

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE LABORATORIO CLINICO



**TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR MÁS UTILIZADAS EN LA
IDENTIFICACIÓN DE VIRUS CAUSANTES DE INFECCIONES RESPIRATORIAS EN
EL SALVADOR EN EL MES DE JULIO DE 2023.**

Presentado por:

SILVIA GUADALUPE MEJÍA GONZÁLEZ

Para optar el grado de:

LICENCIADA EN LABORATORIO CLINICO

Asesor:

LICDA. DELMY PATRICIA PINEDA DE SORIANO

Ciudad universitaria “Dr. Fabio Castillo Figueroa”, El Salvador, agosto, 2023.

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector

Msc. Roger Armando Arias

Vicerrector Académico

PhD. Raúl Ernesto Azcúnaga López

Vicerrector Administrativo

Ing. Juan Rosa Quintanilla

Secretario/a General

Ing. Francisco Antonio Alarcón

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA

Decana

MsC. Josefina Sibrían de Rodríguez

Vicedecano

Dr. Saúl Díaz Peña

Secretaria

MsC. Aura Marina Miranda de Arce

Director de Escuela

MsC. José Eduardo Zepeda Avelino

Directora de Carrera

Msp. Miriam Cecilia Recinos de Barrera

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por cuidarme, guiarme y otorgarme la sabiduría necesaria en todos estos años de estudio y darme la fortaleza y perseverancia para lograr la meta propuesta. Y por haberme otorgado una familia maravillosa, quienes han creído en mí siempre.

A MIS PADRES, por su enorme sacrificio, brindarme su apoyo incondicional en esta etapa de mi vida y haberme impulsado a seguir estudiando desde un inicio, por haberme forjado como la persona que soy, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio.

A MIS HERMANOS, por su apoyo emocional y muchas veces económico, por su sacrificio y por creer en mí desde un inicio motivándome a que lograra terminar mis estudios.

A MIS AMIGOS, Ronald Martínez, Yanci Vargas, Gabriela Madrid y Paola Orellana, por brindarme su amistad, a lo largo de estos años de estudio, motivándonos y apoyándonos a culminar nuestra carrera.

A MI UNIVERSIDAD Y DOCENTES, Por haberme permitido formarme en ella y otorgarme los conocimientos necesarios a lo largo de toda mi carrera, y a los docentes por compartirnos con mucha dedicación sus conocimientos para ser una excelente profesional.

Silvia Guadalupe Mejía González

RESUMEN

Este ensayo describe de forma general las técnicas de Biología Molecular más utilizadas en la identificación de los principales virus respiratorios en El Salvador según información proporcionada por el MINSAL en los boletines epidemiológicos. Entre las técnicas moleculares básicas que mayormente se utilizan en El Salvador es la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y sobre esta se han desarrollado diferentes variantes que han mejorado el proceso de diagnóstico e identificación de los principales virus, ya que la mayoría de los virus respiratorios descritos son ARN se utiliza la RT-qPCR que combina la transcripción inversa y el proceso de PCR para la identificación individual de cada virus. Por otra parte al ser una gran variedad de virus para identificar se describe otra variante llamada RT-PCR multiplex en la cual se hace uso de los llamados paneles respiratorios que se utilizan a través de plataformas comerciales que utilizan el principio de la PCR.

PALABRAS CLAVES:

Identificación, técnicas moleculares, PCR, RT-PCR multiplex, virus respiratorios.

ABSTRACT

This essay generally describes the Molecular Biology techniques most used in the identification of the main respiratory viruses in El Salvador according to information provided by the MINSAL in epidemiological bulletins. Among the basic molecular techniques that are mostly used in El Salvador is PCR (Polymerase Chain Reaction) and different variants have been developed on this that have improved the process of diagnosis and identification of the main viruses, since most The respiratory viruses described are RNA, RT-qPCR is used, which combines reverse transcription and the PCR process for the individual identification of each virus. On the other hand, since there is a wide variety of viruses to identify, another variant called multiplex RT-PCR is described. in which use is made of so-called respiratory panels that are used through commercial platforms that use the principle of PCR.

KEYWORDS:

Identification, molecular techniques, PCR, multiplex RT-PCR, respiratory viruses.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas se definen como aquellas infecciones del aparato respiratorio causadas tanto por virus como por bacterias, que tienen una evolución menor a 15 días y que se manifiestan con síntomas relacionados con el aparato respiratorio. El término aguda no necesariamente significa gravedad, lo que quiere decir es que la dolencia se ha iniciado recientemente. (Gobierno de Mendoza, Maletín Educativo de salud, 2016, p. 2).

Para el Gobierno de Mendoza, Maletín Educativo de salud (2016) “estas infecciones representan una de las primeras causas de atención médica en todo el mundo y se encuentran entre las primeras causas de mortalidad” (p. 1).

