

Herasimiuk, Melisa Anabel

“Puesta a punto de un método de RT-PCR en tiempo real para la detección de Virus Sincicial Respiratorio (VSR) y comparación con métodos de rutina en el laboratorio bioquímico”

2023

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Atribución – no comercial – sin obra derivada 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Herasimiuk M. A. (2023). *Puesta a punto de un método de RT-PCR en tiempo real para la detección de Virus Sincicial Respiratorio (VSR) y comparación con métodos de rutina en el laboratorio bioquímico* [tesis de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]

Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ

<https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>

“Puesta a punto de un método de RT-PCR en tiempo real para la detección de Virus Sincicial Respiratorio (VSR) y comparación con métodos de rutina en el laboratorio bioquímico”



Carrera: Bioquímica

Instituto de Ciencias de la Salud

Alumna: Herasimiuk, Melisa Anabel

Directora: Bqa. Díaz, Rosa Viviana

Co-Director: Dr. Castello, Alejandro

Fecha de entrega: 1/05/2023

El presente trabajo ha sido llevado a cabo en el Laboratorio de Facilidades Comunes Del Centro de Medicina Traslacional (CEMET) del Hospital El Cruce de Florencio Varela bajo la dirección de la Bioquímica Rosa Viviana Díaz y la codirección del Dr. Alejandro Castello, profesor de Virología para la Carrera de Bioquímica, Instituto de Ciencias de La Salud, Universidad Nacional Arturo Jauretche.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a la directora y Bioquímica del Centro de Medicina Traslacional del Hospital del Cruce, Viviana Fanessi, que me ha permitido desarrollar el Trabajo Final en los Laboratorios de Facilidades Comunes.

En segundo lugar, a mi directora de trabajo, la Bioquímica Rosa Viviana Díaz quien no solo me ha provisto de las muestras utilizadas para el desarrollo del presente trabajo, sino que me ha ayudado, aconsejado e instruido a lo largo de todo este hermoso proceso.

En tercer lugar, a mi codirector, el Dr. y también profesor de Virología Clínica, del Instituto de Ciencias de la Salud para la carrera de Bioquímica, Alejandro Castello, por aceptar guiar mi trabajo, por abrirme las puertas del laboratorio para poder desarrollar el TF, por su constante enseñanza y acompañamiento en cada paso de esta etapa.

En cuarto lugar, pero no menos importante, a mi familia quienes han apoyado mis estudios y me han alentado a estudiar la carrera de mis sueños. Gracias especiales a mi hermana por sus consejos sobre la universidad y por siempre motivarme a seguir.

A mi maestra de quinto grado, María Inés, quien me transmitió el amor por la química y que, gracias a sus clases, hoy tan lejanas, supe que quería estudiar la carrera más hermosa, Bioquímica.

A mis amigas de toda la vida, Rebe y Agus. Gracias por su hermosa amistad, por el apoyo incondicional y la compañía. Por siempre haberme alentado a seguir. No imagino mi vida sin ustedes formando parte de ella. Las amo con todo mi corazón.

A las increíbles personas que tuve el agrado de conocer en la Universidad, a quienes hoy con mucho orgullo puedo llamar amigas. Personas que se han ganado un lugar en mi corazón y hoy son parte importante de mi vida. Gracias por haberme obligado a presentarme a finales cuando dudaba de mis capacidades y conocimientos. Gracias por explicarme lo que no entendía, por alentarme, por alegrarse por mí, por cada año compartido que fue único e increíble a pesar de que a veces las cosas no salían tal como las planeábamos. Por aquellas tardes y noches de estudio en las que nos perdíamos hablando de la vida. Sobre todo, gracias por enseñarme que este sueño compartido se celebra en conjunto, que la felicidad de tus amigas es también tu felicidad, que sus logros se celebran como propios. Por último, y a riesgo de celos, me es necesario hacer este apartado y mención especial a Natalia Moreira, una persona

(y hoy gran amiga) que conocí en las cursadas de Química Analítica y desde aquel momento empezamos a entablar una relación de compañerismo que a lo largo de cada cursada subsiguiente ha crecido y desembocado en una hermosa amistad. Tengo tanto para agradecerte que no me alcanzarían las líneas de esta página. Resumiendo, te agradezco por cada juntada de estudio, por disponer tu tiempo para mí, aunque cursáramos materias diferentes, por ayudarme siempre que podías, gracias por presumirme, por sentirte orgullosa de mí y alegrarte conmigo por cada materia o final aprobado. Me hace feliz ver lo lejos que llegaste y saber lo lejos que vas a llegar. Admiro la dedicación y esfuerzo que le ponés a todo. ¡Te quiero, amiga!

Gracias a todas las personas que se han cruzado por mi camino y que han aportado su granito de arena para que hoy yo esté acá. Gracias por cada palabra de aliento, por su preocupación por mí, por sus consejos y motivación siempre. Sobre todo, gracias por darme ese empujón final para cumplir mi sueño y recibirme.

Finalmente, y lo más importante para mí, quiero agradecer a Dios quien me ha sostenido de la mano durante toda la carrera, me ha dado las fuerzas necesarias para seguir adelante y no desmayar. Quien me ha levantado cada vez que caía, me ha guiado a lo largo de toda mi vida y gracias a quien hoy estoy donde estoy. Todo lo que he logrado y alcanzado es gracias a él. Todo se lo debo a él. ¡Te amo, Dios!

Resumen

La infección respiratoria aguda (IRA) producida por VSR es una de las principales causas de hospitalizaciones de lactantes y niños (Borchers, A. T., et al., 2013) y de una elevada morbilidad y mortalidad entre ancianos y adultos con condiciones debilitantes subyacentes. El diagnóstico preciso y rápido disminuye el uso innecesario de antibióticos y pruebas adicionales de laboratorio, el tiempo de hospitalización y la transmisión intrahospitalaria. La PCR en tiempo real es una metodología adecuada para su utilización en el laboratorio bioquímico por su velocidad, sensibilidad y la posibilidad de multiplexado, es decir la detección de cuatro o cinco patógenos simultáneamente (dependiendo de la cantidad de canales del instrumento usado). **Objetivos:** Puesta a punto de una RT-qPCR capaz de detectar VSR sobre el material de referencia. **Materiales y métodos:** Se utilizó el kit QIAprep& Viral RNA UM, Qiagen diseñado para detección de SARS-Cov-2 y otros patógenos respiratorios que realizan la RT y la PCR subsiguiente en forma directa y en un solo tubo. La reacción y detección del virus se realizó con un equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories) utilizando el canal de FAM para el VSR, el de HEX para el control endógeno y el de Cy5 para el control interno (control exógeno). Los resultados se analizaron con el Software Maestro (CFX Maestro Software, BioRad Laboratories). **Conclusiones:** Fue posible poner a punto una técnica de detección por RT-qPCR para virus sincitial respiratorio humano que resultó comparable en cuanto a su capacidad de detección a las técnicas de rutina de inmunofluorescencia directa (IFD) y amplificación isotérmica LAMP (IDNOW RSV de Abbot). Sin embargo, para los laboratorios equipados y que puedan montar esta metodología, la RT-qPCR tiene grandes ventajas dado que puede detectar presencia de virus donde LAMP o IFD no pueden, es más versátil y económica, permite la opción de multiplexado, el procesamiento de muchas más muestras por hora y la posibilidad de modificación por el operador.

Índice

Abreviaturas	7-8
1. Introducción e importancia del tema	9-10
2. VSR	11
2.1 Epidemiología	11
2.2 Clasificación y estructura	11-12
2.3 Entrada y ciclo de infección	12-14
2.4 Transmisión	14
2.5 Tratamiento	14-15
3. Diagnóstico	15
3.1 Diagnóstico Viroológico	15
3.2 Diagnóstico diferencial	15
3.3 Métodos de detección:	
3.3.1 Inmunofluorescencia (IF)	16-17
3.3.2 LAMP	17-19
3.3.3 RT-qPCR	19-22
4. Objetivos	23
5. Materiales y Métodos	24-26
6. Desarrollo	27
6.1 Preparación de primers y Probe	27
6.1.1 Primers reverse y foward RSV	27-28
6.1.2 Probe RSV	28
6.2 Kit QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen	29-30
6.3 Análisis por RT-qPCR de muestras positivas y negativas para RSV.....	31-33
6.4 Búsqueda y selección del material de referencia	34
6.5 Estimación del LOD de RT-PCR y comparación con el método molecular comercial ID NOW™ RSV de Abbott Laboratories a partir de una muestra RSV positiva.	34-35
6.5.1 Estimación del LOD de RT-qPCR y comparación con el método molecular comercial ID NOW™ RSV de Abbott Laboratories a partir de un cultivo de RSV.....	36

6.5.2 Estimación del LOD de RT-qPCR y comparación

con el método molecular comercial ID NOW™ RSV de ----- 37-41

Abbott Laboratories a partir de un extracto de cultivo de RSV

7. Resultados

7.1	Resultados corrida 1 -----	42
7.2	Resultados corrida 2 -----	43
7.3	Resultados corrida 3 -----	44
7.4	Resultados corrida 4 -----	45
7.5	Resultados corrida 5 -----	46
7.6	Resultados corrida 6 -----	47
7.7	Resultados corrida 7 -----	48-49
7.8	Resultados corrida 8 -----	50-51
7.9	Resultados corrida 9 -----	52
7.10	Resultados corrida 10 -----	53
7.11	Resultados corrida 11 -----	54-55
7.12	Resultados corrida 12 -----	56
7.13	Resultados corrida 13 -----	57
7.14	Comparación de curvas de amplificación para la determinación del LOD a partir de cultivo RSV y de extracto de cultivo de RSV -----	58
7.15	Cuadro 1. Resultados -----	59-60
7.16	Cuadro 2. Resultados -----	61
7.17	Cuadro 3. Resultados -----	62
7.18	Resultados Determinación del LOD -----	63
8.	Discusión de resultados -----	64-69
9.	Conclusiones -----	70
10.	Fuentes de información y referencias bibliográficas -----	71-74

Abreviaturas

Ab / Ac: Antibody - Anticuerpo

ADN / DNA: Ácido desoxirribonucleico

Ag: Antígeno

ARN / RNA: Ácido ribonucleico

RNA_m: Ácido ribonucleico mensajero

Buffer TE: Buffer Tris EDTA

Ct/Cq: Cycle Threshold (Umbral del ciclo)

CV: Carga viral

ECP: Efecto citopático

FDA: U.S. Food and Drug Administration / Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

Flu A/B: Influenza A-Influenza B

hMPV: Metapneumovirus humano

IF: Inmunofluorescencia

IFD: Inmunofluorescencia Directa

IgG: Inmunoglobulina G

IRA: Infección respiratoria aguda

LAMP: Loop-Mediated Isothermal Amplification / Amplificación isotérmica mediada por bucle

LOD: Límite de detección

PIV 1, 2, 3: Parainfluenza tipo 1,2 y 3

PBS: Phosphate-buffered saline / Buffer fosfato salino

RT: Transcripción reversa

RT- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa.

TRI: Tracto Respiratorio Inferior

TRS: Tracto Respiratorio Superior

VSR/ RSV: Virus Respiratorio Sincitial

1. Introducción e importancia del tema

La infección respiratoria aguda (IRA) producida por VSR es una de las principales causas de hospitalizaciones de lactantes y niños (Borchers, A. T., et al., 2013) y de una elevada morbilidad y mortalidad entre ancianos y adultos con condiciones debilitantes subyacentes (Ali, A. y et al., 2020). El diagnóstico preciso y rápido disminuye el uso innecesario de antibióticos y pruebas adicionales de laboratorio, el tiempo de hospitalización y la transmisión intrahospitalaria (Barenfanger, J., et al., 2000 ; Prendergast, C., et al., 2013). Los estudios de etiología viral son fundamentales también para determinar la incidencia en distintos grupos, su cinética de diseminación e identificación de factores de vulnerabilidad en la población (Rojo, G. L., et al., 2017). En la actualidad, la inmunofluorescencia (IF) es el método de mayor uso para detección de VSR, aunque su sensibilidad es menor en comparación con métodos de cultivo y RT-PCR. Por ejemplo, en una comparación entre la IF y reactivos multiplex de RT-PCR comerciales, de 750 muestras testeadas por IF, doscientos ochenta y ocho (38,4%) fueron positivas, mientras que otras 214 (28,5%) fueron positivas por PCR multiplex, para una tasa de positividad total del 66,9% (Gharabaghi, F., et al., 2011).

