser amplificado. Esto sugiere que el sesgo de amplificación en contra de este amplicón fue demasiado que ni siquiera el aumento de la concentración de sus *primers* fue suficiente para superar la competencia de los otros 7 amplicones en una reacción de amplificación convencional.



**Figura 30.** Acoplamiento de un sistema 8-plex de PCR múltiple utilizando el kit Mezcla maestra para PCR DreamTaq (2X). MP 100 pb; Carriles 1: TA 60°C e = [Primers], 2: TA 62 °C e = [Primers], 3: TA 60 °C y ≠[Primers], 4: TA 62 °C y ≠[Primers]. EGA 3 %

Es por ello que, la selección del sistema comercial pre-optimizado LunaScript® Multiplex One-Step RT-PCR Kit, fue una decisión estratégica para asegurar una alta reproducibilidad y eludir la laboriosa y compleja optimización de los componentes de la reacción (MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, polimerasa, retrotranscriptasa, etc.). La formulación de este kit, diseñada específicamente para soportar la co-amplificación de hasta 20 blancos, proporcionó las condiciones adecuadas para la amplificación de los 9 biomarcadores.

El éxito en la amplificación simultánea de las 9 bandas correspondientes a cada biomarcador en una sola reacción es la culminación y validación final de todo el proceso de diseño de *primers*. Este resultado demuestra que el conjunto de 18 oligonucleótidos es termodinámicamente compatible, es decir que, en las condiciones de multiplexación dadas, no se produce una competencia significativa por los reactivos ni la formación de dímeros de *primers* que pueden comprometer la eficiencias y rendimiento del ensayo (Markoulatos et al., 2002).

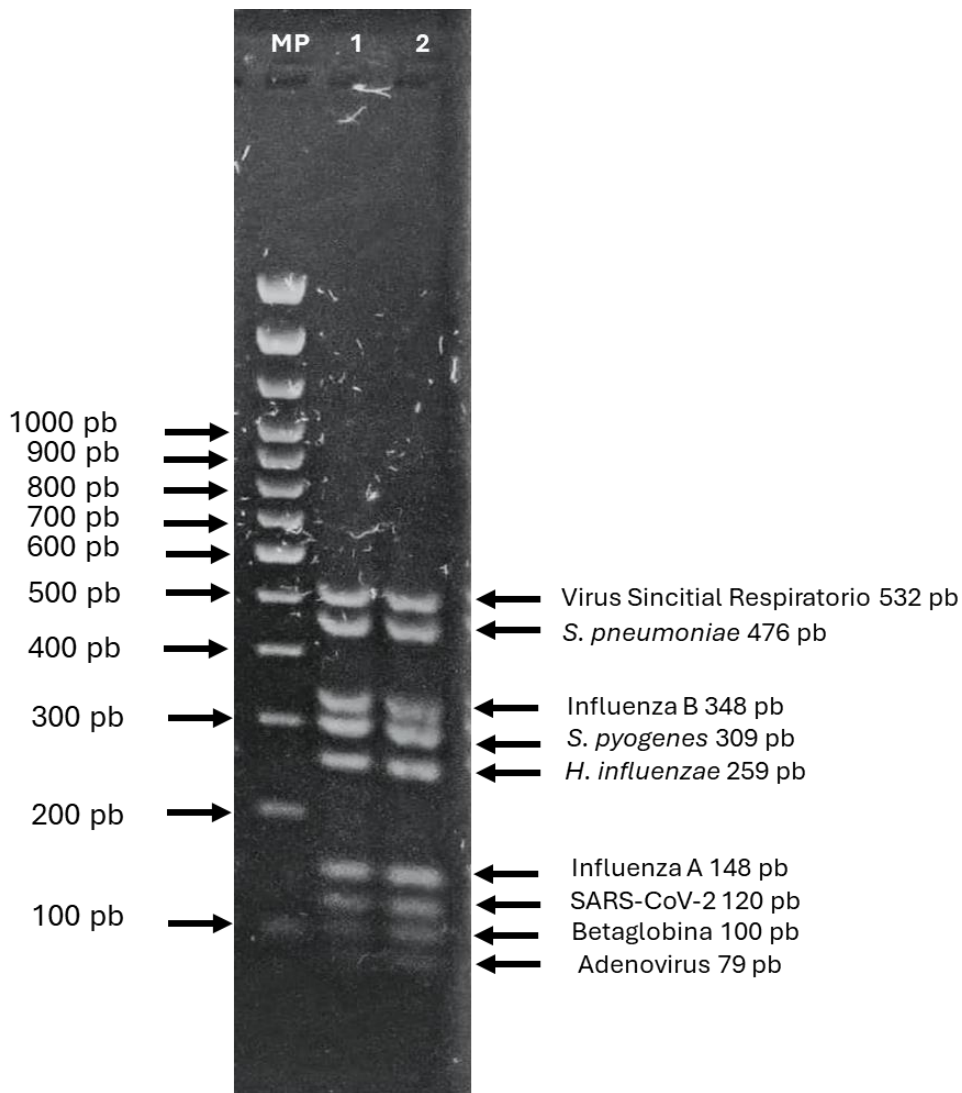
Un hallazgo de gran relevancia práctica fue la demostración de que el panel funciona con igual eficiencia tanto en el volumen de reacción recomendada por el fabricante (25  $\mu$ L) como en un volumen optimizado y reducido de 10  $\mu$ L (Figura 31). La capacidad de obtener resultados claros y reproducibles en un volumen menor demuestra la alta eficiencia de la mezcla de enzimas y la robustez del diseño de *primers*. Esta optimización tiene implicaciones directas en la viabilidad de la implementación del ensayo a mayor escala, ya que reduce el costo por reacción en más del 50% y permite un uso más racional de los reactivos.

La selección de los parámetros de amplificación se basó en las recomendaciones del fabricante para ensayos múltiples complejos, lo que representa un enfoque de optimización basado en la evidencia de la propia casa comercial. El tiempo de alineamiento de 1 minuto fue una consideración importante para compensar la baja concentración final de cada *primer* (0.05 pmol) y la complejidad de tener 18 diferentes secuencias buscando su diana. De manera similar, el tiempo de extensión de 1 minuto se ajustó para garantizar la síntesis completa del amplicón de mayor tamaño (532 pb). El protocolo de amplificación estandarizado se muestra en la Tabla 7.

*Tabla 77. Protocolo de amplificación estandarizado para el panel de identificación molecular*

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Transcripción Reversa</b>	55	10 minutos	1
<b>Inactivación de la RT/Desnaturalización inicial</b>	98	1 minuto	1
<b>Desnaturalización</b>	98	10 segundos	
<b>Alineamiento</b>	60	1 minuto	35
<b>Extensión</b>	68	1 minuto	
<b>Extensión Final</b>	68	5 minutos	1

En conclusión, la fase de estandarización fue exitosa, culminando en un protocolo de RT-PCR múltiple de un solo paso, optimizado, robusto y rentable. Este protocolo estandarizado sentó las bases para la siguiente y última fase de validación del ensayo: la evaluación de su desempeño con muestras clínicas.