Con la definición anterior este ensayo conlleva el objetivo de explicar las diferentes técnicas de Biología Molecular más utilizadas en el diagnóstico de infecciones respiratorias causadas por virus en El Salvador.

Según los boletines epidemiológicos del Ministerio de Salud [MINSAL], Dirección de Epidemiología (2023) desde la semana 1 hasta la semana 29 del año 2023 los principales patógenos causantes de infecciones respiratorias identificados son los virus de la Influenza A, principalmente el A H3N2, la Influenza B, Parainfluenza, Virus Sincitial Respiratorio, Adenovirus y SARS- CoV-2.

Por lo anterior en este ensayo solo se describirán las técnicas de biología molecular que algunos hospitales o laboratorios privados de El Salvador están implementado para la identificación de solo los virus de importancia clínica que están circulando con mayor frecuencia en nuestro país, en la actualidad una de estas técnicas moleculares es la Reacción en cadena de la polimerasa PCR, en la cual se describirá de forma general en que consiste, además dentro de la PCR podemos

encontrar diferentes variantes entre estas la RT PCR multiplex, mediante el uso de paneles, lo cual ha sido una de las técnicas de PCR que mayormente se ha implementado en el país ya que permite la identificación simultanea de más de un patógeno en una sola corrida y esto a su vez puede aportar información sobre coinfecciones, además otra variante es la RT PCR en tiempo real que es la utilizada en los laboratorios y hospitales autorizados en la identificación del SARS- CoV-2. Sin embargo, ambas se consideran buenas alternativas para el diagnóstico de infecciones respiratorias causadas por virus sin embargo la más utilizada es la de paneles de PCR Multiplex ya que permite la identificación de múltiples virus en un mismo ensayo, se presentará en que consiste ambas variantes utilizadas.

Además, se presentará una de las plataformas comerciales automatizadas de biología molecular que se utiliza en el país dando a conocer como es el procedimiento que se lleva cabo a través de este sistema para la identificación de virus respiratorios.

CONTENIDO

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR	ii
AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	vii
DESARROLLO	1
CONCLUSIONES	16
ANEXOS	17
FUENTES DE INFORMACIÓN	18

DESARROLLO

GENERALIDADES DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS

Se presentan las generalidades sobre las infecciones respiratorias agudas, y generalidades de los diferentes virus identificados como causantes de las infecciones respiratorias en El Salvador.

Las infecciones respiratorias agudas constituyen un grupo de enfermedades que se producen en el aparato respiratorio, causadas por diferentes microorganismos como virus y bacterias, que comienzan de forma repentina y duran menos de 2 semanas. Es la infección más frecuente en el mundo y representa un importante tema de salud pública. La mayoría de estas infecciones como el resfriado común son leves, pero dependiendo del estado general de la persona pueden complicarse y llegar a amenazar la vida, como en el caso de neumonías. (Ministerio de salud, Protección social, s.f., párr. 1).

Es una infección que afecta a las vías respiratorias superior y/o inferior, causando una enfermedad de leve a grave y que puede ser transmitida de persona a persona. Las infecciones respiratorias agudas se clasifican en dos tipos: Infecciones de las vías respiratorias superiores e infecciones de las vías respiratorias inferiores. LAS VÍAS RESPIRATORIAS SUPERIORES incluyen las infecciones que afectan desde la fosa nasal hasta la laringe incluyendo los senos paranasales, faringe y el odio medio. Las infecciones de las vías respiratorias superiores incluyen: Rinitis (resfriado común), Sinusitis, Infecciones del oído, Faringitis aguda o faringoamigdalitis, Epiglotitis, Laringitis. LAS VÍAS RESPIRATORIAS INFERIORES incluyen las infecciones que afectan desde la tráquea y los bronquios hasta los bronquiolos y los alveolos. Las infecciones respiratorias inferiores más comunes incluyen: Bronquiolitis y Neumonía. Los síntomas de la infección respiratoria aguda incluyen los siguientes: Fiebre, dolor de garganta o tos, dolor de

articulaciones, dolor de cabeza, letargo, dolor en el tórax, dificultad respiratoria. (Muñoz, 2018, párrs. 1,2 y 3).

PRINCIPALES VIRUS CAUSANTES DE INFECCIONES RESPIRATORIAS EN EL SALVADOR

Según la información proporcionada por el MINSAL, Dirección de Epidemiología (2023) en los boletines epidemiológicos desde la semana 1 hasta la semana 29 del 2023 se han identificado diferentes virus responsables de las infecciones respiratorias, entre estos virus identificados se encuentran: Virus Sincitial Respiratorio, Parainfluenza, Adenovirus, Virus de la Influenza tipo A, principalmente el subtipo (H3N2), Virus de la Influenza B y SARS-CoV2.