El VSR globalmente causa infecciones respiratorias que afectan a 64 millones de personas, la hospitalización de unos 3 millones de niños menores de 5 años y de aproximadamente 336.000 adultos mayores al año. Solo en pediatría se calcula un costo médico de unos 5.400 millones de dólares (Zhang, S., y col., 2020) y una mortalidad global mayor a 118.000 infantes cada año con el 99% de las muertes ocurriendo en países en desarrollo (Shi, T., et al., 2017). Por estas razones el VSR es blanco de desarrollo de vacunas desde hace más de cincuenta años. En los años 60' se probaron vacunas a virus inactivado en los EE.UU. de América con resultados trágicos ya que se produjeron casos más severos (y dos muertes) cuando los vacunados fueron naturalmente infectados con el virus. Es decir, se observó el efecto contrario a la protección buscada, supuestamente porque las vacunas a virus inactivado generaban respuesta de tipo Th2 y deficientes respuestas de linfocitos T citotóxicos (Acosta, P. L., et al., 2015). Actualmente hay muchos desarrollos en marcha en fases preclínicas y clínicas, con cuatro que ya han alcanzado la fase III, incluyendo vacunas a mRNA y a vector Adenovirus (Biagi, C., et al., 2020). Si bien las vacunas se destinarán a proteger poblaciones susceptibles de infección severa (niños pequeños y tercera edad), las pruebas clínicas actuales se enfocan en poblaciones de mayores de 60 años. También se están utilizando estrategias de inmunización de embarazadas para obtener protección en el recién nacido por pasaje de anticuerpos transplacentarios y vía amamantamiento con muy buenos resultados preliminares. En este marco de activa investigación y pruebas de eficacia de nuevas vacunas y,

posteriormente, cuando se evalúe la implementación de programas será necesario contar con métodos de detección sensibles (sobre todo para adultos) y de amplia disponibilidad.

La PCR en tiempo real es una metodología adecuada para su utilización en el laboratorio bioquímico por su velocidad, sensibilidad y la posibilidad de multiplexado, es decir la detección de cuatro o cinco patógenos simultáneamente (dependiendo de la cantidad de canales del instrumento usado). Por otro lado, la introducción de la real time PCR (qPCR) fue de gran importancia para hacer posible su uso en el laboratorio bioquímico clínico ya que, a diferencia de las técnicas de PCR de punto final cuyo paso de amplificación y análisis requiere de al menos un ambiente segregado y con presión negativa para evitar contaminaciones, la real time puede realizarse en el ambiente general de laboratorio ya que el análisis no requiere de apertura de tubos con amplicones. También es importante destacar que desde principios de 2020 tanto el gobierno nacional como los gobiernos provinciales y/o locales han realizado un gran esfuerzo para poder establecer una red de laboratorios de diagnóstico molecular basado en real time PCR en el contexto de la pandemia de COVID19. Esta circunstancia ha posibilitado un avance en capacitación de recursos humanos e incorporación de equipamiento (sólo en provincia de Buenos Aires hay 82 laboratorios que realizan qPCR y LAMP) por lo que sería ideal poder aprovechar estas nuevas condiciones e incorporar alternativas al diagnóstico de rutina del VSR. En ese sentido, el presente trabajo propone la puesta a punto de una metodología simple desde la extracción del RNA, la transcripción reversa y la qPCR para la detección de VSR en muestras de hisopado nasofaríngeo y una comparación inicial con los resultados obtenidos por IF. En este caso se comparará también con una técnica molecular de amplificación isotérmica comercial (ID NOW™ RSV, Abbott Laboratories) ya que las dos técnicas son actualmente utilizadas en el laboratorio del Hospital Mi Pueblo de Florencio Varela.

2. Virus Respiratorio Sincitial (VSR)

2.1 Epidemiología

El VSR es el principal agente causal de bronquiolitis, bronquitis y neumonía en lactantes. Aunque puede afectar a todos los grupos etarios, la primoinfección suele ocurrir en los primeros meses a 2 años de vida siendo la causa más común de hospitalización en bebés (Geoghegan, S., et al., 2017 ; Shi, T., et al., 2017). Tiene una estacionalidad marcada que comprende desde otoño a primavera. Afecta principalmente al tracto respiratorio inferior (Shi, T., y et al., 2017).

2.2 Clasificación y estructura del VSR

Según la última clasificación de la ICTV el VSR pertenece a la familia *Pneumoviridae*, género *Orthopneumovirus*, especie *Orthopneumovirus hominis*. Su genoma consiste en RNA monocatenario unimolecular (no segmentado) de polaridad negativa e integra la clase 5 de Baltimore. Rodeando el material genético se expresa la nucleoproteína o nucleocápside (NP), luego una proteína de matriz (M) tapizando el interior de la envoltura y finalmente la envoltura en si misma constituida por una bicapa lipídica (derivada de la membrana plasmática de la célula huésped) donde se expresan las principales proteínas de superficie: glicoproteínas F (de fusión) y glicoproteínas G (de unión), características de este

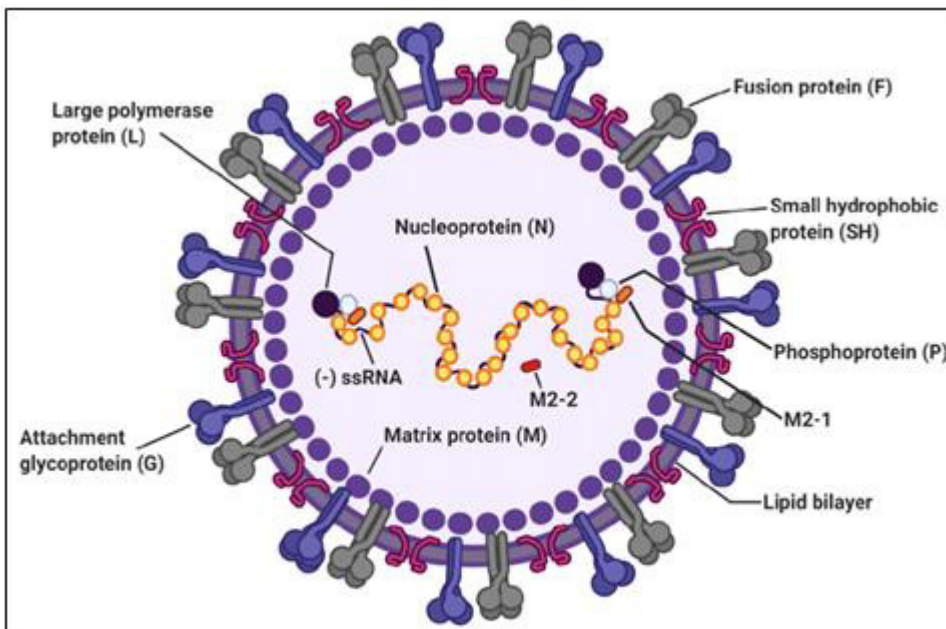


Figura 1. Estructura del Virus Respiratorio Sincitial (VRS)

virus y esenciales para la patogenia e infectividad del virus. Además, se expresan pequeñas proteínas hidrofóbicas no glicosiladas, SH (su función actualmente no se conoce bien). La proteína G es responsable de la unión a la superficie celular que consecuentemente conduce a la fusión de membranas (viral con

celular) mediada por la proteína F. La proteína de fusión también facilita la infectividad y diseminación viral dando lugar a la formación de sincitios (su característico efecto citopático) por la unión de células infectadas a células adyacentes no infectadas (Borchers, A. T., et al., 2013).

2.3 Entrada y ciclo de infección

La entrada del Virus Respiratorio Sincitial a la célula huésped se puede llevar a cabo mediante dos mecanismos diferentes: (Barenfanger, J., et al., 2000 ; Srinivasakumar, N., et al., 1991.)

1. **Fusión de la membrana celular con la envoltura viral:** (Mecanismo más aceptado y eficiente) (Barenfanger, J., et al., 2000 ; Knipe, David M, et al., 2013) mediada por las proteínas transmembrales de superficie del VSR, las proteínas F y G. La glicoproteína G de unión interacciona con glicosaminoglucanos (GAG) celulares, principalmente proteoglicanos de

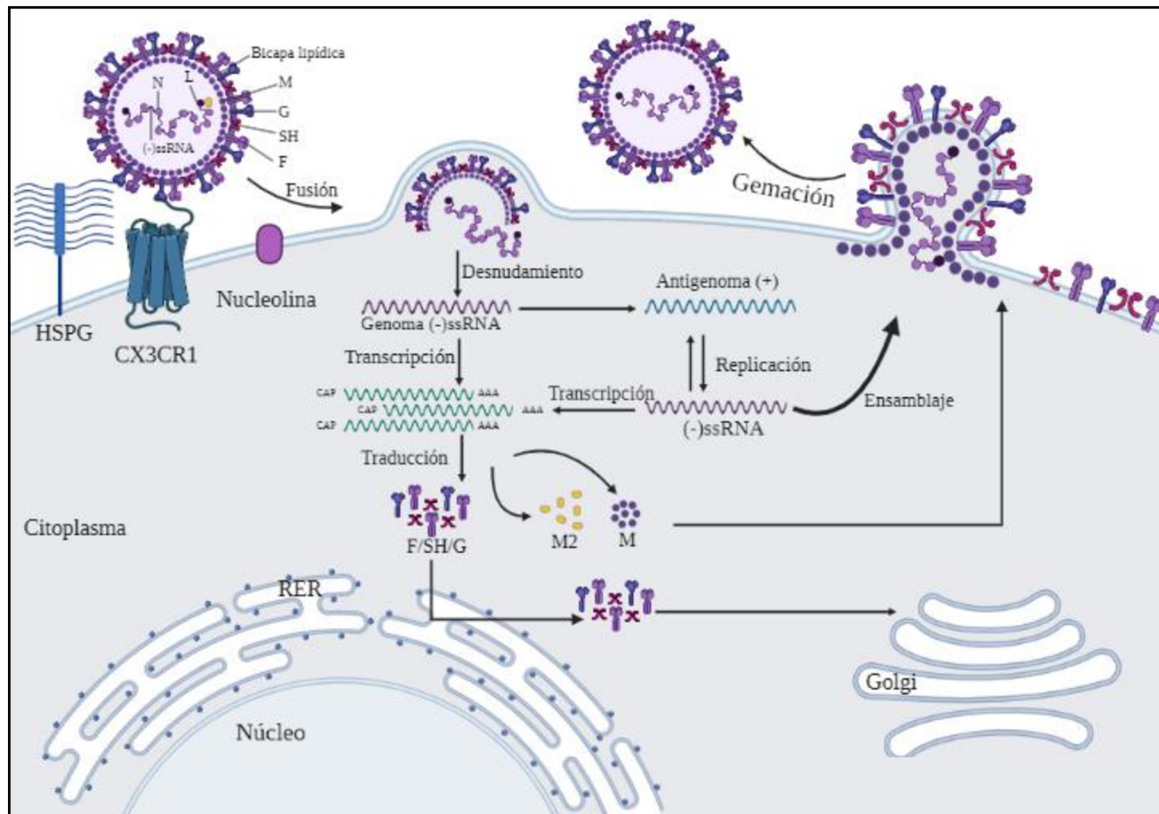


Figura 2. Ingreso de VRS por interacción de las glicoproteínas virales con los receptores celulares y posterior fusión de membranas. Imagen diseñada particularmente para este trabajo.

heparán sulfato (HSPG) y CX3CR1 (receptor de quimioquinas), sufre cambios conformacionales que, consecuentemente induce cambios conformacionales en la proteína de F permitiendo que el

péptido de fusión comience a insertarse en la membrana de la célula huésped con la consiguiente fusión de las membranas (viral y celular). En un evento posterior da lugar a la formación de sincitios. El receptor putativo para RSV-F es la nucleolina. (Barenfanger, J., et al., 2000; Boom, R., et al., 1990 ; Borchers, A. T., et al., 2013 ; Richman, D. D., et al., 2017)

2. **Endocitosis mediada por clatrina:** (Mecanismo menos eficiente) Una vez que la partícula viral es endocitada, tiene lugar la fusión de membranas (endosomal y la membrana viral) mediada por las proteínas virales F y G. (Barenfanger, J., et al., 2000 ; Knipe, David M, et al., 2013)