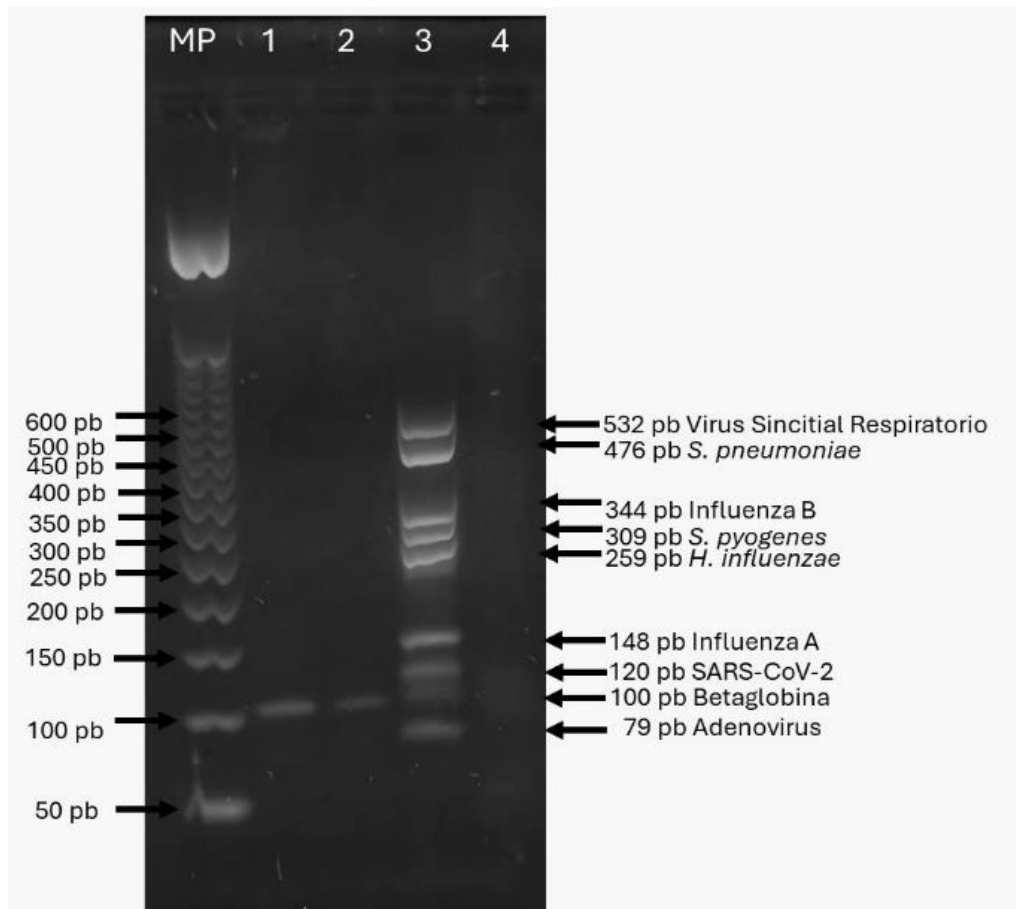


**Figura 31.** Acoplamiento y estandarización del Panel de identificación molecular. MP (Marcador de peso) 100 pb, Carriles: 1; reacción a 25 µL, 2; reacción a 10 µL. EGA 3%

### 9.6.7 Validación del panel en muestras clínicas

#### 9.6.7.1 Muestras de pacientes clínicamente sanos

La evaluación del panel de identificación se realizó en muestras de exudado faríngeo y nasofaríngeo de dos pacientes clínicamente sanos, seleccionados bajo el criterio de ausencia de sintomatología respiratoria durante al menos los últimos 30 días. En todas las corridas se incluyeron los controles positivo y negativo, los cuales arrojaron los resultados esperados, validando el proceso de amplificación y la ausencia de contaminación respectivamente.



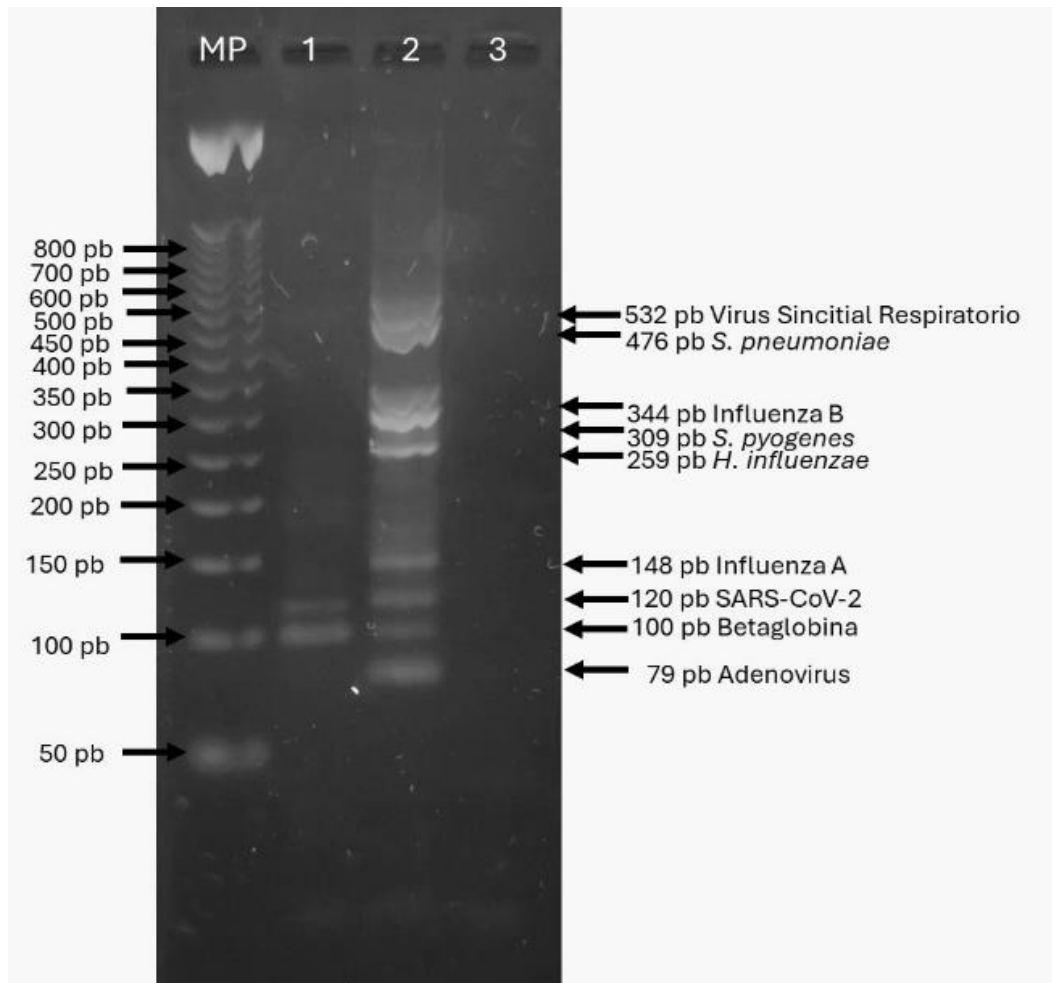
**Figura 32.** Aplicación del panel de identificación molecular en muestra de exudado nasofaríngeo y faríngeo del paciente clínicamente sano 1. MP 50 pb; C1: Rx múltiple nasofaríngeo y amplificación de banda de 100 pb (Betaglobina); C2: Rx múltiple faríngeo y amplificación de banda de 100 pb (Betaglobina); C3: Control positivo; C4: Control negativo. EGA 3%, 80 V, 100 minutos.

*Paciente 1.* Se procesaron las muestras de exudado nasofaríngeo y faríngeo. El análisis de los productos de amplificación en EGA (Figura 32) reveló la presencia de una única banda de amplificación en ambas muestras, cuyo tamaño correspondió a la banda del control interno de beta globina (100 pb). No se observó la amplificación de ninguna de las 8 dianas patogénicas ni la presencia de bandas inespecíficas. La amplificación exclusiva del control interno es un hallazgo de doble importancia. Primero, valida la integridad de todo el flujo de trabajo, desde la toma de muestra hasta el proceso de extracción de ARN y la ausencia de inhibición en la reacción. Segundo, la ausencia total de otras bandas demuestra la especificidad del panel, lo que indica que el conjunto de los 18 *primers* no presenta reactividad cruzada con material genético presente en la muestra, tanto del paciente como de la microbiota comensal del tracto respiratorio, validando en un entorno real las predicciones *In silico* previstas.