CARACTERISTICAS DE LOS VIRUS RESPIRATORIOS

A continuación, se hará una breve descripción de las características de cada virus.

VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO (VRS)

El virus respiratorio Sincicial (VRS) es un Mixovirus RNA del género Pneumovirus, que pertenece a la familia Paramyxoviridae, tienen dos proteínas de superficie denominadas F y G de especial interés ya que confieren al VRS sus características antigénicas. La proteína F es responsable de la penetración del virus en la célula huésped y de la formación de sincicios. La proteína G es una glicoproteína de gran tamaño responsable de la adhesión del virus a la célula que va a infectar. Es un virus altamente contagioso que puede sobrevivir hasta 7 horas en superficies no porosas, se difunde con las secreciones nasofaríngeas de los individuos infectados por contacto directo a través de las gotas de saliva, pero también la transmisión es posible a través de las manos o por contacto con objetos contaminados. Las puertas de entrada del virus son la conjuntiva ocular y la mucosa nasal y oral. El VRS es un patógeno ubicuo capaz de causar grandes epidemias bronquiolitis y

neumonías que afectan a todas las edades, especialmente a niños pequeños en todo el mundo, tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados. (Asociación Española de pediatría [AEP]. s.f., pp. 161-163).

PARAINFLUENZA

Los virus Parainfluenza son envueltos, helicoidales, de cadena sencilla de ARN negativo, con un diámetro de 150 a 250 nm. Pertenecen a la familia Paramyxoviridae. Existen cuatro tipos de la Parainfluenza o virus para gripal, lo cuales pueden causar infecciones de las vías respiratorias. Los serotipos de PIV 1, 2 y 3 son agentes causantes de laringotraqueobronquitis (crup) en niños de 2-4 años. El serotipo 3 es el segundo agente productor de neumonía en niños menores de un año. (Virus Parainfluenza, s.f., párr. 1 y 3).

ADENOVIRUS

Los adenovirus son virus DNA que se clasifican de acuerdo con la presencia de 3 antígenos mayores en la cápside (hexona, pentona y fibra). Hay 7 especies de adenovirus humanos (A-G) y 57 serotipos. Los diferentes serotipos están asociados con distintas enfermedades. En general, la infección se contrae por el contacto con secreciones respiratorias (incluso en dedos de pacientes infectados) de una persona infectada o con un objeto contaminado (p. ej., toallas, instrumentos). La infección puede ser transmitida por el aire o por el agua por ejemplo contraída al nadar en lagos o en piscinas sin el cloro adecuado. La descamación viral asintomática respiratoria o gastrointestinal puede continuar durante varios meses o incluso durante años. En los huéspedes inmunocompetentes, la mayoría de las infecciones por adenovirus son asintomáticas. Cuando las infecciones son sintomáticas, se puede presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas porque la mayoría de los adenovirus que causan enfermedad leve tienen afinidad por una variedad

de tejidos. La mayoría de las infecciones sintomáticas ocurren en niños y causan fiebre y síntomas respiratorios de las vías superiores. Los adenovirus tipos 3 y 7 causan un síndrome caracterizado por conjuntivitis, faringitis y fiebre (fiebre faringoconjuntival). De forma muy poco frecuente, algunos síndromes por adenovirus, que se detectan en lactantes, pueden manifestarse con bronquiolitis grave y neumonía. En poblaciones cerradas de adultos jóvenes por ejemplo reclutas militares, pueden aparecer brotes de enfermedades respiratorias, con fiebre y síntomas de las vías inferiores, en general traqueobronquitis, aunque también neumonía de forma ocasional. Se han producido grupos de casos de enfermedades respiratorias graves causada por adenovirus específicos (en particular los tipos 7, 14 y 55) en adultos sanos. (Tesini, 2022).

VIRUS DE LA INFLUENZA A (GRIPE A) Y INFLUENZA B (GRIPE B)

Los virus de la influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae, poseen genoma de tipo ARN de simple cadena y polaridad negativa, miden de 80 a 120 nm de diámetro, simetría helicoidal, se cubren de una membrana lipídica y en ella se insertan las glicoproteínas HA y NA que determina el alto grado de variabilidad del virus. (Oropesa Fernández, S., s.f., p.55).