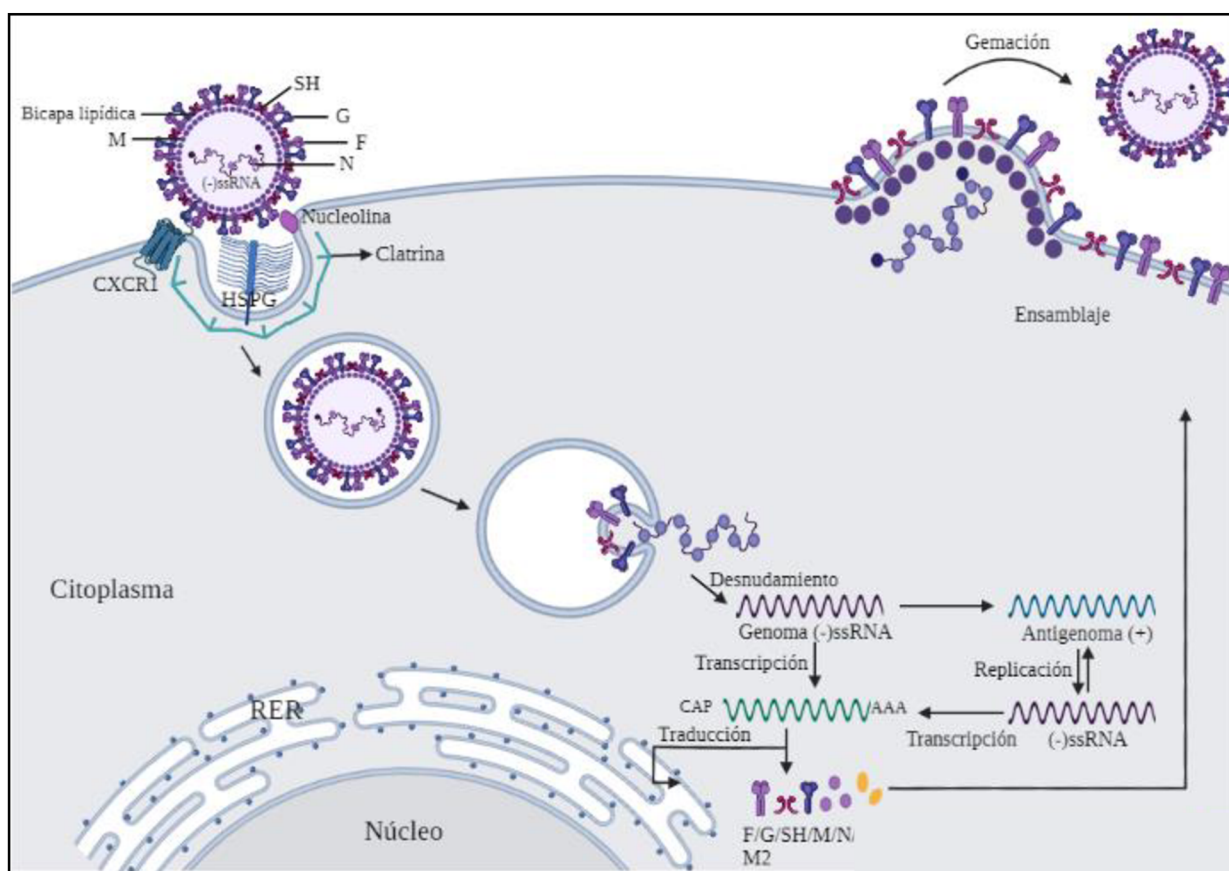


Figura 3. Ingreso de VRS mediante endocitosis mediada por clatrina. Imagen diseñada particularmente para este trabajo.

Luego de la entrada del RSV a la célula epitelial se libera el material genético rodeado de la nucleocápside, se produce el desnudamiento del mismo para dar lugar a la transcripción y replicación en el citoplasma. Estos procesos ocurren de forma simultánea. La cadena de RNA de sentido negativo sirve como molde para la síntesis de RNA de polaridad positiva cuya función es ser RNA mensajero para la

producción de las proteínas (traducción en el RER) tanto tempranas (polimerasas, por ejemplo) como tardías (estructurales) y como molde para la síntesis de RNA de polaridad negativa. Finalmente se ensambla la partícula viral y se libera por gemación.

2.4 Transmisión

Las principales formas de transmisión del VRS ocurren por contacto directo con una persona infectada, por fomites contaminados y aerosoles de partículas grandes (liberados por la tos o estornudo de personas cursando infección por VRS). La inoculación directa y la autoinoculación en los ojos y nariz por secreciones infecciosas, también ocupan un lugar importante en la transmisión del VRS. (Aranda, S. S., et al., 2019 ; Borchers, A. T., et al., 2013 ; Richman, D. D., et al., 2017).

2.5 Tratamiento

El tratamiento consiste en la profilaxis inmunológica para los casos más graves (por su elevado costo) y terapia de apoyo para niños y adultos previamente sanos e inmunocompetentes infectados. La inmunoprofilaxis se basa en el uso de anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos contra las proteínas de superficie de unión (G) y fusión (F) del Virus Respiratorio Sincitial. El principal utilizado es Palivizumab, de tipo IgG, cuyo blanco de unión es el sitio antigénico de la glicoproteína RSV-F. Su administración es vía intramuscular y se reserva para los grupos de alto riesgo tales como niños con enfermedades crónicas, prematuros (menos de 35 semanas de gestación), cardiopatía congénita hemodinámicamente significativa o con enfermedad pulmonar crónica. (Ali, A., et al., 2020)

Si bien se han desarrollado y estudiado otros anticuerpos monoclonales tales como Motavizumab y Suptavumab no han pasado la fase III de desarrollo farmacéutico debido a problemas de seguridad y fueron suspendidos por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos).

La terapia de apoyo reside en la administración de broncodilatadores, antipiréticos, corticoesteroides (para pacientes con EPOC o asma) y suplementos de oxígeno. (Borchers, A. T., et al., 2013).

Actualmente, no existen vacunas (inmunización activa) aprobadas contra la infección por RSV aunque se está muy cerca del licenciamiento de una de aplicación en adultos. Sin embargo, hay varias vacunas en proceso de desarrollo (basadas en partículas, a subunidad, a vectores y atenuadas) y las mismas se están diseñando contra la proteína de superficie RSV-F dado que está más altamente

conservada respecto de la glicoproteína RSV-G. Se está buscando la inmunización materna a fin de que los Ac generados por el sistema inmune de la madre sean transferidos por placenta al bebé.

3. Diagnóstico

3.1 Diagnóstico virológico

Establecer un diagnóstico virológico concreto y rápido es crucial para la administración de un tratamiento antiviral adecuado, reducir el número y el tiempo de hospitalizaciones (con ello también el riesgo de adquirir infecciones nosocomiales), implementar medidas de control adecuadas para el virus en circulación (vigilancia epidemiológica), y reducir el uso inadecuado de antimicrobianos.

En particular, es importante instaurar un diagnóstico preciso para VRS dada su alta tasa de morbi-mortalidad en lactantes de 0 a 24 meses de vida y en ancianos o pacientes inmunocomprometidos a fin de adoptar decisiones clínicas inmediatas que repercutan en la atención al paciente.

3.2 Diagnóstico diferencial

El diagnóstico definitivo requiere del laboratorio para una adecuada identificación del agente viral causal de la patología en el paciente. Existen métodos de diagnóstico virológicos directos (se basan en la detección del antígeno) e indirectos (basados en la detección de la respuesta inmunológica o anticuerpos). Entre los métodos directos encontramos: cultivo celular, RT-qPCR, prueba rápida de Ag, inmunofluorescencia directa, entre otros. En el presente trabajo, se desarrollará una comparativa entre métodos de detección que se basan en la detección de Ag, es decir, nos centraremos pura y exclusivamente a métodos directos tales como IFD, LAMP y RT-qPCR adaptados para la detección específica de VRS.

3.3 Métodos de detección

3.3.1 Inmunofluorescencia (IF)

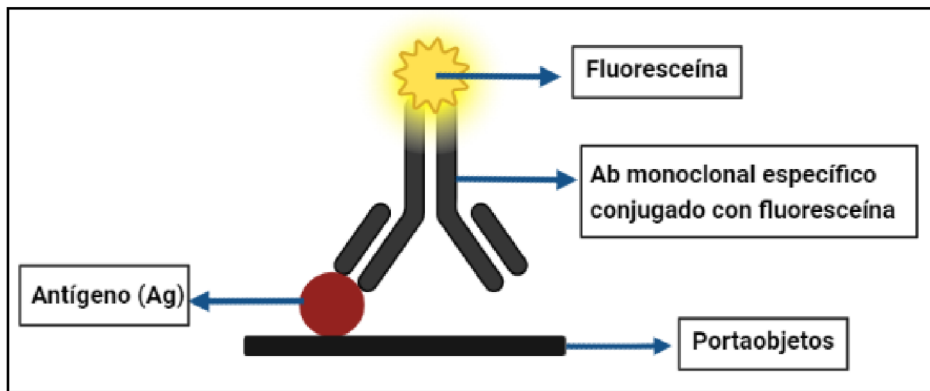


Figura 4. Esquema del fundamento de IFD diseñado para este

La IF es una técnica muy utilizada en la detección de virus respiratorios. Existe en dos formatos: directo (primer Ac marcado) e indirecto (segundo Ac marcado).

Para la realización del presente trabajo se ha llevado a cabo la forma directa. Esta técnica consiste en la inmunomarcación de células epiteliales del tracto respiratorio adheridas a un soporte sólido (portaobjeto) con un anticuerpo monoclonal específico marcado con un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína que es el más común). Se lo incubaba a 35°-37°C bajo condiciones de humedad para evitar la deshidratación de las células y permitir la interacción Ag-Ac. Finalmente, se realiza un lavado para eliminar el exceso de anticuerpo monoclonal no unido y se procede a la visualización bajo microscopio de fluorescencia. Las células infectadas por el virus se visualizan por la fluorescencia de color verde manzana que emiten las zonas intracelulares con el antígeno específico de VSR en tanto que el resto de la célula y aquellas no infectadas emiten una fluorescencia de color rojo por el colorante Azul de Evans que se agrega a la reacción como contracolor. Cada virus tiene un patrón de tinción típico. Para la infección por RSV consiste en fluorescencia verde citoplasmática punteada y con pequeñas inclusiones.

Esta metodología requiere de un buen conteo de células en la impronta y un porcentaje de células infectadas relativamente alto para que sea suficientemente sensible en el uso clínico. Por esta razón es una técnica más útil en pacientes pediátricos que en individuos adultos dado que en los niños se observa un número mayor de células infectadas que en los adultos. Por razones similares, es importante que la toma de muestra sea de buena calidad para poder realizar improntas con cantidades importantes de células.

En este trabajo, se ha utilizado el kit D³ Ultra 8™ DFA Respiratory Virus Screening & Identification, el cual como su nombre lo indica permite la detección e identificación de 8 virus

respiratorios (RSV, PIV 1,2,3, hMPV, Flu A, Flu B y adenovirus) a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos. El kit incluye reactivos de detección por inmunofluorescencia directa (DFA = *Direct Fluorescence Assay*) ya que están compuestos por anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína. Por un lado, el kit incluye un vial con una mezcla de 8 Ac monoclonales marcados, cada uno dirigido contra cada uno de los 8 virus y por otro lado viales individuales (DFA) con cada Ac monoclonal marcado dirigido contra un solo virus. Inicialmente, se realiza la detección de virus en la muestra haciendo un tamizaje con la mezcla y, en caso de resultar positivo, posteriormente se procede a la identificación con los monoclonales individuales.

Entre las **desventajas** de este método se incluyen:

- La necesidad de disponer de un microscopio de fluorescencia y de personal entrenado en la interpretación de resultados.
- El rendimiento es relativamente lento en comparación con otras metodologías rápidas de detección de antígeno.
- Un resultado negativo no excluye la presencia de virus respiratorio. Podría deberse a una muestra mal recogida, conservada o transportada. Además, si la celularidad es baja, se pueden obtener falsos negativos. Dado que utiliza anticuerpos monoclonales altamente específicos dirigidos contra epítopes únicos generados contra cepas de virus definidos no es posible excluir la posibilidad de que, por mutaciones, se pierda ese epítopo en alguna cepa viral salvaje y pueda no ser detectada.

Ventajas:

- No requiere de la realización de cultivos
- Permite obtener resultados rápidos

3.3.2 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Es una técnica rápida y directa de diagnóstico molecular in vitro que se basa en la amplificación isotérmica del material genético a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos para la detección cualitativa del gen viral. Esta prueba no requiere de un paso de extracción previa del material genético ya que, supuestamente (dado que se trata de tecnología propia del fabricante no revelada al usuario), este paso lo realiza el equipo en la fase de elución.

En este trabajo se ha utilizado el equipo ID NOW™ RSV, Abbot. Se utiliza como ayuda en el diagnóstico en niños y adultos mayores a 60 años con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. Los resultados se expresan como “detectable” o “no detectable”. El Kit cuenta con los componentes necesarios para el ensayo:

- ❖ **Base de prueba de plástico naranja:** Contiene dos tubos de reacción con un sedimento liofilizado y los reactivos necesarios para la amplificación específica del RSV (A y B). Además, tienen moldes (“similares a primers” según el inserto) específicos para amplificar una región del gen NS2 como diana para RSV-A y una región del gen N como diana para RSV B. La amplificación es detectada mediante “molecular beacons” que consisten en sondas cuyos extremos 5’ y 3’ tienen

unidos covalentemente un fluoróforo y un quencher respectivamente y, en estado libre ambos extremos auto-hibridan de forma que la molécula no emite fluorescencia. Cuando se acumula amplificación



Figura 5. Equipo ID NOW™ RSV. (Imagen extraída del inserto del kit)

que une estas sondas la hibridación con la zona específica separa físicamente el fluoróforo del quencher y se detecta fluorescencia.

- ❖ **Un cartucho de transferencia de plástico blanco:** Transfiere 200 ul de la muestra eluida desde el receptor de muestra a la base de prueba para dar inicio a la amplificación del gen blanco.
- ❖ **Un receptor de muestra de plástico azul:** Contiene 2,5 ml del buffer de elución y es el sitio donde se añade la muestra.
- ❖ **Control interno:** Verifica el estado de los reactivos y el proceso de amplificación y detección de la prueba.

- ❖ **Controles externos (positivos y negativos):** Consiste en un hisopo de control positivo para RSV e hisopos estériles que funcionan como control negativo. Estos controles permiten la monitorización completa del ensayo.