*Paciente 2.* Se procesó la muestra de exudado nasofaríngeo; la muestra de exudado faríngeo fue descartada por un bajo rendimiento de la extracción de ARN. El análisis del producto de la RT-PCR (Figura 33) evidenció la presencia de dos bandas de amplificación distintas. Una de las bandas correspondió al tamaño esperado para el gen control, mientras que la segunda banda correspondió al tamaño del biomarcador de SARS-CoV-2 (120 pb). El hallazgo de SARS-CoV-2 en un individuo asintomático es un fenómeno bien documentado. La posibilidad de un falso positivo por contaminación fue descartado por el resultado negativo del control incluido en la misma corrida. Este resultado puede interpretarse bajo dos escenarios reportado en la literatura:

1. *Persistencia de ARN viral post-infección:* Es probable que el paciente haya tenido una infección previa (sintomática o no) y se encuentre en una fase de eliminación o excreción viral. Como ejemplo, un metaanálisis identificó informes donde se documenta la existencia de pacientes con una excreción de hasta 83 días después de la inoculación inicial o inicio de síntomas en el tracto respiratorio superior y de hasta 59 días en las vías respiratorias inferiores (Cevik et al., 2021). A estos pacientes con diseminación persistente posterior a una infección aguda se les denominó como asintomáticos o paucisintomáticos (Machkovech et al., 2024).
2. *Infección asintomática:* El paciente podría haber estado cursando una infección activa sin síntomas o en una fase pre-sintomática. La detección de SARS-CoV-2 en pacientes asintomáticos no resulta inusual, ya que se ha documentado que personas sin síntomas pueden arrojar resultados positivos por PCR, de hecho, se estima que los pacientes ambulatorios asintomáticos son importantes excretores viables de SARS-CoV-2 en su tracto respiratorio superior y por lo tanto representan una proporción significativa de la transmisión del virus (Esteve et al., 2020; Glenet et al., 2021).

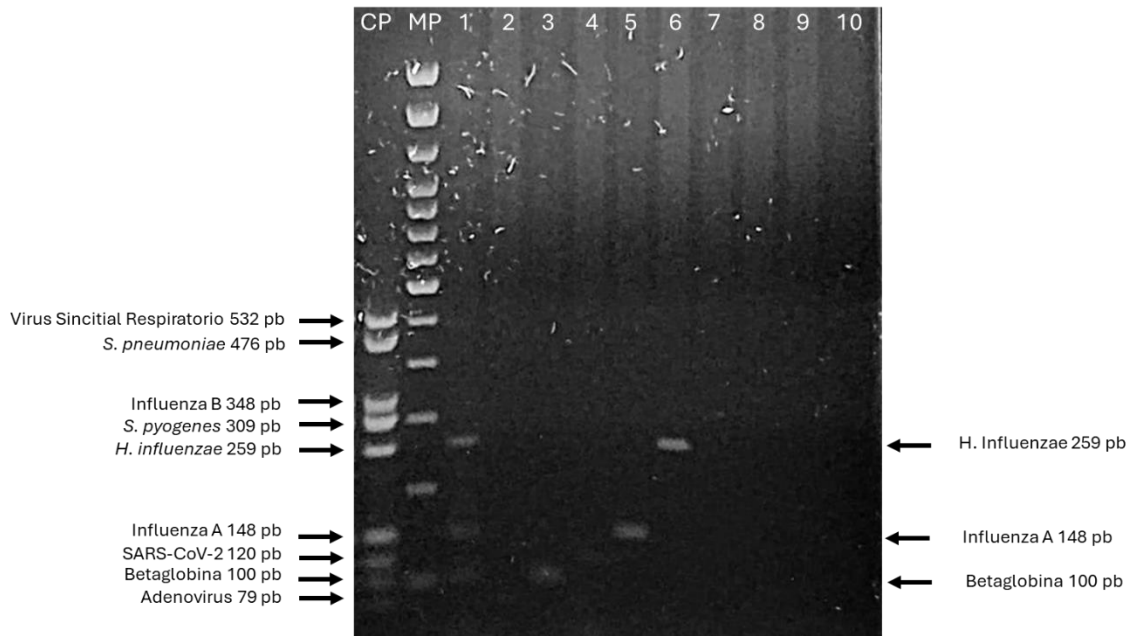
Independientemente del escenario, este resultado es una demostración práctica de la alta sensibilidad del panel. La capacidad de detectar una carga viral probablemente baja en una muestra clínica valida los resultados de los límites de detección obtenidos. Por lo tanto, estos datos justifican plenamente la progresión hacia una validación clínica a mayor escala.



**Figura 33.** Aplicación del panel de identificación molecular en muestra de exudado nasofaríngeo del paciente clínicamente sano 2. MP: Marcador de peso molecular 50 pb; C1: Rx múltiple nasofaríngea y amplificación de las bandas de Betaglobina (100 pb) y de SARS-CoV-2 (120 pb); C2: Control positivo; C3: Control negativo. EGA 3%, 80 V, 100 minutos.

### 9.6.7.2 Muestras de pacientes con sintomatología respiratoria

La prueba final correspondió a la evaluación del desempeño del panel frente a una muestra clínica de un paciente sintomático, ya que representa el escenario real donde la prueba deberá demostrar su funcionamiento. El análisis de una muestra de exudado nasofaríngeo de un paciente con sintomatología de una IRA arrojó resultados muy interesantes (Figura 34).



**Figura 34.** Aplicación del panel de identificación molecular en muestra de exudado nasofaríngeo de paciente con sintomatología respiratoria. MP (marcador de peso) 100 pb; Carril 1; reacción múltiple, amplificación del gen control Betaglobina 100 pb, VIA 148 pb y *H. influenzae* 259 pb; Carriles con Reacciones individuales; 2: AdV (-); 3: Betaglobina (+) 100 pb; 4: SARS-CoV-2 (-); 5: VIA (+) 148 pb; 6: *H. influenzae* (+) 259 pb; 7: *S. pyogenes* (-); 8: VIB (-); 9: *S. pneumoniae* (-); 10: VSR (-).

La amplificación del gen control de beta globina nuevamente validó el proceso de amplificación. La detección simultánea del VIA y de la bacteria *H. influenzae* demostró el correcto funcionamiento del panel y su capacidad para identificar múltiples patógenos en una sola reacción. Para asegurar la fiabilidad de este resultado se procedió a su validación mediante la amplificación individual de cada diana con un sistema de PCR convencional. La confirmación positiva de ambos patógenos en estas reacciones individuales confirió una alta confianza al resultado, demostrando que el panel no solo es sensible, si no también específico y fiable en la detección de múltiples blancos en una muestra clínica de matriz compleja.

El hallazgo de una coinfección viral-bacteriana no es inusual, y, de hecho, resalta una de las mayores fortalezas de los paneles sindrómicos. Un estudio demostró que el 40% de IRA virales presentaban una infección bacteriana concomitante (Falsey et al., 2013).

La capacidad del panel para identificar ambos patógenos simultáneamente es de enorme relevancia clínica ya que su potencial aplicación permitiría al médico tomar decisiones terapéuticas más informadas. En este caso, permitiría la aplicación de un tratamiento antiviral y al mismo tiempo abordar un tratamiento antibiótico para prevenir

futuras complicaciones asociadas a la presencia de esta bacteria. Este resultado no solo valida el funcionamiento técnico del panel, sino que también demuestra su potencial para proporcionar un diagnóstico más completo que los métodos que buscan a un solo patógeno.

#### **9.6.8 Generación del control positivo**

En el desarrollo de un ensayo de PCR múltiple, el control positivo ideal es una única molécula que contenga todas las secuencias diana de los biomarcadores detectados por la prueba. Con este objetivo, se exploraron dos estrategias de clonación molecular para ensamblar un constructo con los 9 biomarcadores del panel. Si bien ambas estrategias lograron éxitos parciales, los intentos de ensamblar constructos de mayor orden no generaron los resultados esperados.

