

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**DIRECCIÓN GENERAL DE POSTGRADO**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD**

“Desarrollo y prueba piloto de un test de PCR múltiple en tiempo real para la detección simultánea de patógenos virales causales de infecciones respiratorias”

Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas

Autor: Lic. Edgar Bernabé Cardozo Ruíz Díaz

Director de tesis: Dra. Graciela Russomando, PhD.

Co-director de tesis: Lic Emilio Espínola, MSc.

San Lorenzo – Paraguay

2018

## RESUMEN

En el Paraguay, más del 20% de los fallecimientos por IRAG, se hallan asociados a virus respiratorios. Esto conlleva a la necesidad de aplicar técnicas moleculares a costo reducido, para aumentar la sensibilidad y detectar otros virus patógenos no reportados por el sistema de vigilancia. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un test *in house* de qPCR que permita detectar a los seis patógenos virales más frecuentes en las IRAG. Se seleccionaron cebadores y sondas TaqMan® para la detección de AdV, RSV, RV, InfA, EV y MPV en formato de qPCR múltiple. Se testaron diferentes buffers de reacción y enzimas one-step con el fin de optimizar las condiciones de reacción para la detección de los patógenos en muestras biológicas (hisopado nasal). Se desarrollaron controles positivos del kit, clonando fragmentos de PCR de cada virus en plásmidos pJET1.2 y posterior transformación de *E. coli*. Se realizaron pruebas de reacción cruzada individuales y múltiples. Los seis virus fueron detectados en forma específica en el formato triplex, y el límite de detección fue de hasta 10 copias del plásmido control. Los PC diseñados permiten la cuantificación viral en cada muestra. El kit *in-house* ha demostrado ser sensible y específico con una concordancia elevada al comparar con el kit comercial *Fast Track*. No se observó reacción cruzada entre EV y RV.

El kit diseñado permitirá reducir en forma sustancial los costos en salud pública comparado con los kits comerciales en el mercado actual. La diferenciación específica de RV y EV presenta una ventaja frente a otros kits comerciales que no discriminan ambos virus. Los resultados indican que el formato de qPCR múltiple diseñado permite la detección rápida y específica de AdV, RSV, RV, InfA, EV y MPV en 200 µL de muestras biológicas de pacientes infectados con estos virus.

**Palabras clave:** PCR en tiempo real, Diagnóstico múltiple, Virus respiratorios

## ABSTRACT

In Paraguay, more than 20% of deaths due to ARI are associated with respiratory viruses. This leads to the need to apply molecular techniques at reduced cost, to increase sensitivity and detect other pathogenic viruses not reported by the surveillance system. The objective of this work is to develop an in-house qPCR test that allows detecting the six most frequent viral pathogens in ARI. TaqMan® primers and probes were selected for the detection of AdV, RSV, RV, InfA, EV and MPV in multiplex qPCR format. Different reaction buffers and one-step enzymes were tested in order to optimize the reaction conditions for the detection of pathogens in biological samples (nasal swabs). Positive controls were developed, cloning PCR fragments of each virus in pJET1.2 plasmids and subsequent transformation of *E. coli*. Individual and multiple cross-reaction tests were performed.

The six viruses were detected specifically in the triplex format, and the limit of detection was up to 10 copies of the PC. The designed PCs allow viral quantification in each sample. The in-house kit has proven to be sensitive and specific with a high concordance when compared to the Fast-Track commercial kit. No cross reaction was observed between EV and RV. The in-house kit designed will substantially reduce public health costs compared to commercial kits in today's market. The specific differentiation of RV and EV presents an advantage over other commercial kits that do not discriminate both viruses. The results indicate that the designed multiple qPCR format allows rapid and specific detection of AdV, RSV, RV, InfA, EV and MPV in 200 µl of biological samples from patients infected with these viruses.

**Keywords:** Real-time PCR, Multiple diagnosis, Respiratory viruses