Ventajas

- Sensibilidad y especificidad del 98%
- Resultados precisos en 13 minutos o menos
- Almacenamiento a temperatura ambiente por lo que no se requiere refrigeración
- Permite la toma de decisiones clínicas rápidas
- Fácil de usar
- Método molecular que no requiere termociclador

Desventajas

- El rendimiento de la técnica ID NOW RSV depende de la carga viral de RNA
- La posibilidad de obtención de falsos negativos por presencia de mutaciones en la secuencia genética del RSV que no le permite ser detectados o los detecta, pero en forma menos eficaz. El test también puede rendir falsos negativos por muestras mal recogidas, acondicionadas o mal transportadas. Un resultado negativo no garantiza la ausencia de infección por RSV
- Sensible a reactividad cruzada que puede abocar en resultados erróneos
- No tiene una significancia cuantitativa del microorganismo infeccioso.
- Sensible a contaminación e inhibición.
- Reactivo caro y la provisión es dependiente de importación.
- El cliente es “cautivo” del equipamiento e insumos provistos por el fabricante.
- No cuenta con control endógeno.

3.3.3 RT-qPCR

Cuando el virus a detectar tiene genoma RNA, el mismo debe ser retrotranscrito a DNA (cDNA) como paso previo a la amplificación utilizando una enzima llamada transcriptasa reversa. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) con transcripción reversa o retro transcripción previa se denomina RT-qPCR y es una técnica cuantitativa que permite la detección y amplificación del ARN

viral. El material clínico de partida contiene, en este caso RNA en las partículas virales del VSR por lo que se lleva a cabo un paso previo de extracción del RNA que puede realizarse de distintas formas:

A. Por método de extracción en columna basado en la técnica original de Boom et al.

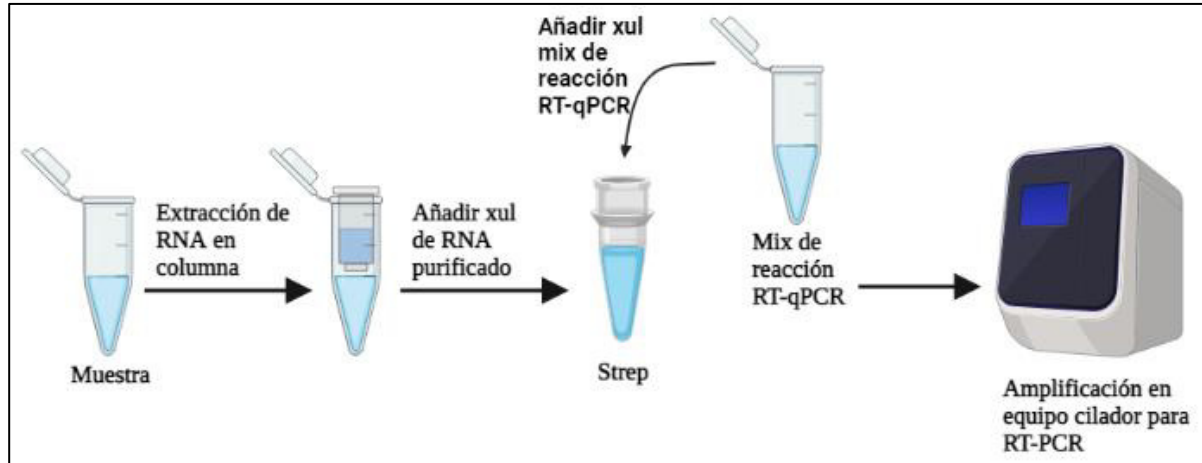


Figura 6. RT-qPCR con previa extracción en columna del RNA. (Imagen diseñada para el trabajo)

B. Mediante el uso de buffer de lisis. Para lo cual se debe incubar previamente la muestra con un buffer de lisis de composición diversa generalmente basado en detergentes suaves y agentes caotrópicos. Varios kits de diagnóstico contienen estos buffers sin mencionar su composición. Un volumen de muestra se mezcla con estas soluciones para permitir la liberación del material genético por el tiempo indicado por el fabricante del reactivo.

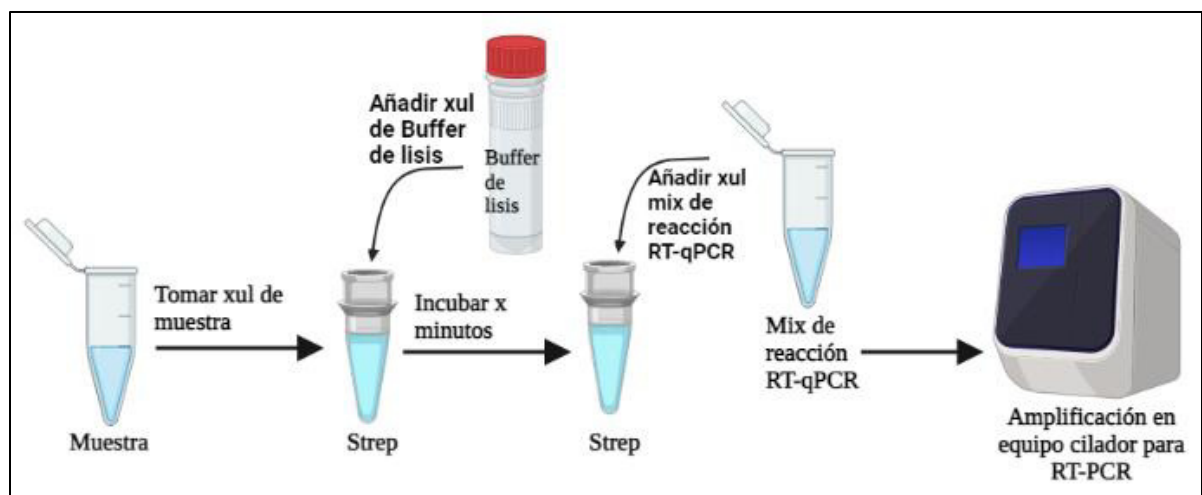


Figura 7. RT-qPCR con buffer de lisis. (Imagen diseñada para el trabajo).

Una vez realizada la extracción los tubos conteniendo el RNA se mantienen sobre hielo para evitar o minimizar la actividad de RNAsas. Se añade a cada tubo la mix de reacción que consiste en una mezcla de dNTPs, buffer de reacción, primers reverse, forward, probe completándose el volumen con agua destilada libre de RNAsas. La mix es previamente preparada y se distribuye en las cantidades apropiadas en cada tubo que generalmente forma parte de un strip de 8. El volumen final de reacción es de 20 ul por tubo de reacción, lo cual finalmente se lleva al equipo termociclador en tiempo real previamente configurado (Para este trabajo se usó el equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System de BioRad Laboratories). La mix utilizada en este trabajo contiene las enzimas necesarias para realizar el paso de retrotranscripción mediante una retrotranscriptasa (RT) y la amplificación posterior mediante una DNA polimerasa termoestable (Taq Pol). Una vez en el equipo, se lleva a cabo un programa que incluye un paso previo donde el RNA es copiado a DNA a partir de la actividad de la RT manteniendo la mezcla 15-30 minutos a unos 45-50°C . A continuación, ese cDNA sirve como molde para la amplificación y generación de muchas copias de DNAc por lo que el programa continúa con un paso de inactivación de la RT y activación de la TaqPol en la mix. Esto se logra elevando la temperatura a 95°C unos 5-15 minutos. Luego de este paso el programa incluye de 35 a 40 ciclos de amplificación por PCR a las temperaturas de desnaturalización e hibridación/extensión.

Ventajas

- Método altamente sensible.
- Permite visualizar resultados en tiempo real mientras las muestras son analizadas.
- Permite analizar hasta 96 muestras en simultáneo y de esta manera obtener múltiples resultados en aproximadamente una hora.
- Permite el diseño y rediseño de las técnicas por el usuario según sus necesidades.
- Costo relativamente bajo con respecto a técnicas “cautivas”.

Desventajas:

- Esta metodología es sensible a la contaminación dando lugar a falsos positivos.
- Sensible a inhibidores presentes en la muestra que pueden dar lugar a falsos negativos
- Posibilidad de obtención de falsos negativos por presencia de mutaciones en la secuencia genética del RSV que no le permite ser detectados o los detecta, pero en forma menos eficaz.

- El test también puede rendir falsos negativos por muestras mal recogidas, acondicionadas o mal transportadas.
- Alto costo del equipamiento.
- No todos los centros de atención a la Salud cuentan con cicladores en tiempo real.

4. Objetivos

- 1) Puesta a punto de una q-PCR con transcripción reversa previa, o sea una RT-qPCR capaz de detectar VSR sobre el material de referencia.
- 2) Obtener muestras de hisopados nasofaríngeos positivas y negativas para VSR identificadas por IF y el método comercial de amplificación isotérmica altamente sensible en uso en el laboratorio del Hospital Mi Pueblo. Las muestras se almacenarán a -80°C hasta su uso y se estima contar con al menos unas 15 a 30 muestras positivas por cada método y otro tanto de muestras negativas y positivas para otros agentes respiratorios para realizar la comparación inicial.
- 3) Realizar la puesta a punto de la extracción de RNA a partir de las muestras de hisopados nasofaríngeos.
- 4) Estimar el límite de detección (LOD) de nuestro RT-qPCR sobre diluciones seriadas del material de cultivo y/o sobre diluciones seriadas de una muestra de bajo Ct. Este LOD será comparado con el método molecular comercial ID NOW™ RSV de Abbott Laboratories.

5. Materiales y métodos

Muestras: Para el presente trabajo se analizaron 73 muestras de hisopados nasofaríngeos provenientes de las salas de neonatología y pediatría del HGZA Mi Pueblo de Florencio Varela. Dichas muestras, correspondientes a los períodos que se extienden de mayo a septiembre del año 2021, de julio a septiembre de 2022 y de enero a marzo de 2023, fueron estudiadas para la detección e identificación de 9 virus respiratorios por las técnicas de IFD y amplificación isotérmica. Los virus incluidos en la rutina son SARS-Cov-2, VSR, influenza A y B, parainfluenza 1, 2 y 3, metapneumovirus y adenovirus.

Cabe aclarar que las muestras fueron conservadas a -4°C hasta el momento de ser remitidas a nuestro laboratorio donde se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

Del total de muestras, 40 eran positivas para RSV, 11 positivas para hMPV, 2 positivas para Flu A, 7 positivas para Flu B y 13 negativas para los 9 virus respiratorios (adenovirus, RSV, hMPV, Influenza A, Flu B, Parainfluenza 1, 2 y 3y SARS-COV). Al mismo tiempo, las muestras que resultaron ser negativas para los 9 virus respiratorios fueron analizadas en un trabajo paralelo en búsqueda de rinovirus, dando negatividad también para ese virus.

Controles: Para este ensayo, se utilizó como control positivo una muestra positiva para RSV (RM00017) confirmada por amplificación isotérmica, la cual fue acondicionada, alicuotada y almacenada a -20°C . El control negativo consistió en agua destilada. Adicionalmente, se contó con control interno (el cual nos permitió evaluar el potencial inhibitorio de las muestras sobre los procesos enzimáticos de detección) y un control de celularidad (para evaluar la calidad de la muestra) provistos por el kit QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen empleado.

Procesamiento de la muestra: El kit utilizado para la amplificación (QIAprep& Viral RNA UM, Qiagen) está optimizado para la preparación ultrarrápida de muestras de virus de RNA envueltos a partir de muestras humanas. Dado que este método utiliza un buffer de lisis adecuado para virus envueltos como el VSR esperamos un buen desempeño.

Transcripción reversa (RT) y amplificación (PCR) en tiempo real: Se utilizó un kit diseñado para detección de SARS-Cov-2 y otros patógenos respiratorios que realizan la RT y la PCR subsiguiente en forma directa y en un solo paso. El método puesto a punto se usó con el juego de primers y sondas originalmente descritas por Fry y colaboradores (sección 6) Ver figura 8 y 9. La reacción y detección

del virus se realizó con un equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories) utilizando el canal de FAM para el VSR, el de HEX para el control endógeno y el de Cy5 para el control interno. Los resultados fueron analizados con el Software Maestro (CFX Maestro Software, BioRad Laboratories).