En la estrategia 1 (Figura 36), se basó en un enfoque de clonación dirigida, los plásmidos de resguardo para SARS-CoV-2 y *S. pneumoniae* fueron digeridos por BglII/XbaI y BglII/XhoI, respectivamente, para liberar los fragmentos de interés. Simultáneamente, los plásmidos de Betaglobina y VIA fueron linealizados con XbaI y XhoI. Se procedió a ligar los fragmentos de Betaglobina (Linealizado) con SARS-CoV-2 (liberado) y de VIA (linealizado) con *S. pneumoniae* (liberado). El éxito de esta ligación se verificó por PCR, utilizando *primers* de los dos extremos de cada par. Se obtuvieron las bandas esperadas de 236 pb para el par Betaglobina-SARS-CoV-2 y de 658 pb para el par *S. pneumoniae*-VIA, confirmando la correcta formación de los constructos intermedios.

Estos fragmentos se clonaron en el vector pGEM-T Easy. Sin embargo, en la siguiente fase, se encontraron dos problemas. Primero, el rendimiento en la extracción de estos nuevos plásmidos fue consistentemente bajo. Segundo, al intentar unir ambos fragmentos digiriéndolos con la enzima NotI, no se logró obtener el producto de ligación final de 4 biomarcadores.

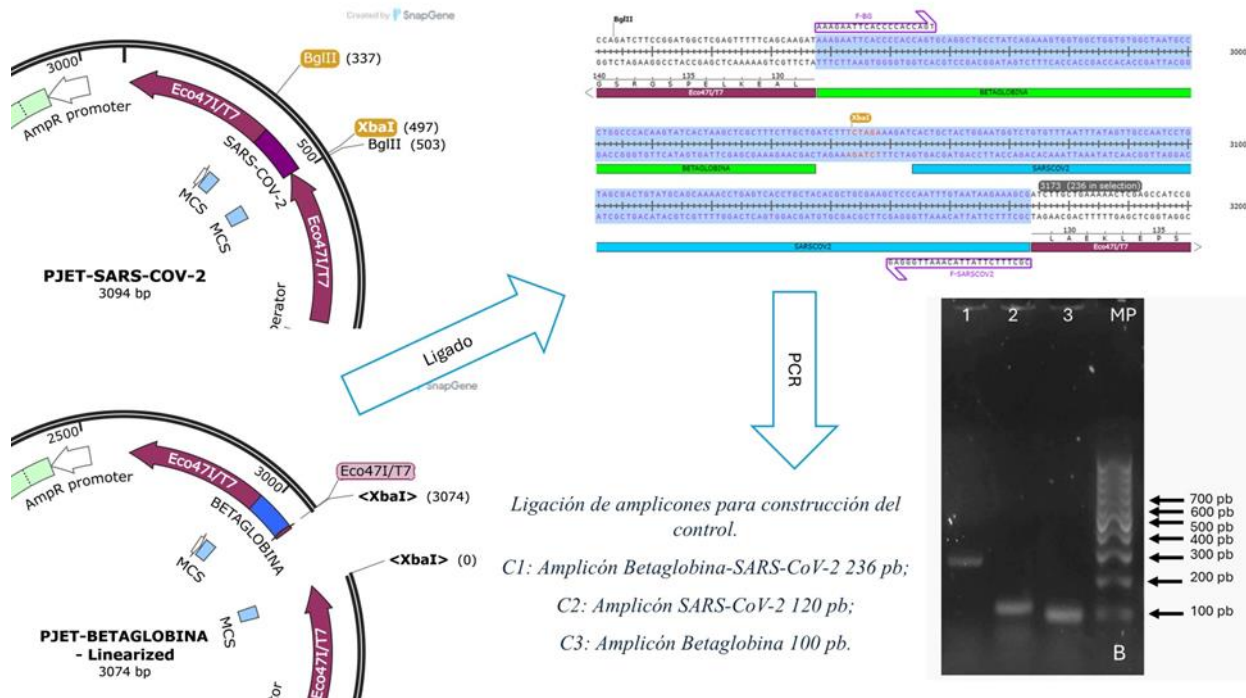


Figura 35. Generación del fragmento de ligación SARS-CoV-2 - Betaglobina

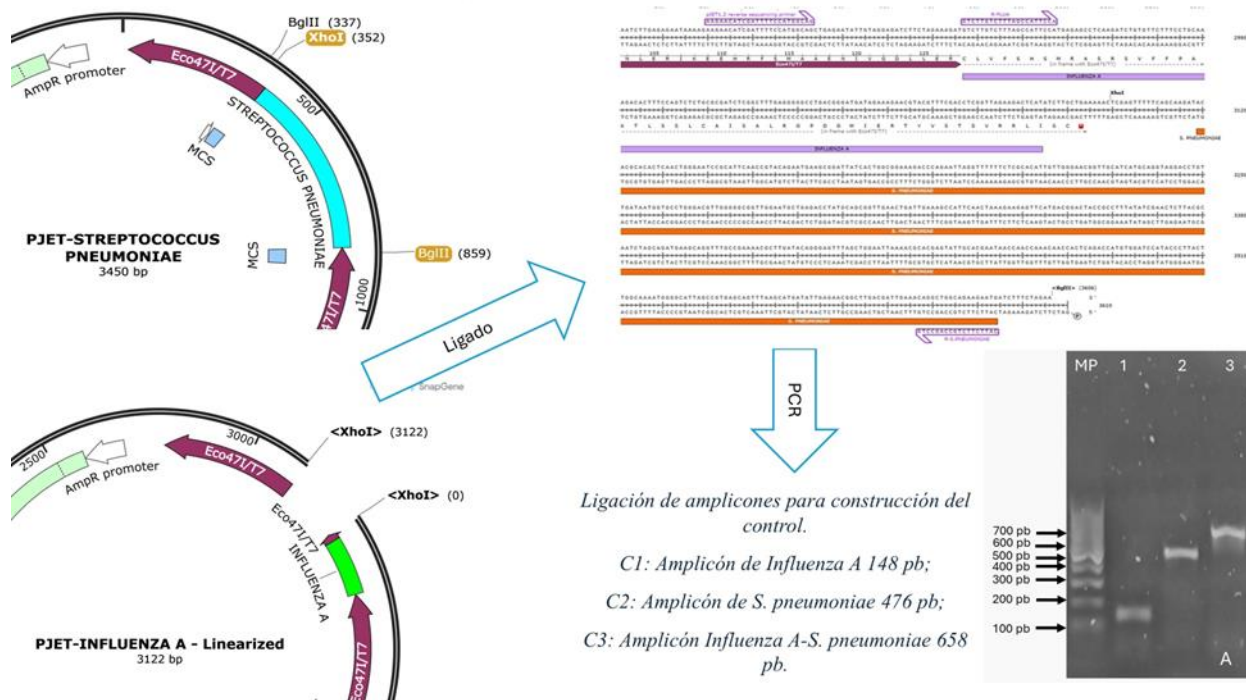
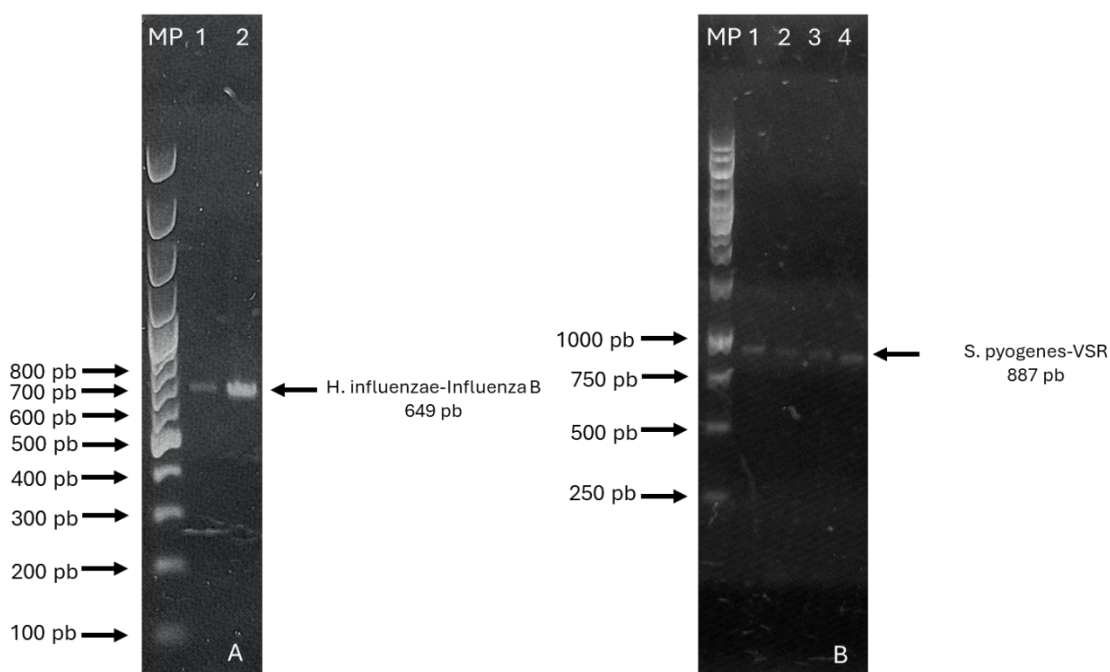