Hay 4 tipos de virus de la gripe estacional: A, B, C y D. los causantes de las epidemias estacionales son los virus gripales A y B. Los virus de la gripe A se clasifican en subtipos en función de las combinaciones de dos proteínas de superficie: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Los subtipos actualmente circulantes en el ser humano son el A H1N1 y el A H3N2. El AH1N1 también se conoce como AH1N1 pdm09 pues fue causante de la pandemia de 2009 y posteriormente sustituyó al virus de la gripe estacional A H1N1 que circulaba hasta entonces. Los virus de tipo B no se clasifican en subtipos, pero los circulantes actualmente pueden dividirse en dos linajes B/Yamagata y B/Victoria. (Organización Panamericana [OPS], Organización Mundial de la Salud [OMS], s.f., párrs. 9-11).

SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 pertenece a la familia de los coronavirus, los cuales son virus de ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple, polaridad positiva, envueltos, no segmentados, tamaño de 80-160nm. Puede transmitirse como la mayoría de los virus respiratorios, mediante, secreciones respiratorias, siendo este el mecanismo principal de transmisión. (persona a persona). (Aguilar Gómez et al., 2020, pp. 143-144).

TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR IMPLEMENTADAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE LOS VIRUS CAUSANTES DE INFECCIONES RESPIRATORIAS

Se describen las técnicas moleculares para la identificación de los virus respiratorios más utilizadas en algunos laboratorios privados y públicos de El Salvador.

Las técnicas de biología molecular sirven para analizar ácidos nucleicos y para detectar e identificar tanto microorganismos, como diferentes genotipos dentro de una misma especie. Todas estas técnicas necesitan un paso previo de extracción de ADN o ARN. Una vez extraído debe purificarse de forma adecuada para evitar la presencia en la muestra de inhibidores o sustancias que contaminen y que impidan la correcta realización de la técnica posterior. Las técnicas de biología molecular se deben realizar en muestras de ADN totalmente puros, para obtener resultados correctos. (Diz Mellado, 2020, p. 84).

Entre las técnicas moleculares básicas que mayormente se utilizan es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sobre esta se han desarrollado diferentes variantes entre estas la llamada PCR en tiempo real lo cual es llamada así porque la amplificación se puede monitorear a medida avanza la PCR es decir en tiempo real, sin embargo ya que la mayoría de los virus descritos son ARN se

describirá la RT-qPCR en tiempo real llamada como reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa lo cual utiliza ambos procesos es decir transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa y su detección se da en tiempo real, además al ser múltiples virus existe una variante donde combina la RT-PCR pero se utilizan varios pares de cebadores, para identificar múltiples virus en una sola corrida, llamada RT-PCR multiplex.

A continuación, se hará una descripción general de la técnica PCR y las variantes mencionadas.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN Polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN de las células. En la reacción si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una **PCR**, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como **RT-PCR** (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). (Tamay de D, Ibarra C, Velasquillo C, 2013, p.71).

Esto dependerá de si el material genético es ADN genómico o si es ARN, entonces en base a ese criterio se utilizará cualquiera de las dos.

Tamay et al., (2013), además argumentan que:

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima ADN polimerasa, como la Taq polimerasa que provee los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), cofactores como el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y agua libre de nucleasas. Todos

estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. (p. 71).

A su vez, Tamay et al., (2013), describen estas etapas de la siguiente manera:

Desnaturalización: En esta etapa las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos, el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones, debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como molde para el siguiente paso. (p. 72).

Hibridación: En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado Primers, es importante la temperatura de hibridación sea la óptima, esta generalmente oscila entre 50-60°C. (p.72).

Extensión: En esta etapa la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función agregando los dNTPs, complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis de ADN, es decir de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones. Los equipos donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. (p.73).

A continuación, se describirán las variantes de la PCR que más se implementan en El Salvador.

RT-qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa, también llamada RT-qPCR, se utiliza para detectar y cuantificar el ARN. El ARN total o ARNm primero se transcribe en ADN complementario (ADNc). Luego el ADNc se utiliza como plantilla para la PCR cuantitativa o la reacción de PCR en tiempo real (qPCR). En qPCR, la cantidad de producto amplificado se mide en cada ciclo de PCR mediante fluorescencia. La RT-qPCR se puede realizar en un ensayo de uno o dos pasos. Los ensayos de un solo paso combinan transcripción inversa y PCR en un solo tubo y tampón, utilizando una transcriptasa inversa junto con una ADN polimerasa. En los ensayos de dos pasos, los pasos de transcripción inversa y PCR se realizan en tubos separados, con diferentes tampones optimizados, condiciones de reacción y estrategias de cebado. (Principios básicos de RT-qPCR, s.f., párrs. 1-2). “La gran ventaja de esta técnica es la flexibilidad en su diseño operativo ya que permite la detección cualitativa o cuantitativa del ácido nucleico dependiendo del propósito por lo cual es solicitada” (Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM], Facultad de Química, s.f., párr. 4).