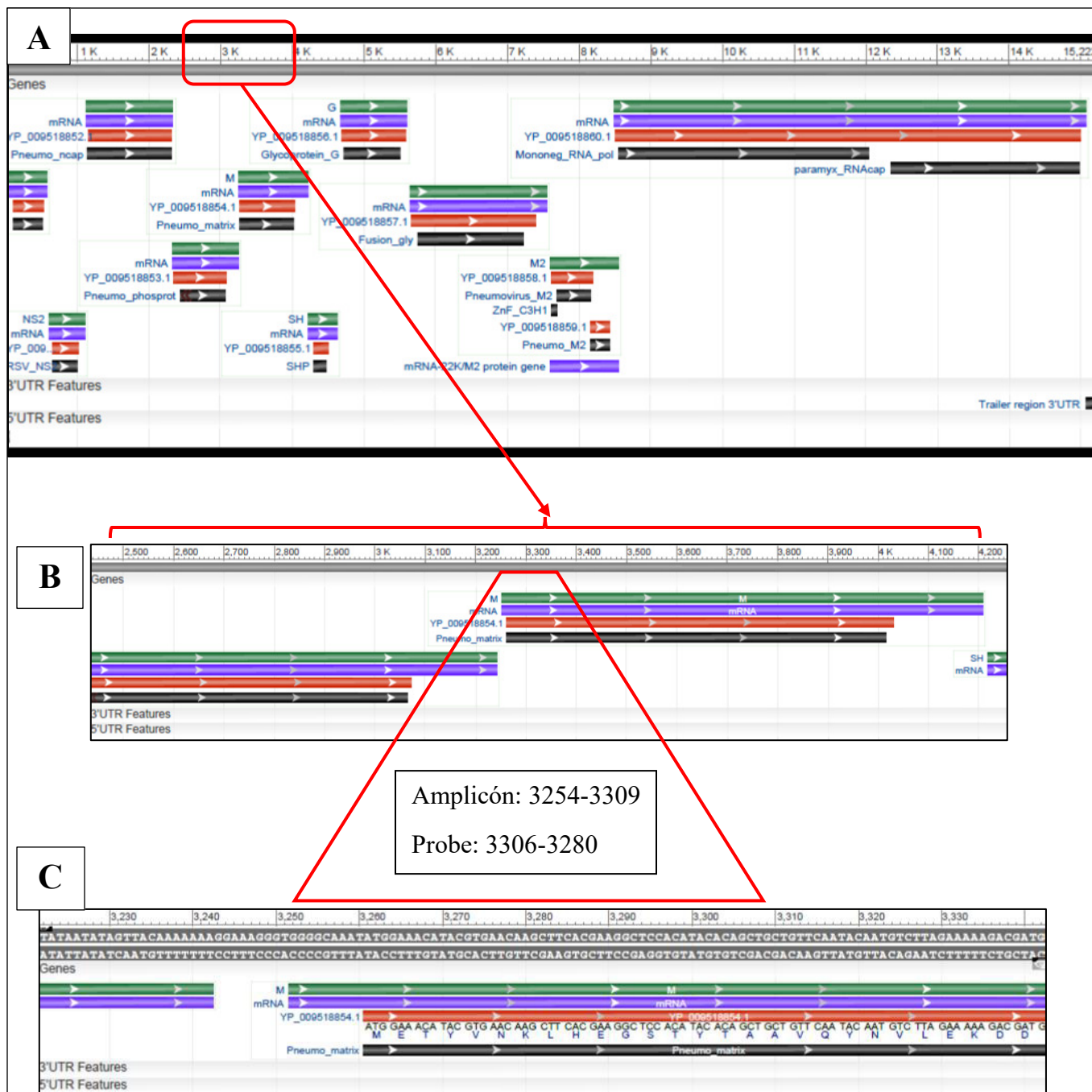


Figura 8. A) Secuencia genética RSV. B) Amplicón. C) Hibridación de probe. Imagen derivada de la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) del NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda MD, USA)

3061 AAGATTTCTG ATTAGTTACC ACTCTTCACA TCAACACACA ATACCAACAG AAGACCAACA
3121 AACTAACCAA CCAATCATC CAACCAAACA TCCATCCGCC AATCAGCCAA ACAGCCAACA
3181 AAACAACCAG CCAATCCAAA ACTAACCACC CGGAAAAAAT CTATAATATA GTTACAAAAA
3241 AAGGAAAGGG TGGGGCAAAT ATGGAAACAT ACGTGAAACA GCTTCACGAA GGCTCCACAT
3301 ACACAGCTGC TGTTC AATAC AATGTCTTAG AAAAAGACGA TGACCCTGCA TCACTTACAA
3361 TATGGGTGCC CATGTTCCAA TCATCTATGC CAGCAGATTT ACTTATAAAA GAACTAGCTA
3421 ATGTCAACAT ACTAGTGAAA CAAATATCCA CACCCAAGGG ACCTTCACTA AGAGTCATGA
3481 TAAACTCAAG AAGTGCAGTG CTAGCACAAA TGCCCAGCAA ATTTACCATA TGCGCTAATG

PRIMERS

PROBE

Figura 9. Fragmento de la secuencia de RSV donde hibridan los primers y la probe. Imagen extraída de la secuencia en FASTA en GenBank del orthopneumovirus humano subgrupo A (NCBI Reference Sequence: NC_038235.1)

6. Desarrollo

6.1 Preparación de primers y probe

Inicialmente, se resuspendieron en buffer TE (Tris EDTA) estéril y autoclavado los primers específicos para RSV, forward y reverse (ver a continuación), y la probe siguiendo las indicaciones en el inserto del fabricante (Eurofins Genomics, Louisville, KY) para la preparación de soluciones madre 100 uM. A continuación, se prepararon diluciones de trabajo con el mismo buffer llevando los primers a la concentración de 20 uM y el probe a 10 uM.

6.1.1 Secuencias de primers y probes según Fry, et al. y diluciones

PRIMER FOWARD-RSV

5'GGCAAATATGGAAACATACGTGAA3'

Para la resuspensión a una concentración 100 uM se indica en inserto adicionar 14186 ul. Para no utilizar tanto volumen, se prepara y se almacena a -20°C una solución madre con una concentración de 300 uM. Para ello, se realizaron los siguientes cálculos:

$$V_i \cdot C_i = V_f \cdot C_f$$

$$100 \text{ uM} \cdot 14186 \text{ ul} = 300 \text{ uM} \cdot V_f \text{ de donde se despeja } V_f = 4278 \text{ ul de Buffer TE}$$

Como el tubo del primer forward solo tiene una capacidad máxima de 2000 ul, se adicionaron 2000 ul, se homogeneizó bien y se alicuotó 500 ul en 4 tubos eppendorf de 1,5 ml. A estos tubos se los llevó a 1069 ul con buffer TE para obtener 4 tubos con solución madre de primer forward a una concentración de 300 uM. A partir de esta solución se realizan alícuotas de dilución de trabajo 20 uM. y para ello se realizaron los siguientes cálculos para un volumen final de 300 ul:

$$V_i \cdot C_i = V_f \cdot C_f$$

$$300 \text{ uM} \cdot V_i = 20 \text{ uM} \cdot 300 \text{ ul de donde se despeja:}$$

$$V_i = 20 \text{ ul (20 ul de solución madre + 280 ul de Buffer TE)}$$

Cálculos similares se realizaron para la resuspensión del primer reverse y el probe, cuyas secuencias se describen abajo

PRIMER REVERSE-RSV

5'TCTTTTTCTAGGACATTGTAYTGAACAG3'

6.1.2 PROBE RSV

5'[6~FAM] CTGTGTATGTGGAGCCTTCGTGAAGCT [BHQ1a~Q]3'

Para resuspender RSV-P se siguió el protocolo indicado por el fabricante y para eso se añadieron 406 ul de buffer TE (Tris EDTA) estéril, para obtener una solución madre de concentración 100uM. Se homogeneizó bien.

A partir de esta solución madre se realizó una dilución 1/10 para llevarlo a una concentración de 10uM. En este caso se debe tener especial cuidado en la exposición a la luz del probe por la fotosensibilidad del fluoróforo. Los procedimientos se realizan rápidamente minimizando el tiempo de exposición a la luz y los tubos contenedores se protegen con papel aluminio para su almacenamiento y manipulación.

6.2 Kit QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen

El KIT QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen es un método optimizado para la detección de virus RNA a partir de muestras como los hisopados nasofaríngeos. El Kit cuenta con los siguientes reactivos:

- **Viral RNA Master Mix:** Contiene todos los reactivos necesarios y permite que la reacción se lleve a cabo en un solo tubo: DNA polimerasa modificada por recombinación (inactiva a T° ambiente, se activa a 95°C), transcriptasa inversa (modificada por recombinación, se activa durante el paso de la transcripción inversa a 50°C y se inicia la síntesis de ADNc), buffer y mezcla de dNTPs (dNTC, dNTG, dNTA, dNTT).
- **Human Sampling IC Assay:** Es un control de muestra también llamado control endógeno que consiste en una mezcla de cebador y sonda marcada con colorante que se detecta en el canal HEX y está dirigido contra dos transcriptos humanos (RNAasaP y B2M) a fin de confirmar que el tubo contiene muestra y que el RNA no se ha deteriorado, degradado o que la muestra fue tomada adecuadamente o no. Es un control de celularidad.
- **RNA IC Template Assay:** Es un control interno positivo (exógeno) que se detecta en el canal Cy5 y cuya función es ser control de inhibición, indicar fallas del instrumento o errores en la configuración del ensayo. Consiste en RNA sintético y mezcla de cebador y sonda marcada con fluoróforo.
- **Viral RNA UM Prep Buffer:** Su función es liberar las moléculas de RNA de las envolturas que los rodean y de esta manera prepara las muestras para la detección del virus, no inactiva el virus.

Gracias a este kit, el flujo de trabajo consiste en pocos pasos y es optimizado. La siguiente imagen representa, de forma esquemática y sencilla el flujo de trabajo en el laboratorio utilizando estos reactivos:



Figura 10. Flujo general de trabajo con el Kit QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen. Imagen diseñada para el trabajo

A partir del protocolo propuesto por el manual de instrucciones del kit de reactivos (QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen) se adaptó para ser utilizado en la detección de RSV y de esta forma se estableció el protocolo de trabajo para la preparación de la mezcla de reacción utilizada en cada corrida.

QIAprep & Viral RNA UM Kit	Volumen (ul) por reacción	Concentración final
Viral RNA Master Mix, 4X	5	1x
20x primer forward	1	1 uM
20 x primer reverse	1	1 uM
10x probe VRS	0.2	0,1 uM
10x RNA IC Template (Cy5)	2	1x
20x Human Sampling IC (HEX)	1	1x
8 ul de muestra + 2 ul Viral RNA UM Prep Buffer	10	
Vol final	20.2	

Tabla 1. Mix de reacción preparada para cada procesamiento de muestras realizado en el presente trabajo

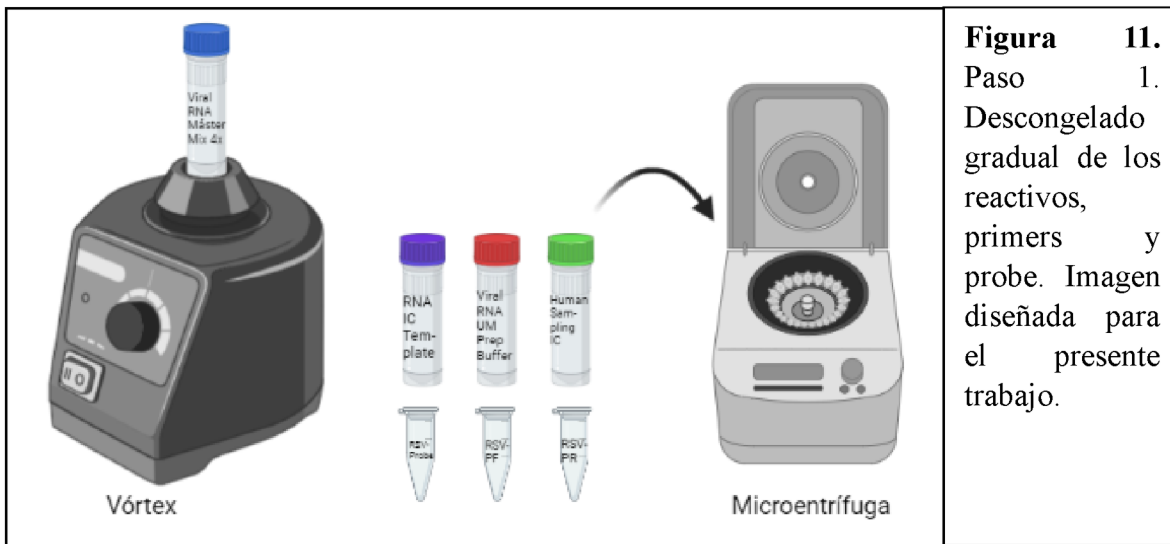
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
Retro transcripción	50	10 minutos
Desnaturalización	95	2 minutos
45 ciclos	95	5 segundos
	58	30 segundos

Tabla 2. Esquema de condiciones térmicas utilizadas para la amplificación por RT-qPCR.