Figura 36. Generación del fragmento de ligación *S. pneumoniae* - influenza A

El éxito inicial de los pares de biomarcadores validó la estrategia de clonación direccional. No obstante, los fallos posteriores revelaron problemas metodológicos. El bajo

rendimiento del plásmido comprometió la disponibilidad de material suficiente para los pasos subsecuentes. Sin embargo, el error más marcado fue la estrategia de unión con una sola enzima, NotI. Al generar extremos cohesivos idénticos y auto compatibles en ambos lados de cada fragmento, se perdió el control direccional de la ligación. Esto creo probablemente una cinética de ligación favorable más a la recircularización intramolecular que a la ligación intermolecular deseada. La combinación de una baja concentración de DNA y una estrategia de ligación no direccional hizo que las probabilidades de la correcta unión fueran muy improbables.

La segunda estrategia buscó ensamblar otro conjunto de cuatro biomarcadores (*H. influenzae*, *S. pyogenes*, VIB y VSR) utilizando una única enzima de restricción, BglIII, para generar fragmentos con extremos cohesivos compatibles. La metodología consistió el ligar inicialmente los fragmentos en pares: *H. influenzae* con VIB, y *S. pyogenes* con VSR. La formación de estos pares, con tamaños esperados de 649 pb y 887 pb respectivamente, se confirmó exitosamente mediante PCR.



**Figura 37.** Ligación por pares de los fragmentos *H. influenzae* - influenza B y *S. pyogenes* - VRS. A) MP 100 pb; Carriles 1 y 2: fragmento de ligación *H.influenzae* - influenza B (649 pb). B) MP 1 Kb; Carriles 1 -4: fragmento de ligación *S. pyogenes* - VSR.

El paso final consistió en mezclar estas dos reacciones de ligación para permitir que los nuevos fragmentos se unieran y formaran el constructo final de cuatro biomarcadores. A

pesar de múltiples intentos y de ajustar las concentraciones para igualar el número de puntas (extremos cohesivos) disponibles, este paso no funcionó y no se generó el producto deseado.

El éxito en la formación de los pares iniciales demostró la eficiencia de la ligación de extremos BglII. Sin embargo, el fracaso al intentar unir estos pares expuso el principal inconveniente de usar una sola enzima para el ensamblaje complejo: la pérdida de control y la alta cantidad de combinaciones posibles. Al tener todos los fragmentos con los mismos extremos cohesivos, se abrió la puerta a una multitud de productos de ligación no deseados, como la recircularización de los fragmentos, la formación de homodímeros o la unión de múltiples copias del mismo fragmento (concatemerización).

Aunque se intentó dirigir la reacción controlando la estequiometría, es casi imposible prevenir las reacciones termodinámicamente más favorables en una mezcla tan compleja y la probabilidad de que dos fragmentos correctos se encuentre en la orientación adecuada es extremadamente baja.

Ante la imposibilidad de generar un control positivo con todas las secuencias de los biomarcadores validados, se planteó la implementación de una estrategia alternativa y funcional: el uso de una mezcla o mix de los nueve plásmidos de resguardo que se construyeron y validaron individualmente con éxito en una fase previa. Esta mezcla, con una concentración aproximadamente equimolar de cada plásmido, cumple con la función de un control positivo para este ensayo cualitativo.

La principal ventaja de este enfoque es su viabilidad y fiabilidad. Cada biomarcador presente en el plásmido ya ha sido secuenciado, por lo que su identidad está validada.

Es importante reconocer la limitación de esta estrategia en comparación con el control planteado en el último objetivo. La preparación de una mezcla perfectamente equimolar puede representar un desafío, y pequeñas variaciones en la cuantificación de cada plásmido o errores de pipeteo pueden llevar a una representación no proporcional de los blancos. Si bien esto sería una preocupación mayor para el desarrollo de un ensayo cuantitativo, para el panel de punto final, cuyo objetivo es un resultado cualitativo, estas variaciones menores son aceptables siempre y cuando la concentración de cada diana se mantenga por encima del límite de detección previamente determinado.

## 10. CONCLUSIONES

- ✓ Se diseñó un panel de identificación molecular que abarcó a los principales patógenos responsables de las IRA en México, seleccionados mediante una revisión bibliográfica de acuerdo con su importancia clínica y prevalencia. Este diseño incluyó a los virus adenovirus, SARS-CoV-2, virus de la influenza A y B, metapneumovirus, enterovirus-D68, rinovirus, virus sincitial respiratorio, virus de la parainfluenza 1-4, y a las bacterias *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae* y *H. influenzae*.
- ✓ La selección de los biomarcadores para cada patógeno se basó en un análisis del rendimiento diagnóstico (sensibilidad y especificidad) reportado en la literatura y del grado de conservación genética, priorizando este último en casos de discordancia.
- ✓ El diseño de los *primers* cumplió con los requerimientos fisicoquímicos recomendados en la literatura además de aquellos requerimientos técnicos para su acoplamiento en una RT-PCR múltiple, manteniendo una temperatura de fusión no mayor a dos grados de diferencia entre todo el conjunto de *primers* y con tamaños de amplicones adecuados para permitir su correcta resolución en una electroforesis en gel de agarosa.
- ✓ Se validó el funcionamiento de los *primers* dirigidos a la detección de adenovirus, SARS-CoV-2, virus de la influenza A, virus de la influenza B, virus sincitial respiratorio, *H. influenzae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y del gen control de beta globina con muestras positivas caracterizadas. La validación de los patógenos restantes no fue posible por falta de muestras de referencia.
- ✓ El diseño *In silico* de *primers* dirigidos a regiones altamente conservadas garantiza la detección universal de las diferentes especies, variantes, subtipos, genotipos y serotipos de los patógenos incluidos en este panel. Esto se demostró experimentalmente con la detección de los subtipos de los virus de la influenza A y de las especies de adenovirus.
- ✓ El panel demostró una especificidad analítica adecuada, sin reactividad interna o externa, lo que valida las predicciones de los análisis *In silico*.
- ✓ Se determinó que el panel presenta una alta sensibilidad analítica con límites de detección en el rango de 6 a 35 copias, valores significativamente inferiores a las cargas patogénicas reportadas en infecciones activas.

- ✓ Se estandarizó exitosamente un protocolo de RT-PCR multiplex de un solo paso, demostrando la compatibilidad y eficiencia del conjunto de *primers* en una sola reacción, incluso en volúmenes optimizados.
- ✓ La evaluación del panel en muestra clínicas preliminares arrojó resultados prometedores, demostrando su capacidad para funcionar en matrices biológicas reales, detectar casos asintomáticos e identificar coinfecciones.