RT- PCR Multiplex

Esta variante al igual que la anterior realiza primero una transcripción inversa mediante la enzima Transcriptasa inversa. para tener una ADNc y luego se realiza la reacción de PCR.

La PCR multiplex es una técnica generalizada de biología molecular que se utiliza para la amplificación de múltiples objetivos en un solo experimento de PCR. En un ensayo de en donde se pueden amplificar mas de una secuencia objetivo utilizando múltiples pares de primers en una mezcla de reacción. Esta técnica tiene el potencial de producir ahorros considerables en tiempo y

esfuerzo dentro del laboratorio sin comprometer la utilidad del experimento. (Bravo, A. L., s.f., p.1).

Diseño de primers

Bravo, A. L. (s.f.) también afirma:

Los ensayos de PCR multiplex implican el diseño de un gran número de primers, por lo tanto, el diseño en conjunto de los primers específicos para cada fragmento a amplificar, es esencial para tener una reacción múltiple exitosa. Las consideraciones importantes para su diseño son clave para la amplificación específica con un alto rendimiento. Longitud de los primers: se requiere que los primers sean cortos, en el rango de 18 a 22 bases. Temperatura de fusión: Se usan primers con T_m similares. (p.1).

Ventajas:

Bravo, A. L., indica las ventajas siguientes:

- Es un método preciso y rápido ya que se amplifican diferentes plantillas al mismo tiempo
- Se necesita menos mano de obra y menos tiempo para obtener diversos resultados, por lo que es rentable.
- En términos de ventajas técnicas, aquí los errores de pipeteo son menores y se requieren menos consumibles de reactivos para realizar el experimento. (p.3).

PLATAFORMAS COMERCIALES AUTOMATIZADAS BASADAS EN LA PCR MULTIPLEX QUE SE UTILIZAN EN ALGUNOS LABORATORIOS DE EL PAIS.

En la actualidad existen una variedad de ensayos comerciales de PCR multiplex que permiten la detección de los virus respiratorios con una alta sensibilidad y especificidad. A continuación, se describirá una de estas plataformas automatizadas facilitando su identificación.

SISTEMA FILMARRAY

Es un sistema multiplex de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que integra la preparación, amplificación, detección y análisis de la muestra en un sistema cerrado, minimizando la contaminación. Permite realizar pruebas moleculares que facilitan el diagnóstico sintomático y realiza pruebas simultáneas para una amplia variedad de gérmenes patógenos, incluyendo bacterias, virus y levaduras, utilizando paneles integrales que incluyen el respiratorio y otros. (Sistema multiplex PCR para el diagnóstico de gérmenes patógenos FilmArray, 2022, Párr. 1).

El FilmArray Respiratory panel (PANEL RESPIRATORIO)

Es una prueba multiplexada de ácido nucleico prevista para utilizar con el instrumento FilmArray para la detección e identificación cualitativa y simultánea de múltiples ácidos nucleicos de virus y bacterias respiratorios. Mediante el FilmArray RP se han identificado los siguientes tipos y subtipos de organismos: Adenovirus, Coronavirus 229E, Coronavirus HKU1, coronavirus NL63, Coronavirus OC43, Metapneumovirus humano, Influenza A, Influenza A/H1, Influenza A/H1-2009, Influenza A/H3, Influenza B, virus Parainfluenza 1, Virus Parainfluenza 2, Virus Parainfluenza 3, Virus Parainfluenza 4, Virus Sincitial respiratorio, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*. (Biofire Diagnostic, S.f.). según el FilmArray Folleto RP. (s.f.) este panel: “Es simple: porque tiene solo dos minutos de preparación, Fácil:

porque no requiere mediciones o pipeteos precisos. Rápido: porque el tiempo de respuesta de aproximadamente una hora y Completo: ya que es un panel de 20 patógenos respiratorios”.

ESPECIFICACIONES DE LA MUESTRA

Para las especificaciones de la muestra, Biofire FilmArray (2021) define:

- **Tipo de muestra:** hisopado nasofaríngeo
- **Volumen de muestra:** 300 ul
- **Medio de transporte para la muestra:** Medio de transporte viral VTM o Medio de transporte universal UTM.
- **Consideraciones del proceso:** se depositan 300 ul del medio de transporte que contiene al hisopo con el que se toma la muestra en el vial con solución de lisis.
- **Tiempo para proceso de muestra:** procesar de manera inmediata (p.8)

FUNCIONAMIENTO

El panel FilmArray almacena todos los reactivos necesarios para la lisis celular, extracción y purificación del ADN y la detección. La muestra se recolecta en un medio transporte viral. Antes de la prueba, el usuario inyecta en el panel una solución de hidratación y la muestra combinadas con un tampón de muestra. Primero FilmArray extrae y purifica todos los ácidos nucleicos de la muestra no procesada, luego realiza una PCR multiplex anidada. Durante la primera etapa de la PCR, FilmArray realiza una sola reacción multiplex de gran volumen y masiva, finalmente las reacciones individuales en la segunda etapa de la PCR singleplex detectan los productos de la primera etapa de la PCR. Utilizando los datos finales de la curva de fusión. El software de FilmArray genera automáticamente un resultado para cada determinación en un solo informe. (FilmArray Folleto RP, s.f.).