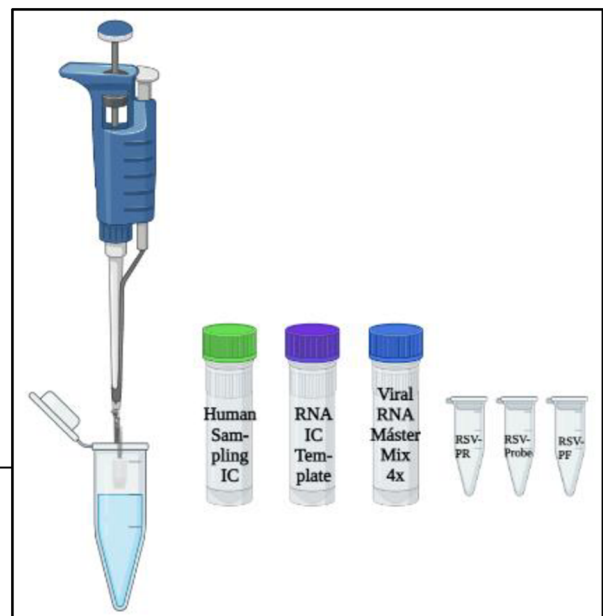
6.3 Análisis por RT-qPCR de muestras positivas y negativas para RSV

Para el análisis tanto de muestras positivas como negativas para RSV y negativas para todos los virus, se utilizó el Kit QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen siguiendo el protocolo de trabajo detallado a continuación:

1. Se descongelaron gradualmente los reactivos del Kit (Viral RNA Máster Mix, RNA IC Template, Human Sampling IC, Viral RNA UM Prep Buffer), los primers (forward y reverse) y la probe específica para RSV. Se vortexearon y centrifugaron. (Durante el trabajo en mesada, se mantuvieron refrigerados en hielo y conservadora de telgopor protegidos de la luz y del calor).



2. Siguiendo el protocolo del Kit QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen adaptado para RSV se preparó la mix de reacción bajo flujo laminar (para evitar la contaminación de los reactivos y de la mix) para la cantidad de muestras analizadas por día, más una para tener un volumen extra debido a posibles pérdidas de volumen por error de pipeteo, por ejemplo.



3. Se descongelaron las muestras y se vortexearon vigorosamente y se realizó un breve “spin” para

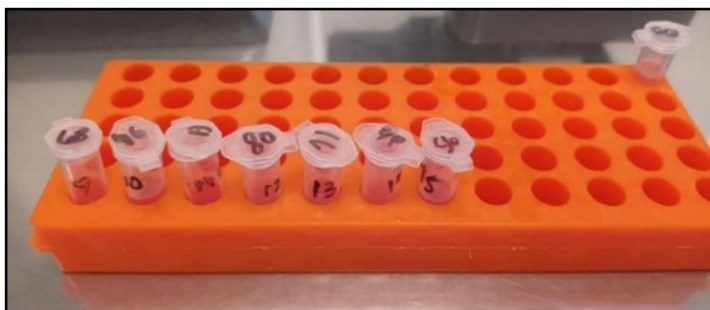


Figura 13. Imagen de parte de las muestras utilizadas para el desarrollo del trabajo. Paso 3 de Rt-qPCR. Descongelado de muestras. Imagen diseñada para el presente trabajo.

homogeneizar la muestra y para evitar aerosoles al abrir el tubo.

4. Se añadieron 2 ul de Viral RNA UM Prep Buffer, bajo flujo laminar, en strips de 8 tubos para PCR según la cantidad de reacciones realizadas por día.

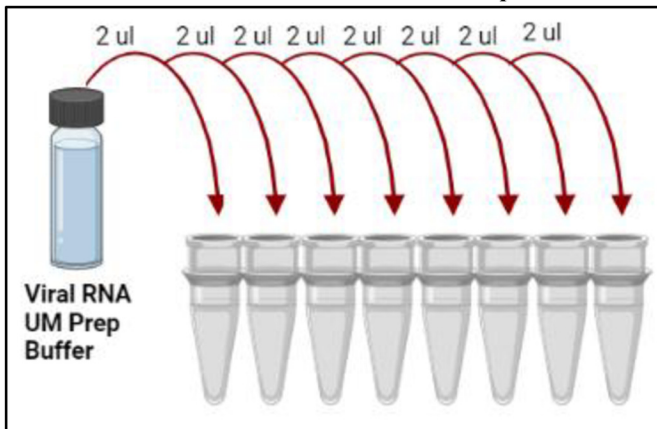


Figura 14. Paso 4. Agregado del buffer de lisis a cada strip. Imagen diseñada para el presente trabajo.

5. Bajo cabina de seguridad tipo II se añadió a cada strip 8 ul de muestra o control (el control negativo fue agua destilada y el control positivo consistió en muestra de bajo Ct diluida y alicuotada), se

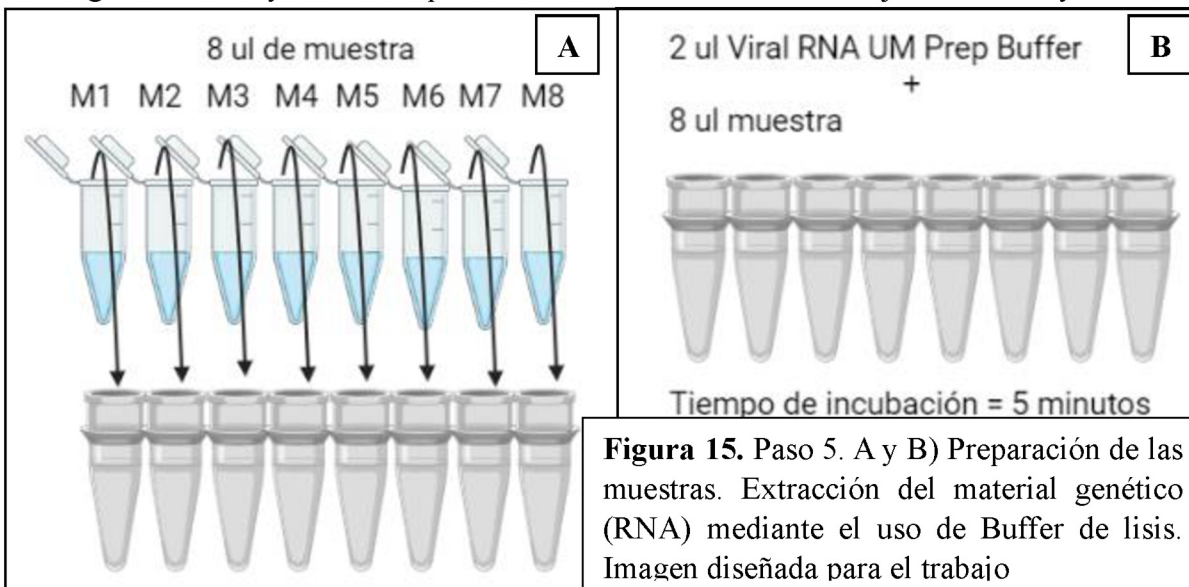


Figura 15. Paso 5. A y B) Preparación de las muestras. Extracción del material genético (RNA) mediante el uso de Buffer de lisis. Imagen diseñada para el trabajo

homogeneizó bien pero suavemente, se cerró herméticamente y se lo dejó incubar durante 5 minutos para la liberación del material genético. Se realizó un spin antes de abrir en el siguiente paso.

- Finalmente, se añadieron 10 ul de mix de reacción a cada tubo, se cerró herméticamente el strip, se vortexeo vigorosamente, pero a velocidad suave, se centrifugó y se llevó al equipo autoanalizador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System.

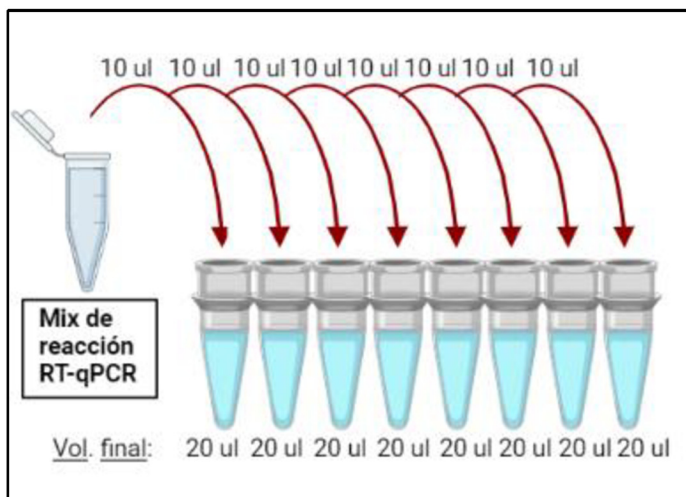


Figura 16. Paso 6 Agregado de la mix de reacción a cada strip. Imagen diseñada para el presente trabajo.

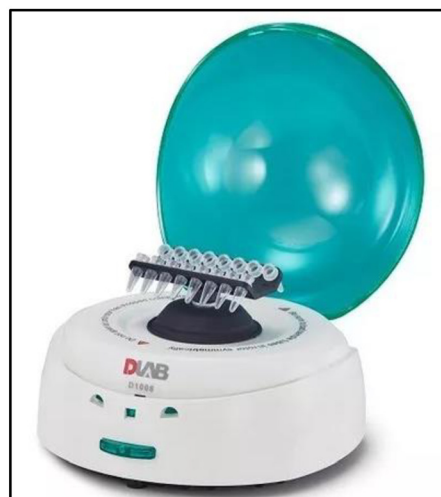


Figura 17. Mini centrifuga con rotor adaptado para strips.



Figura 18. Imagen del equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories) utilizado en este trabajo

6.4 Búsqueda y selección de material de referencia

Con el objetivo de generar material de referencia propio a ser utilizado durante el estudio como control positivo para RSV de un nivel consistente, se procesaron mediante RT-qPCR 35 muestras positivas para RSV analizadas por LAMP o IFD. Entre las 35 muestras se buscó aquellas con Ct bajo y una buena cantidad de virus. Se seleccionó la muestra RM00017 positiva para RSV determinada por LAMP (detectable) y por RT-qPCR cuyo Ct obtenido fue 24,50. A partir de esta muestra, se realizó una dilución al tercio con PBS y se alicuotó en 15 tubos eppendorf que fueron almacenados a -20°C para utilizar en cada corrida como controles positivos con valor de Ct conocido.

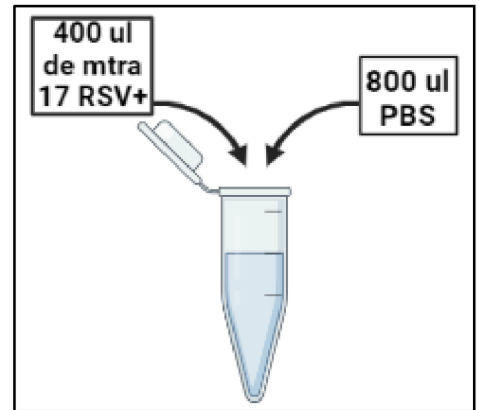


Figura 19. Preparación del material de referencia. Imagen diseñada para el presente trabajo.

6.5 Estimación del LOD de RT-qPCR y comparación con el método molecular comercial ID NOW™ RSV de Abbott Laboratories a partir de una muestra RSV positiva.

Se realizó la determinación del límite de detección (LOD) para la técnica desarrollada a lo largo del trabajo, RT-qPCR, en comparación con una técnica molecular de amplificación isotérmica comercial (ID NOW™ RSV de Abbott Laboratories). Se utilizó la muestra identificada como RM00006 positiva para VRS (analizado por IFD y RT-PCR). Para la selección de la muestra, se buscó que la misma tuviera un Ct bajo, es decir, una elevada carga viral. En esta muestra se obtuvo un Ct de 24.96. Se realizaron una serie de 5 diluciones seriadas $\frac{1}{5}$ ($\frac{1}{5}$, $\frac{1}{25}$, $\frac{1}{125}$, $\frac{1}{625}$, $\frac{1}{3125}$), para lo que se tomaron 5 tubos eppendorf de 1.5 ml donde se agregaron 400 ul de PBS estéril. Al tubo 1 se añadieron 100 ul de muestra, se homogeneizó con pipeta y 100 ul de este fueron llevados al tubo 2. Se homogeneizó y se tomaron 100 ul que fueron llevados al tubo 3, y así sucesivamente hasta el 5to tubo. En la siguiente imagen (Figura 20) se muestra el flujo de trabajo realizado para la preparación de las diluciones seriadas. A falta de reactivos, por ID NOW™ RSV de Abbott Laboratories solo se analizó la dilución 1/3125 y se obtuvo amplificación.