## 11. PERSPECTIVAS

El presente trabajo concluyó con el diseño, estandarización y validación preliminar de un panel de RT-PCR múltiple de punto final para la detección de nueve patógenos, lo que representa una herramienta con alto potencial diagnóstico. Sin embargo, este trabajo tiene limitaciones y analizando los resultados obtenidos, se proponen las siguientes perspectivas para la continuación de este proyecto de investigación.

- ✓ Completar la validación experimental del panel originalmente diseñado. El diseño bioinformático abarcó un espectro más amplio de patógenos respiratorios de alta prevalencia en México, como metapneumovirus, rinovirus, enterovirus, virus de la parainfluenza humana y *M. pneumoniae*. La principal limitación de este trabajo fue la falta de muestras de referencia para validar los *primers* correspondientes. El siguiente paso es adquirir estas muestras de referencia y validar el funcionamiento de los *primers* restantes para integrarlos al panel completo.
- ✓ Realizar la transición de la RT-PCR múltiple de punto final a RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR). Un ensayo en tiempo real ofrecería ventajas como:
  - Resultados cuantitativos: permitiría no solo detectar, si no cuantificar la carga viral o bacteriana.
  - Mayor sensibilidad y especificidad: El uso de sondas aumentaría la especificidad y podría mejorar la sensibilidad del ensayo.
  - Rapidez: Elimina la necesidad de la EGA, reduciendo el tiempo de obtención de resultados.
- ✓ Validación con muestras clínicas a mayor escala. Aunque los resultados en muestras clínicas preliminares fueron un indicio del adecuado funcionamiento del panel, no son suficientes para establecer su desempeño diagnóstico. La perspectiva a mediano

plazo es llevar a cabo un análisis de validación con número de muestras de pacientes con sintomatología de IRA y comparar los resultados del panel desarrollado con un método de referencia.

- ✓ Finalmente, se pueden retomar los desafíos técnicos encontrados, la construcción de un control positivo que contenga todos los biomarcadores es un objetivo prioritario empleando otros métodos de ligación y ensamblaje como el ensamblaje Gibson o el método Golden Gate.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abavisani, M., Rahimian, K., Mahdavi, B., Tokhanbigli, S., Mollapour Siasakht, M., Farhadi, A., Kodori, M., Mahmanzar, M., & Meshkat, Z. (2022). Mutations in SARS-CoV-2 structural proteins: a global analysis. *Virology Journal*, *19*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01951-7>
- Abbasian, M. H., Mahmanzar, M., Rahimian, K., Mahdavi, B., Tokhanbigli, S., Moradi, B., Sisakht, M. M., & Deng, Y. (2023). Global landscape of SARS-CoV-2 mutations and conserved regions. *Journal of Translational Medicine*, *21*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03996-w>
- 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>
- 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>
- Akello, J. O., Kamgang, R., Barbani, M. T., Suter-Riniker, F., Aebi, C., Beuret, C., Paris, D. H., Leib, S. L., & Ramette, A. (2021). Genomic analyses of human adenoviruses unravel novel recombinant genotypes associated with severe infections in pediatric patients.

*Scientific Reports*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03445-y>

- Andrés, C., Piñana, M., Vila, J., Esperalba, J., Trejo-Zahinos, 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>
- Artesi, M., Bontems, S., Göbbels, P., Franckh, M., Maes, P., Boreux, R., Meex, C., Melin, P., Hayette, M. P., Bours, V., & Durkin, K. (2020). A recurrent mutation at position 26340 of SARS-CoV-2 is associated with failure of the E Gene quantitative reverse transcription-PCR utilized in a commercial dual-target diagnostic assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(10), 1–8. <https://doi.org/10.1128/JCM.01598-20>
- 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>
- Barreto, H. G., de Pádua Milagres, F. A., de Araújo, G. C., Daúde, M. M., & Benedito, V. A. (2020). Diagnosing the novel SARS-CoV-2 by quantitative RT-PCR: variations and opportunities. *Journal of Molecular Medicine*, 98(12), 1727–1736. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01992-x>
- Bennett, N. F., & Bissaillon, A. L. (2023). BioFire Respiratory Panel for the Detection of Viruses and Bacteria. *American Family Physician*, 108(2), 189–191.
- BioMérieux México. (2024). *Sistema PCR multiplex FilmArray®*. Sistema PCR Multiplex FilmArray®. <https://www.biofiredx.com/products/the-filmarray-panels/filmarrayrp/>

- Böhm, R., Haselhorst, T., & von Itzstein, M. (2014). Influenza Virus, Overview: Structures, Infection Mechanisms and Antivirals. In *Glycoscience: Biology and Medicine* (pp. 749–767). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-54836-2\\_148-1](https://doi.org/10.1007/978-4-431-54836-2_148-1)
- Bouزيد, 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.
- Bryant, A. E., & Stevens, D. L. (2014). Streptococcus pyogenes. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Vol. 2, pp. 2285–2299). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00199-5>
- Burd, E. M. (2010). Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*(3), 550–576. <https://doi.org/10.1128/CMR.00074-09>
- Bustin, S., & Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, *14*(March), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
- Caasi, D. R. J., Arif, M., Payton, M., Melcher, U., Winder, L., & Ochoa-Corona, F. M. (2013). A multi-target, non-infectious and clonable artificial positive control for routine PCR-based assays. *Journal of Microbiological Methods*, *95*(2), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.017>
- Calderaro, A., Buttrini, M., Farina, B., Montecchini, S., De Conto, F., & Chezzi, C. (2022). Respiratory Tract Infections and Laboratory Diagnostic Methods: A Review with A Focus on Syndromic Panel-Based Assays. *Microorganisms*, *10*(9), 1–26. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091856>
- 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>
- CDC. (2024a). *Influenza aviar tipo A*. Gripe Aviar (Gripe Aviar). <https://www.cdc.gov/bird-flu/about/avian-influenza-type-a.html>
- CDC. (2024b). *Tipos de virus de la gripe*. Influenza (Gripe). [https://www-cdc-gov.translate.goog/flu/about/viruses-types.html?\\_x\\_tr\\_sl=en&\\_x\\_tr\\_tl=es&\\_x\\_tr\\_hl=es&\\_x\\_tr\\_pto=tc](https://www-cdc-gov.translate.goog/flu/about/viruses-types.html?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=tc)
- CDC. (2025). *CDC Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay* (Issue CDC). <https://www.cdc.gov/flu/php/laboratories/influenza-sars-cov-2-multiplex-assay.html>
- Center for disease control and prevention. (2020). *Respiratory Syncytial Virus Infection (RSV)*. National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), Division of Viral Diseases. <https://www.cdc.gov/rsv/>
- Cevik, M., Tate, M., Lloyd, O., Maraolo, A. E., Schafers, J., & Ho, A. (2021). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe*, 2(1), e13–e22. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30172-5)
- 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>

- 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>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2015). MM03-Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases. In *Clinical and Laboratory Standards Institute* (3rd ed, Vol. 35, Issue 5).
- Collins, P. L., Fearn, R., & Graham, B. S. (2013). Respiratory syncytial virus: Virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 372). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_1)
- 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>
- Dhingra, A., Hage, E., Ganzenmueller, T., Böttcher, S., Hofmann, J., Hamprecht, K., Obermeier, P., Rath, B., Hausmann, F., Dobner, T., & Heim, A. (2019). Molecular Evolution of Human Adenovirus (HAdV) Species C. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37249-4>
- 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>
- Diaz, J., Morales-Romero, J., Pérez-Gil, G., Bedolla-Barajas, M., Delgado-Figueroa, N., García-Román, R., López-López, O., Bañuelos, E., Rizada-Antel, C., Zenteno-Cuevas, R., Ramos-Ligonio, Á., Sampieri, C. L., Orozco-Alatorre, L. G., Mora, S. I., & Montero, H. (2015). Viral coinfection in acute respiratory infection in Mexican children treated by the emergency service: A cross-sectional study. *Italian Journal of Pediatrics*, 41(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13052-015-0133-7>