“Cuando se completa el proceso el software reporta la presencia o ausencia de cada patógeno en la muestra” (BioFire Diagnostics, s.f. parr. 6).

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE ESTE SISTEMA

Según Biofire FilmArray (2021) “el panel respiratorio de FilmArray tiene una sensibilidad de 97.1% y una especificidad del 99.3%” (p. 7).

OPERACIONES Y PROCESOS QUE TIENEN LUGAR DURANTE EL ANÁLISIS.

Para las operaciones y procesos que tienen lugar durante el análisis, Biofire Diagnostic (s.f.) describe:

Purificación y extracción del ácido Nucleico: la purificación del ácido nucleico tiene lugar en las tres primeras ampollas de la bolsa. La muestra se lisa por agitación (homogeneización de perlas) y el ácido nucleico liberado se captura, lava y eluye mediante tecnología de perlas magnéticas. Estas etapas requieren aproximadamente diez minutos y el ruido del equipo homogeneizador de perlas se percibe como un chirrido agudo durante el primer minuto de funcionamiento.

Transcripción inversa y 1° etapa de la PCR Multiplex: puesto que muchos de los patógenos identificados mediante FilmArray son virus ARN, se realiza una etapa de transcripción inversa-RT para convertir el ARN vírico en ADNc antes de la amplificación. La solución de ácido nucleico purificada se combina con una mezcla maestra precalentada para iniciar la etapa de RT y el termociclado posterior para la PCR multiplex. El efecto de la primera etapa de la PCR es enriquecer los Ácidos Nucleicos diana presentes en la muestra. (p.10).

2° etapa de la PCR: los productos de la primera etapa de la PCR se diluyen y mezclan con reactivos de PCR nuevos que tienen un colorante intercalador fluorescente del ADN. Esta solución

se distribuye en la matriz de segunda etapa de la PCR. Los pocillos individuales de la matriz contienen los cebadores de los diferentes ensayos cada uno por triplicado dirigidos a las secuencias específicas del ácido nucleico de cada uno de los patógenos detectados, así como para el control del material de la plantilla. Estos cebadores o primers están anidados o internalizados en los productos específicos de la primer etapa de la reacción multiplex, que potencia tanto la sensibilidad como la especificidad de las reacciones. Ver figura 1.

Análisis de fusión del ADN: después de la segunda etapa de la PCR, la temperatura aumenta lentamente y se controla la fluorescencia de cada pocillo, que se analiza para generar una curva de fusión. La temperatura a la que funde cada producto de la PCR específico (temperatura de fusión o T_m) es consistente y predecible, y el software FilmArray evalúa automáticamente los datos de los pocillos replicados de cada ensayo para notificar los resultados. El software FilmArray controla el funcionamiento del instrumento, recoge y analiza los datos y genera automáticamente un informe de la prueba al final del análisis. (Biofire Diagnostic, s.f., p.10).

PROCEDIMIENTO

A continuación, se presenta el procedimiento que se lleva a cabo en la utilización del panel respiratorio FilmArray.

Biofire Diagnostics (s.f.) describe los pasos siguientes:

PASO1: insertar la bolsa

Extraiga la bolsa del embalaje. Inserte la bolsa en el pouch Loading Station (estación de carga de bolsas), Introduzca el vial Sample Buffer (tampón de muestra) en el pocillo rojo. Introduzca el vial de la Hydration Solution (solución de hidratación) en el pocillo azul.

PASO 2: Hidratar la bolsa.

Quite el tapón de la jeringa y extraiga 1 ml de la solución de hidratación, inserte la punta de la jeringa en el puerto de hidratación de la bolsa situado directamente bajo la flecha azul.

PASO 3: Mezclar la muestra.

Quite el tapón del vial del sample Buffer (tampon de muestra). Con una pipeta de transferencia, extraiga una muestra hasta la 3^a línea de la pipeta, añada la muestra al vial Sample Buffer. Mezcla agitando suavemente arriba y abajo.

PASO 4: Cargar la mezcla de muestra.

Con la jeringa extraiga 0,3 ml de Sample mix (mezcla de muestra), inserte la punta de la jeringa en el puerto de la bolsa para la muestra, situado directamente bajo la flecha roja. Ver figura 2.

PASO 5: Analizar la bolsa.