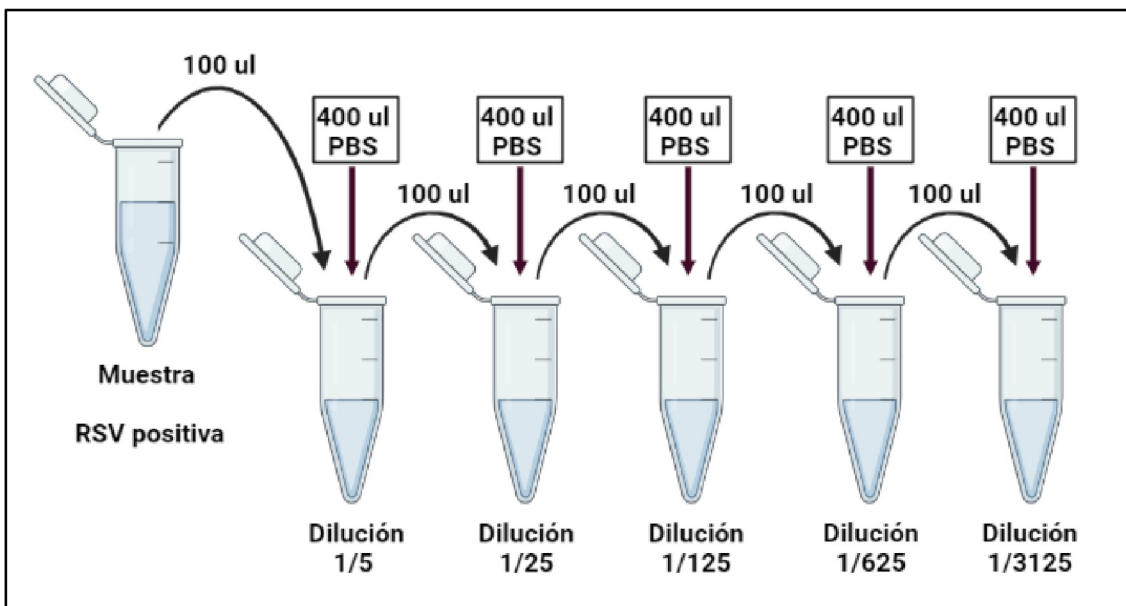


Figura 20. Esquema de diluciones seriadas $\frac{1}{5}$ realizadas para la determinación de LOD

Se realizaron nuevamente 5 diluciones seriadas en base 10 a partir de la misma muestra (identificada como número RM00006). Se realizó una primera dilución $\frac{1}{100}$ para lo que se tomaron 20 ul de muestra (con micropipeta) y fueron llevados a 2000 ul con PBS estéril. A partir de esta dilución $\frac{1}{100}$ se realizó una serie de 5 diluciones seriadas $\frac{1}{10}$ a fin de obtener las siguientes diluciones: $\frac{1}{1.000}$, $\frac{1}{10.000}$, $\frac{1}{100.000}$, $\frac{1}{1.000.000}$ y $\frac{1}{10.000.000}$. En la siguiente imagen (Figura 21) podemos observar de forma esquemática el flujo de trabajo llevado a cabo:

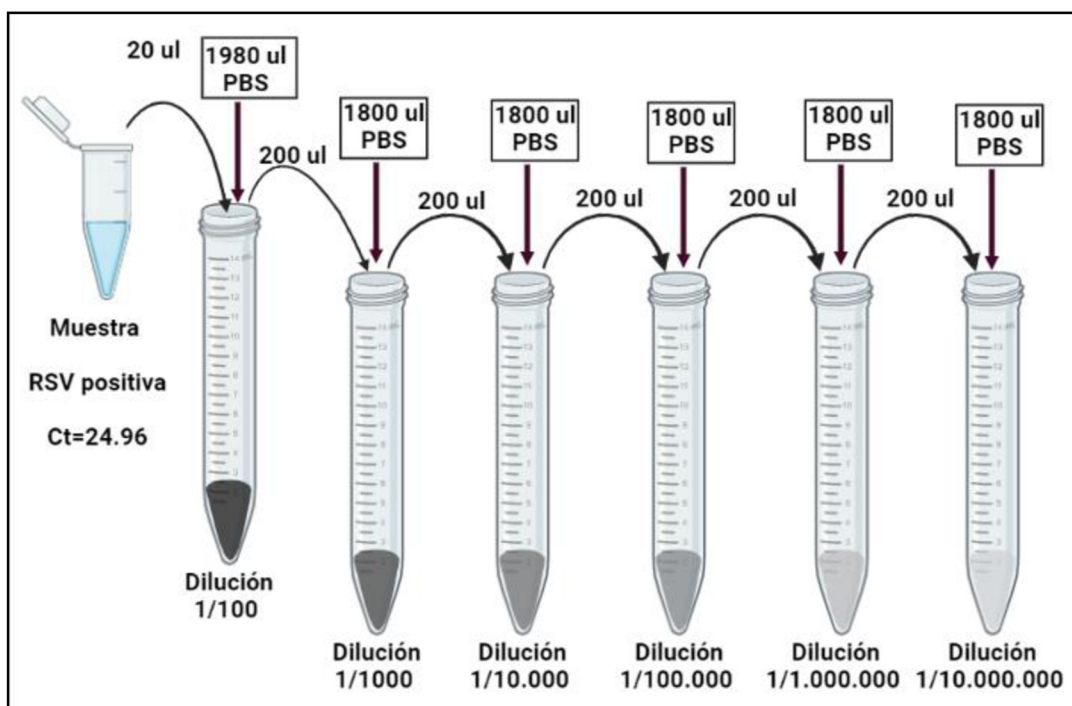


Figura 21. Esquema de diluciones seriadas $\frac{1}{10}$ realizadas para la determinación de LOD

6.5.1 Estimación del LOD de RT-qPCR y comparación con el método molecular comercial ID NOW™ RSV de Abbott Laboratories a partir de un cultivo de RSV

El LOD también se determinó utilizando virus de cultivo a fin de obtener mejores resultados con el analito en una matriz más conocida que la proveniente de una muestra clínica evitando que el resultado se vea afectado por posible presencia de inhibidores y otros productos en la muestra.

En este caso se utilizó como material de referencia una muestra de un sobrenadante aclarado por centrifugación de cultivo de RSV donado por la Universidad Nacional de Quilmes. A partir del cultivo se realizó una serie de siete diluciones en base 10, donde partiendo de una primera dilución 10^{-1} (1/10) llegamos hasta una dilución 10^{-7} (es decir, una dilución 1/10.000.000). Siguiendo el esquema que mostramos a continuación (Figura 22) se tomaron 40 ul del cultivo de RSV y se llevaron a 400 ul de volumen final con PBS (es decir, se añadieron 360 ul de PBS). Continuando con el fundamento de las diluciones en serie, para el segundo eppendorf se tomaron 40 ul de la dilución 10^{-1} y se llevó a volumen final de 400 ul con el agregado de PBS obteniendo así una dilución 10^{-2} y así sucesivamente hasta obtener la dilución final de 10^{-7}

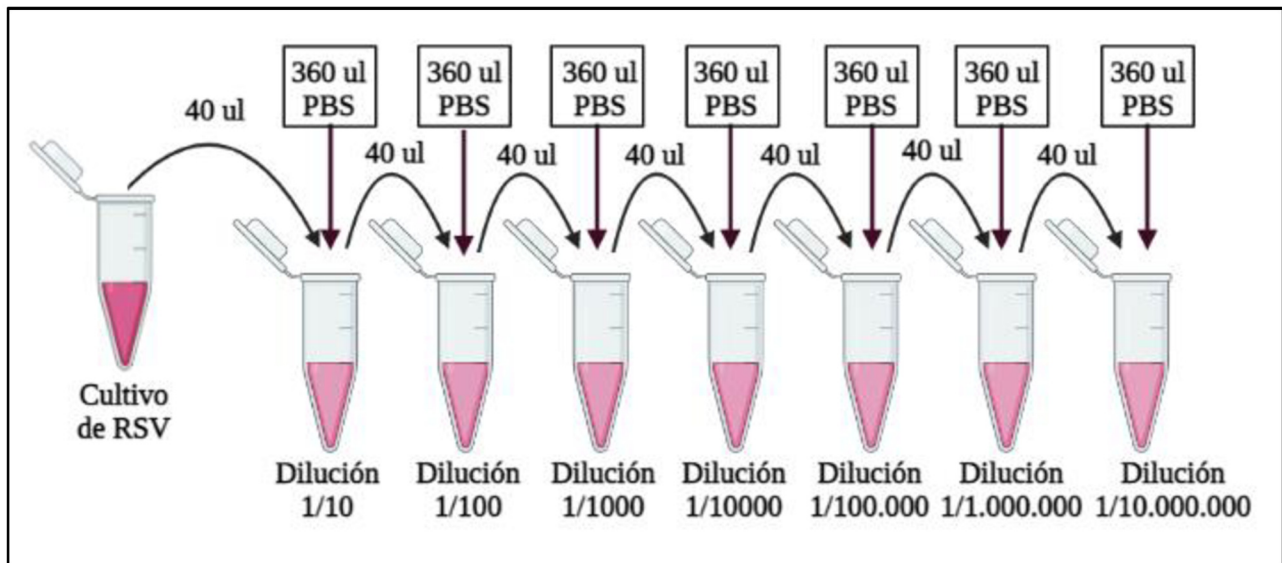


Figura 22. Esquema de diluciones seriadas 1/10 realizadas a partir de cultivo de RSV para la determinación de LOD. Imagen diseñada para el presente trabajo

6.5.2 Estimación del LOD de RT-qPCR y comparación con el método molecular comercial ID NOW™ RSV de Abbott Laboratories a partir de un extracto de cultivo de RSV

Dado que existe una diferencia importante de 25 veces en el volumen inicial que se incorpora en cada ensayo (8 ul para RT-qPCR y 200 ul para ID NOW) se procedió a realizar una extracción en columna a partir del material de referencia, cultivo de RSV, con el fin de utilizar cantidades equivalentes ya que, en este caso se parte de 200 ul en ambos casos. Con este propósito se realizó la extracción del material genético en columna utilizando el *Easy Pure Viral DNA/RA Kit* (TransGen Biotech). Este Kit es un método sencillo y rápido basado en columna para aislar el material genético viral, hasta 200 ul. El procedimiento consiste en un paso de lisis, un paso de enriquecimiento del material RNA o DNA con un Carrier y unión del RNA a una membrana de sílica en la columna, lavados y, finalmente elución del RNA de la columna. El procedimiento detallado es el siguiente:

1. Se adicionaron 20 ul de Proteinasa K estéril en un tubo eppendorf de 1,5 ml libre de RNAsas.
2. Se adicionaron 200 ul del cultivo de RSV al tubo eppendorf con proteinasa K.

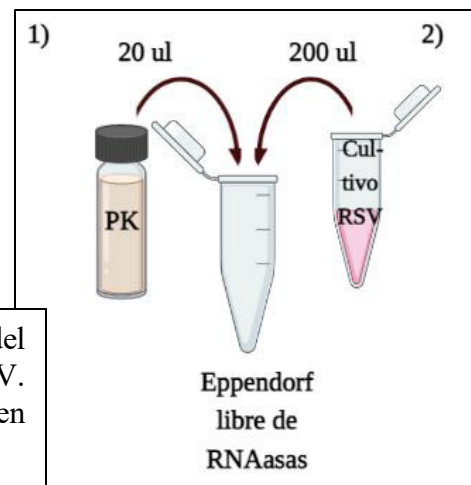
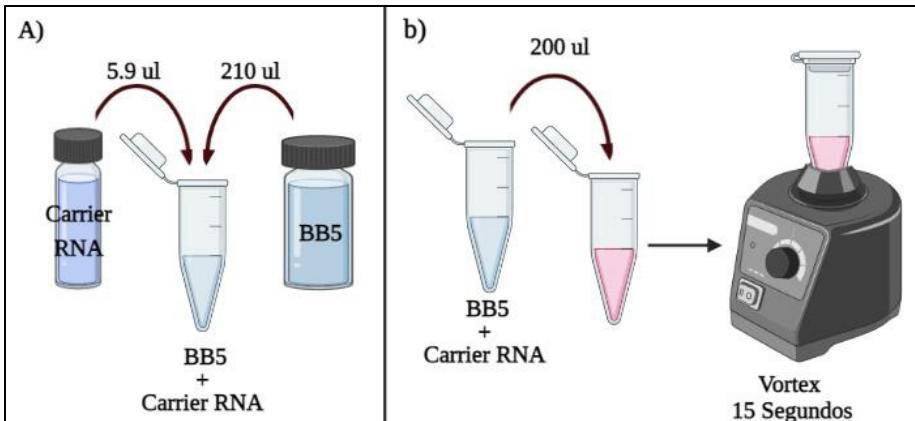


Figura 23. Pasos 1 y 2 para la extracción del material genético RNA a partir de cultivo de RSV. Esta etapa se corresponde con la lisis. Imagen diseñada para el presente trabajo.

3. Se adicionaron 200 ul de buffer (BB5) con el carrier RNA (previamente preparado según indicaciones del inserto), la mezcla se vortexeó durante 15 segundos.

Figura 24. Paso 3) A) Preparación del BB5 con el carrier RNA y B) Adición del BB5 con el carrier al cultivo de RSV con PK. Imagen diseñada para el presente trabajo.



4. Se incubó en termociclador a 56°C durante 15 minutos.

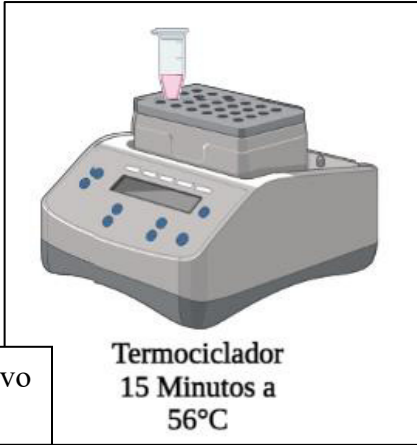


Figura 25. Paso 4) Incubación de la muestra (cultivo de RSV) a 56°C. Imagen diseñada para el trabajo.