- dos Santos Alves, J. C., Teixeira, D. M., Siqueira, J. A. M., de Deus, D. R., de Souza Oliveira, D., Ferreira, J. L., dos Santos Lobo, P., da Silva Soares, L., Tavares, F. N., & Gabbay, Y. B. (2024). Epidemiology and molecular detection of human adenovirus and non-polio enterovirus in fecal samples of children with acute gastroenteritis: A five-year surveillance in northern Brazil. *PLoS ONE*, *19*(8 August), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296568>
- 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>
- 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>
- El Kholly, 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>
- Elboukari, H., & Ashraf, M. (2023). *Parainfluenza Virus*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560719/>
- Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R., & Smith, T. F. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(1), 165–256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006>
- Esteve, C., Catherine, F. X., Chavanet, P., Blot, M., & Piroth, L. (2020). How should a positive PCR test result for COVID-19 in an asymptomatic individual be interpreted and managed? In *Medecine et Maladies Infectieuses* (Vol. 50, Issue 8, pp. 633–638).

<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.09.014>

- 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>
- Falsey, A. R., Becker, K. L., Swinburne, A. J., Nylen, E. S., Formica, M. A., Hennessey, P. A., Criddle, M. M., Peterson, D. R., Baran, A., & Walsh, E. E. (2013). Bacterial complications of respiratory tract viral illness: A comprehensive evaluation. *Journal of Infectious Diseases*, 208(3), 432–441. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit190>
- 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>
- 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>
- Gavillet, H., Hatfield, L., Rivett, D., Jones, A., Maitra, A., Horsley, A., & van der Gast, C. (2021). Microbial Culture Underestimates Lung Pathogen Detection and Surveillance in Cystic Fibrosis. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3875442>
- Glenet, M., Lebreil, A. L., Heng, L., N’Guyen, Y., Meyer, I., & Andreoletti, L. (2021). Asymptomatic COVID-19 Adult Outpatients identified as Significant Viable SARS-

- CoV-2 Shedders. *Scientific Reports*, 11(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00142-8>
- 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>
- 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>
- Hanson, K. E., & Couturier, M. R. (2016). Multiplexed Molecular Diagnostics for Respiratory, Gastrointestinal, and Central Nervous System Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 63(10), 1361–1367. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw494>
- Howley, P. M., Knipe, D. M., Whelan, S., Freed, E. O., & Cohen, J. L. (2023). *Fields. Virología* (7th Editio). Wolters Kluwer Health.
- 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>
- Ilyicheva, T. N., Netesov, S. V., & Gureyev, V. N. (2022). COVID-19, Influenza, and Other Acute Respiratory Viral Infections: Etiology, Immunopathogenesis, Diagnosis, and Treatment. Part 2. Other Acute Respiratory Viral Infections. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 37(3), 107–116. <https://doi.org/10.3103/S0891416822030053>

- Inma, P., Suntronwong, N., Sinsulpsiri, S., Srimaneewiroon, S., & Poovorawan, Y. (2024). Viral Etiology Associated With Acute Respiratory Tract Infection Patients in Bangkok, Thailand. *Cureus*, *16*(8). <https://doi.org/10.7759/cureus.66897>
- Institute for Health Metrics and Evaluation. (2024). Global burden of disease 2021: Findings from the GBD 2021 Study. In *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)61846-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)61846-6)
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2025). Estadísticas De Defunciones Registradas (Edr). *Inegi*, 1–5.
- Integrated DNA Technologies. (2024). *How do I use the OligoAnalyzer™ Tool to check for primer-dimers and hairpins formed by my oligo?* Frequently Asked Questions. <https://www.idtdna.com/pages/support/faqs/how-do-i-use-the-oligoanalyzer-tool-to-analyze-possible-hairpins-and-dimers-formed-by-my-oligo>
- Islam, M. R., Hoque, M. N., Rahman, M. S., Alam, A. S. M. R. U., Akther, M., Puspo, J. A., Akter, S., Sultana, M., Crandall, K. A., & Hossain, M. A. (2020). Genome-wide analysis of SARS-CoV-2 virus strains circulating worldwide implicates heterogeneity. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70812-6>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Khattak, Z., & Anjum, F. (2021). Haemophilus influenzae. *StatPearls Publishing*, 1–17. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562176/#\\_NBK562176\\_pubdet\\_](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562176/#_NBK562176_pubdet_)
- 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>
- 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>
- 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>
- Leber, A. L., Everhart, K., Daly, J. A., Hopper, A., Harrington, A., Schreckenberger, P., McKinley, K., Jones, M., Holmberg, K., & Kensinger, B. (2018). Multicenter evaluation of BioFire FilmArray respiratory panel 2 for detection of viruses and bacteria in nasopharyngeal swab samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(6), 1–11. <https://doi.org/10.1128/JCM.01945-17>
- Leong, N. K. C., Chu, D. K. W., Chu, J. T. S., Tam, Y. H., Ip, D. K. M., Cowling, B. J., & Poon, L. L. M. (2020). A six-plex droplet digital RT-PCR assay for seasonal influenza virus typing, subtyping, and lineage determination. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 14(6), 720–729. <https://doi.org/10.1111/irv.12769>
- 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>
- Luzius, T., Jeske, S. D., Baer, J., Goelnitz, U., Protzer, U., & Wettengel, J. M. (2025). A Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus, and Varicella-Zoster Virus in Cerebrospinal Fluid. *Microorganisms*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010111>
- Machkovech, H. M., Hahn, A. M., Garonzik Wang, J., Grubaugh, N. D., Halfmann, P. J.,

- Johnson, M. C., Lemieux, J. E., O'Connor, D. H., Piantadosi, A., Wei, W., & Friedrich, T. C. (2024). Persistent SARS-CoV-2 infection: significance and implications. *The Lancet Infectious Diseases*, 24(7), e453–e462. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00815-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00815-0)
- 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>
- Marcone, D. N., Carballal, G., Ricarte, C., & Echavarría, M. (2015). Diagnóstico de virus respiratorios utilizando un sistema automatizado de PCR múltiples ( FilmArray ) y su comparación con. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(1), 29–35.
- Marimón, J. M., & Navarro-Marí, J. M. (2017). Métodos de diagnóstico rápido de las infecciones respiratorias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 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>
- Moreno-Valencia, Y., Hernandez-Hernandez, V. A., Romero-Espinoza, J. A. I., Coronel-Tellez, R. H., Castillejos-Lopez, M., Hernandez, A., Perez-Padilla, R., Alejandro-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., Loudon, 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., Werno, A. M., & Jennings, L. C. (2019). Microbiological Diagnosis of Respiratory Illness: Recent Advances. In R. W. Wilmott, R. Deterding, A. Li, F. Ratjen, P. Sly, H. J. Zar, & A. Bush (Eds.), *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in*

*Children* (9th Editio, pp. 396–405). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44887-1.00022-5>

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

Ngaosuwankul, N., Noisumdaeng, P., Komolsiri, P., Pooruk, P., Chokephaibulkit, K., Chotpitayasunondh, T., Sangsajja, C., Chuchottaworn, C., Farrar, J., & Puthavathana, P. (2010). Research Influenza A viral loads in respiratory samples collected from patients infected with pandemic H1N1, seasonal H1N1 and H3N2 viruses. *Virology Journal*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-75>