Extraiga la bolsa de la estación de carga de bolsas, con el software del sistema en ejecución, abra la tapa del instrumento, inserte la parte más grande de la película de la bolsa en la ranura de carga de bolsas del instrumento, fije la bolsa en su sitio. Escanee el código de barras de la bolsa. Introducir la sample ID (ID de la muestra), nombre de usuario y contraseña. Hacer clic en Start Run (iniciar prueba). Luego lea los resultados.

Sección Run Summary (Resumen de la prueba)**1. Detectec (detectado):**

- Nombre de los patógenos detectados.
- Si aparece None (ninguno), no se han detectado patógenos.

- Si aparece invalid (no valido). Vuelva a analizar la muestra.

2. Equivocal (dudoso).

- Si aparece None (ninguno), ningún patógeno es dudoso.
- Si se enumera en patógeno, vuelva a analizar la muestra.
- Si aparece Invalid (No valido). Vuelva a analizar la muestra.

3. Controls (controles)

- Si aparece Passed (aprobado), los resultados son válidos.
- Si aparece failed (fallido), vuelva a analizar la muestra.
- Si aparece invalid (no Valido), vuelva a analizar la muestra.

Sección Results Summary (Resumen de resultados)

4. Not Detected (No detectado), no se ha detectado un patógeno.

5. Detected (Detectado), se ha detectado un patógeno.

6. Equivocal (dudoso), no se ha podido determinar el resultado, vuelva a analizar la muestra.

CONCLUSIONES

Está claro que con el uso de las técnicas basadas en biología molecular se ha revolucionado hoy en día por la forma como se identifican los patógenos involucrados en las infecciones ya que gracias a ellas se pueden dar un diagnóstico rápido y seguro y de esta forma tomar una decisión de manera rápida, oportuna y con mayor seguridad el tratamiento y medidas adecuadas para el paciente. Las técnicas de biología molecular más utilizadas en el país para la identificación de virus respiratorios es la técnica de PCR y de esta las variantes RT-qPCR, y la RT-PCR multiplex, ambas muy importantes ya que la mayoría de los virus son ARN es necesario utilizar estas variantes porque es necesario tener ADN para poder realizar la PCR. La variante RT-PCR multiplex es muy utilizada en los laboratorios ya que permite identificar múltiples virus en un mismo tubo. En la actualidad con las plataformas comerciales de biología molecular basadas en el principio de PCR como el sistema FilmArray permiten la identificación de los principales virus causantes de infecciones respiratorias con una alta sensibilidad y especificidad, ya que son paneles de PCR Multiplex que permiten identificar de manera simultánea múltiples virus en una sola corrida. Esto ha favorecido al personal médico ya que al no saber que microorganismo es el que está causando la infección porque los síntomas son en algunos casos similares se les dificulta tomar decisiones en cuanto al tratamiento ya que solo tienen sospechas, pero no están seguros, por lo tanto, con esta plataforma se puede identificar múltiples virus en un solo ensayo; sin embargo, solo se pueden identificar los que están en el panel los cuales son : Adenovirus, Coronavirus 229E, Coronavirus HKU1, coronavirus NL63, Coronavirus OC43, Metapneumovirus humano, Influenza A, Influenza A/H1, Influenza A/H1-2009, Influenza A/H3, Influenza B, virus Parainfluenza 1, Virus Parainfluenza 2, Virus Parainfluenza 3, Virus Parainfluenza 4, Virus Sincitial respiratorio, *Bordetella pertusis*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*.

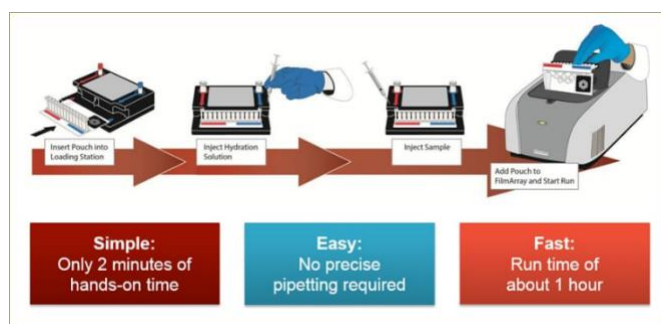
ANEXOS

Figura 1.*Cartucho filmArray*

Nota. Tomado de Guía Rápida del Usuario, [Fotografía], por Biofire FilmArray, marzo, 2021, Scribd (<https://www.scribd.com/document/559338087/Biofire-FilmArray-Guia-rapida-del-usuario>)

Figura 2:

Procedimiento del panel FilmArray



Nota. Tomado de sistemas de PCR multiplex FilmArray, [ilustración], por BioMérieux España. s.f., (<https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/sistema-de-pcr-multiplex-filmarraytm>).

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Aguilar Gómez, N. E., Hernández Soto, A. A., y Ibanes Gutiérrez, C. (2020). Características del SARS-CoV-2 y sus mecanismos de transmisión. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 33(3), 143-144. <https://doi.org/10.35366/95651>
2. Asociación Española de Pediatría [AEP]. (s.f.). Virus Respiratorio Sincicial (VRS). [PDF]. <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/vrs.pdf>
3. Biofire Diagnostic. (s.f.). FilmArray Respiratory panel (RP) manual de instrucciones. [PDF]. Labymed. Recuperado el 25 de julio de 2023, de <https://labymed.com.gt/wp-content/uploads/2020/06/PanelRespiratorio.pdf>
4. Biofire FilmArray. (marzo, 2021). Guía Rápida del Usuario. Scribd. Recuperado el 26 de julio de 2023, de <https://es.scribd.com/document/559338087/Biofire-FilmArray-Guia-rapida-del-usuario>
5. Biofire FilmArray. (marzo, 2021). Cartucho filmArray [fotografía]. Recuperado de <https://www.scribd.com/document/559338087/Biofire-FilmArray-Guia-rapida-del-usuario>
6. BioMérieux España. (s.f.). Sistema de PCR multiplex. FilmArray™. [Ilustración]. bioMérieux España. Recuperado de <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/sistema-de-pcr-multiplex-filmarraytm>
7. Bravo, A. L. (s.f.). PCR Multiplex. Recuperado el 27 de julio de 2023, de Scribd. <https://es.scribd.com/document/469286188/PCR-multiplex>

8. Diz Mellado, O. M. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Revistas NPunto*, 3(30), 89. <https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5f69a919884e7Art5.pdf>
9. FilmArray Folleto RP. (s.f.). Scribd. Recuperado el 30 de julio de 2023, de <https://es.scribd.com/document/426279412/FilmArray-Folleto-RP>
10. Gobierno de Mendoza, Maletín Educativo de salud. (16 de marzo del 2016). Enfermedades respiratorias. [PDF]. <https://www.mendoza.gov.ar/wp-content/uploads/sites/16/2016/03/respiratorias-contenidos.pdf>.
11. Ministerio de Salud [MINSAL], Dirección de Epidemiología. (2023). *Boletines Epidemiológicos 2023*. <https://www.salud.gob.sv/boletines-epidemiologicos-2023/>.
12. Ministerio de Salud, Protección social. (s.f.). Infecciones respiratorias Agudas (IRA). GOV.CO. [https://www.minsalud.gov.co/salud/Paginas/Infecciones-Respiratorias-Agudas-\(IRA\).aspx](https://www.minsalud.gov.co/salud/Paginas/Infecciones-Respiratorias-Agudas-(IRA).aspx).
13. Muñoz, C. (14 de agosto de 2018). Infección Respiratoria Aguda (IRA). GeoSalud. Recuperado el 2 de julio de 2023, de https://www.geosalud.com/enfermedades_infecciosas/ira.htm
14. Organización Panamericana [OPS], Organización Mundial de la Salud [OMS]. (s.f.). Influenza y otros virus respiratorios. <https://www.paho.org/es/temas/influenza-otros-virus-respiratorios>
15. Oropesa Fernández, S. (s.f.). Virus influenza. PAHO/WHO Pan American Health Organization. Recuperado el 28 de julio de 2023, de <https://www.paho.org/es/file/83145/download?token=OU9CYvLI>

16. Principios básicos de RT-qPCR. (s.f.). Thermo Fisher Scientific.[PDF]. Recuperado el 25 de julio de 2023, de <https://www.thermofisher.com/ht/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>
17. Sistema Multiplex PCR para el diagnóstico de gérmenes patógenos FilmArray. (27 de julio de 2022). El Hospital. Recuperado el 21 de julio de 2023, de <https://www.elhospital.com/es/noticias/sistema-multiplex-pcr-para-el-diagnostico-de-germenes-patogenos-filmarray>
18. Tamay, d., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la Reacción en Cadena de la polimerasa PCR y de la PCR en tiempo real. *Revista investigación en Discapacidad*, 2(2), 71-75. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
19. Tesini, B. L. (abril de 2022). Infecciones por adenovirus. Manual MSD versión para profesionales. Recuperado el 5 de julio 2023, de <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/virus-respiratorios/infecciones-por-adenovirus>
20. Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM], Facultad de Química. (s.f.). PCR en tiempo real. Recuperado el 16 de julio de 2023, de <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/pcr-en-tiempo-real/>
21. Virus Parainfluenza. (s.f.). Vircell. Recuperado el 25 de julio de 2023, de <https://www.vircell.com/enfermedad/36-virus-parainfluenza/>