Nieto-Rivera, B., Saldaña-Ahuactzi, Z., Parra-Ortega, I., Flores-Alanis, A., Carbajal-Franco, E., Cruz-Rangel, A., Galaviz-Hernández, S., Romero-Navarro, B., de la Rosa-Zamboni, D., Salazar-García, M., Contreras, C. A., Ortega-Riosvelasco, F., López-Martínez, I., Barrera-Badillo, G., Diaz-Garcia, H., Romo-Castillo, M., Moreno-Espinosa, S., & Luna-Pineda, V. M. (2023). Frequency of respiratory virus-associated infection among children and adolescents from a tertiary-care hospital in Mexico City. *Scientific Reports*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47035-6>

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>

Noyola, D. E., Hunsberger, S., Valdés Salgado, R., Powers, J. H., Galindo-Fraga, A., Ortiz-Hernández, A. A., Ramirez-Venegas, A., Moreno-Espinosa, S., Llamosas-Gallardo, B., Guerrero, M. L., Beigel, J. H., Ruiz-Palacios, G., Perez-Patrigeon, S., Ruiz-Palacios, G. M., Guerrero, M. L., Aguilar-Cruz, D., Roa, B., Cruz, I., Pérez-Patrigeon, S., ... Bertucci, Y. (2019). Comparison of Rates of Hospitalization between Single and Dual Virus Detection in a Mexican Cohort of Children and Adults with Influenza-Like Illness. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(11). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz424>

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.
- 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-Jiménez, 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>
- Osorio, N. S., & Correia-Neves, M. (2021). Implication of SARS-CoV-2 evolution in the sensitivity of RT-qPCR diagnostic assays. *The Lancet. Infectious Diseases*, 21(2), 166–167. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30435-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30435-7)
- Pedroza-Uribe, I. M., Vega Magaña, N., Muñoz-Valle, J. F., Peña-Rodríguez, M., Carranza-Aranda, A. S., Sánchez-Sánchez, R., Venancio-Landeros, A. A., García-González, O. P., Zavala-Mejía, J. J., Ramos-Solano, M., Viera-Segura, O., & García-Chagollán, M. (2024). Beyond SARS-CoV-2: epidemiological surveillance of respiratory viruses in Jalisco, Mexico. *Frontiers in Public Health*, 11(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1292614>
- Petat, H., Schuurs, M., Le Bas, F., Humbert, X., Rabiaza, A., Corbet, S., Vabret, A., Gouilh, M. A. R., & Marguet, C. (2025). Characterizing acute respiratory infections in primary care for better management of viral infections. *Npj Primary Care Respiratory Medicine*, 35(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41533-025-00434-w>
- Pickering, J., Richmond, P. C., & Kirkham, L. A. S. (2014). Molecular tools for differentiation of non-typeable *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC), 664. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00664>
- 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>

QIAGEN. (2025). *Importance of PCR controls*. Reference Genes and Controls. <https://www.qiagen.com/es-mx/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench-guide/pcr/reference-genes-and-controls/pcr-controls>

Qian, Q., Fan, G., Yang, W., Shen, C., Yang, Y., Liu, Y., & Xiao, W. (2025). Advances in Diagnostic Techniques for Influenza Virus Infection: A Comprehensive Review. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 10(6), 1–16. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed10060152>

Ramasamy, K., Balasubramanian, S., Kirkpatrick, A., Szabo, D., Pandrangi, 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>

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](https://www.researchgate.net/post/How_much_delta_G_is_permissible_for_cross_dimer_self_dimer_and_hairpin)

Robinson, C. M., Singh, G., Lee, J. Y., Dehghan, S., Rajaiya, J., Liu, E. B., Yousuf, M. A., Betensky, R. A., Jones, M. S., Dyer, D. W., Seto, D., & Chodosh, J. (2013). Molecular evolution of human adenoviruses. *Scientific Reports*, 3, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep01812>

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 Microbiología Clínica*, 36(7), 428–430. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.07.007>

- Secretaría de Salud. (2024). Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por fuente de notificación. In *Anuario de Morbilidad 1984 - 2024*. <https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2022/principales/nacional/institucion.pdf>
- 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>
- Siddik, A. B., Tanvir, N. A., Bhuyan, G. S., Alam, M. S., Islam, Z., Bulbul, M. R. H., Moniruzzaman, M., Halder, C. E., Rahman, T., Endtz, H., Ahmed, S., Qadri, F., & Picot, V. S. (2023). Bacterial and viral etiology of acute respiratory infection among the Forcibly Displaced Myanmar Nationals (FDMNs) in fragile settings in Cox’s Bazar—a prospective case-control study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *17*(4), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011189>
- 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>
- Simoës, 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>
- Singh, P., Misra, G., Mishra, N., Anvikar, A., & Potdar, V. (2025). Development and validation of novel RT-PCR assay for molecular diagnostic of viral variants using SARS-CoV-2 as a case study. *Methods*, *240*(January), 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2025.04.006>
- Slinger, R., Goldfarb, D., Rajakumar, D., Moldovan, I., Barrowman, N., Tam, R., & Chan, F. (2011). Rapid PCR detection of group a streptococcus from flocced throat swabs: A retrospective clinical study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *10*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-33>

- 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.>
- Stellrecht, K. A. (2018). The drift in molecular testing for influenza: Mutations affecting assay performance. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(3), 1–8. <https://doi.org/10.1128/JCM.01531-17>
- Stellrecht, K. A., Nattanmai, S. M., Butt, J., Maceira, V. P., Espino, A. A., Castro, A. J., Landes, A., Dresser, N., & Butt, A. (2017). Effect of genomic drift of influenza PCR tests. *Journal of Clinical Virology Journal*, 93(2017), 25–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.05.016>
- Tapparel, C., Junier, T., Gerlach, D., Van Belle, S., Turin, L., Cordey, S., Mühlemann, K., Regamey, N., Aubert, J. D., Soccac, 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>

- The Human Protein Atlas. (2025). *HBB*. Hemoglobin Subunit Beta. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000244734-HBB>
- Thermo Fisher Scientific. (2025). *Thermo Scientific Molecular Cloning*. Products for Molecular Biology Workflow. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-cloning.html>
- 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>
- 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>
- Vijaykrishna, D., Holmes, E. C., Joseph, U., Fourment, M., Su, Y. C. F., Halpin, R., Lee, R. T. C., Deng, Y. M., Gunalan, V., Lin, X., Stockwell, T. B., Fedorova, N. B., Zhou, B., Spirason, N., Kühnert, D., Bošková, V., Stadler, T., Costa, A. M., Dwyer, D. E., ... Barr, I. G. (2015). The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses. *eLife*, *2015*(4), 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.05055>
- 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>
- WHO. (2020). Severe Acute Respiratory Infections Treatment Centre. Practical manual to set up and manage a SARI treatment centre and a SARI screening facility in health care facilities. In *World Health Organization* (Issue March). World Health Organization. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331603/WHO-2019-nCoV-SARI\\_treatment\\_center-2020.1-eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331603/WHO-2019-nCoV-SARI_treatment_center-2020.1-eng.pdf)
- WHO. (2024). *WHO information for the molecular detection of influenza viruses*.

[https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/molecular-detection-of-influenza-viruses/protocols\\_influenza\\_virus\\_detection\\_2024.pdf?sfvrsn=df7d268a\\_8](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/molecular-detection-of-influenza-viruses/protocols_influenza_virus_detection_2024.pdf?sfvrsn=df7d268a_8)

WHO. (2025). *Influenza (Seasonal)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))

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>

Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., Niemeyer, D., Jones, T. C., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirgmaier, K., Drosten, C., & Wendtner, C. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, *581*(7809), 465–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>

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>

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>
- 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>
- Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Hovi, T., King, A. M. Q., Knowles, N. J., Lindberg, A. M., Pallansch, M. A., Palmenberg, A. C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., & Yamashita, T. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. *Journal of General Virology*, 98(10), 2421–2422. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000911>
- Zhu, Z., Fodor, E., & Keown, J. R. (2023). A structural understanding of influenza virus genome replication. *Trends in Microbiology*, 31(3), 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.09.015>
- 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>