5. Se añadieron 250 ul de etanol al 96% al tubo que contenía el cultivo de RSV. Se vortexeo y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

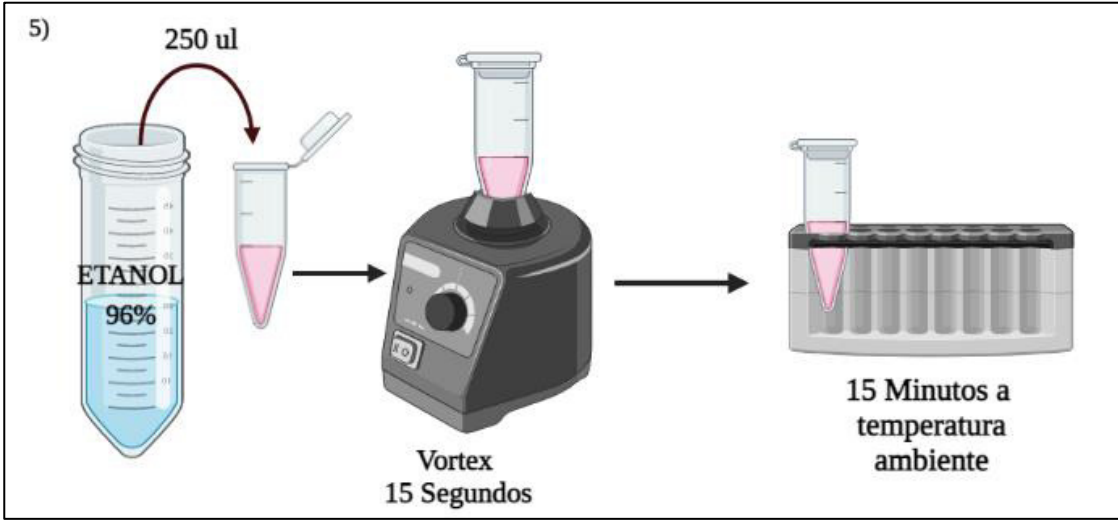


Figura 26. Paso 5) Incubación de la muestra (cultivo de RSV). Imagen diseñada para el trabajo.

6. Se transfirió todo el contenido a una columna de centrifugación. Se centrifugó a 12000 x g por 1 minuto y luego se desechó el flujo eluido.

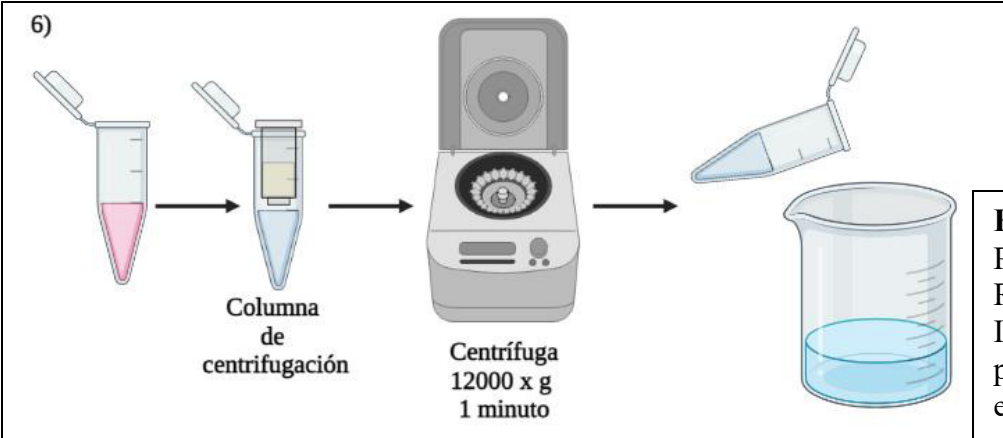


Figura 27. Paso 6) Para la extracción de RNA en columna. Imagen diseñada particularmente para este trabajo.

7. Se adicionaron 500 ul de WB5 y se centrifugó a 12000 x g por 1 minuto. Se descartó el líquido contenido en el tubo. Este paso se realizó dos veces

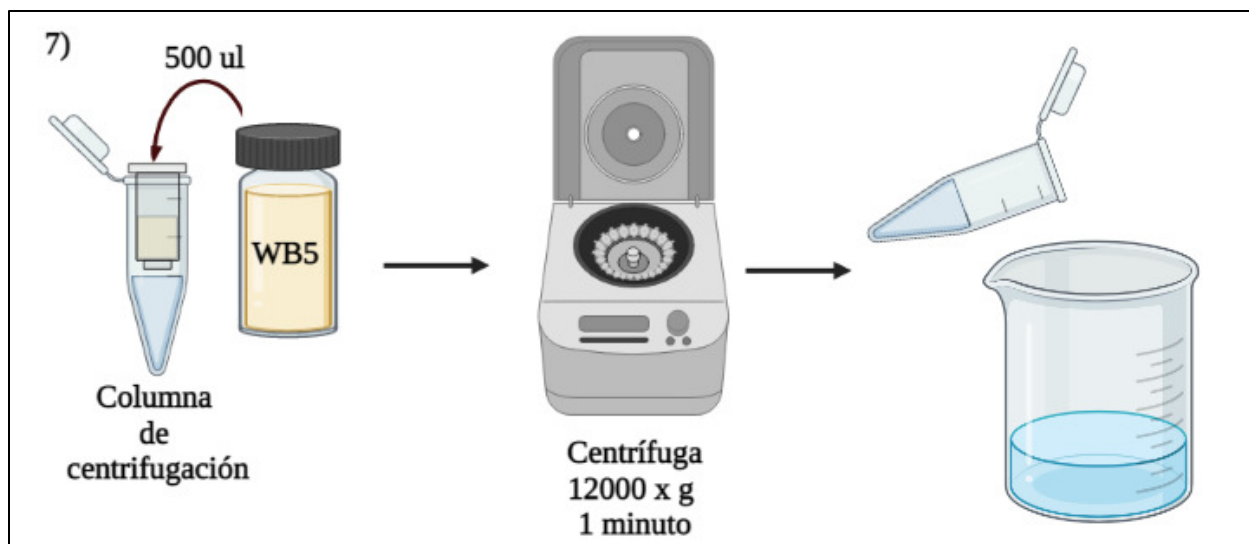


Figura 28. Paso 7) Adición de WB5 y centrifugación. Imagen diseñada para el presente ensayo.

8. Se centrifugó a 12000 x g por 1 minuto para remover el etanol remanente que pudiera haber quedado y secar por completo la membrana.
9. Se traspasó la columna a un tubo de micro-centrífuga, de 1,5 ml libre de RNA asas.
10. Se añadieron 30 ul de Agua libre de RNAsas (provista por el kit), en el centro de la columna y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto.

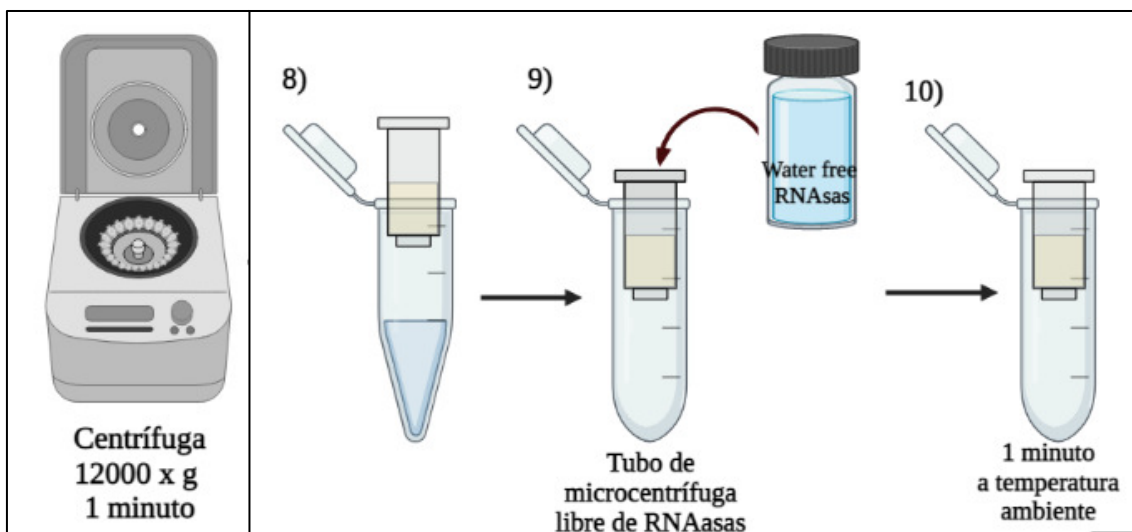


Figura 29. Pasos 8, 9 y 10) Para la extracción en columna a partir de cultivo de RSV. Imagen diseñada para el presente trabajo.

11. Se centrifugó una última vez a 12000 x g por 1 minuto.

12. El extracto de cultivo se almacenó a -80°C

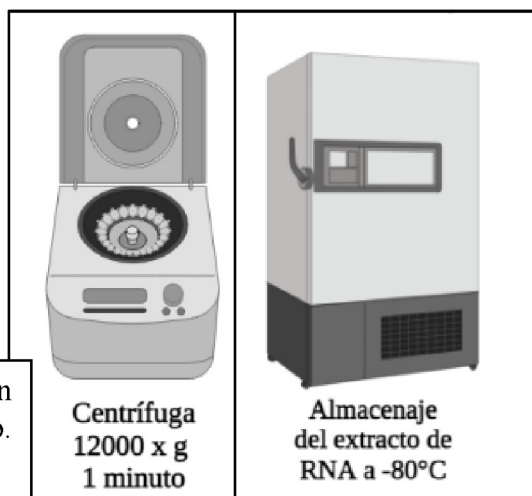


Figura 30. Pasos 11 y 12. Centrifugación final y almacenaje del extracto de cultivo. Imagen diseñada para el presente trabajo.

Una vez obtenido el extracto de RNA a partir del cultivo celular de RSV se realizaron una serie de siete diluciones en base diez, según lo mostrado en la Figura 31. Para esto, en principio, con micropipeta se tomaron 10 ul de extracto en un tubo eppendorf y fueron llevados a 100 ul con el agregado de 90 ul de PBS obteniendo así una primera dilución 10-1, es decir 1/10. A continuación, a partir de esta dilución se tomaron 10 ul que fueron llevado a 100 ul con PBS para lograr una dilución 1/100 (10-2). De esta manera, se procedió sucesivamente hasta llegar a 10-7 (1/10.000.000).

Finalmente, se tomaron 10 ul de cada dilución y se añadieron respectivamente a cada tubo del strip (Figura 32.A) para el equipo de RT-qPCR. En un paso posterior, se añadieron 10 ul de la mix de reacción (Figura 32.b), se vortexeo, se centrifugó y se llevó al equipo autoanalizador.

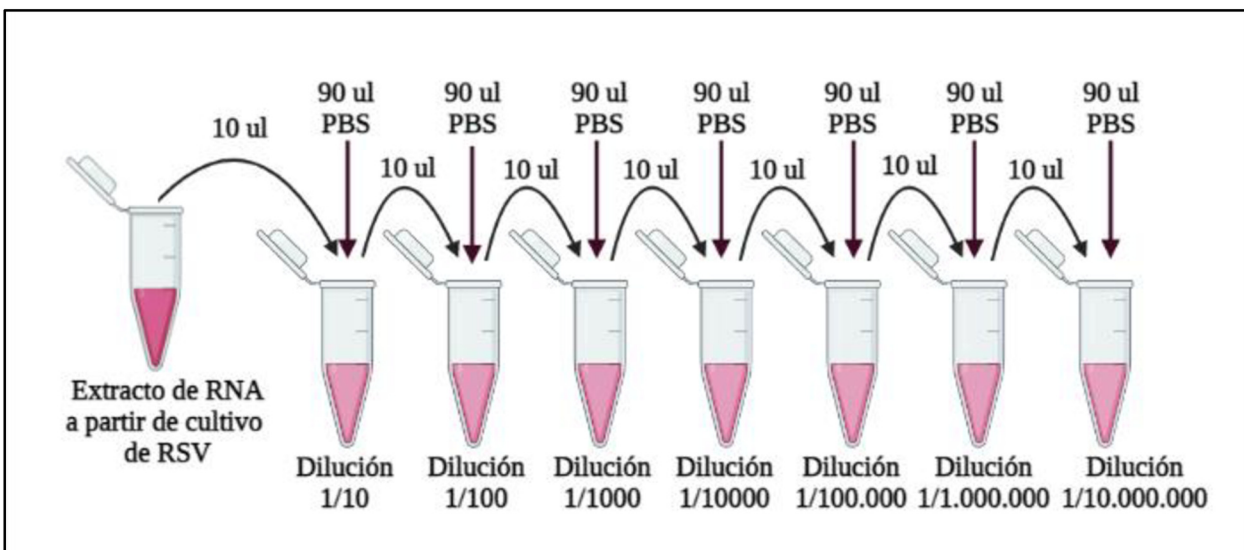


Figura 31. Esquema de diluciones seriadas 1/10 realizadas a partir de extracto de cultivo de RSV para la determinación de LOD

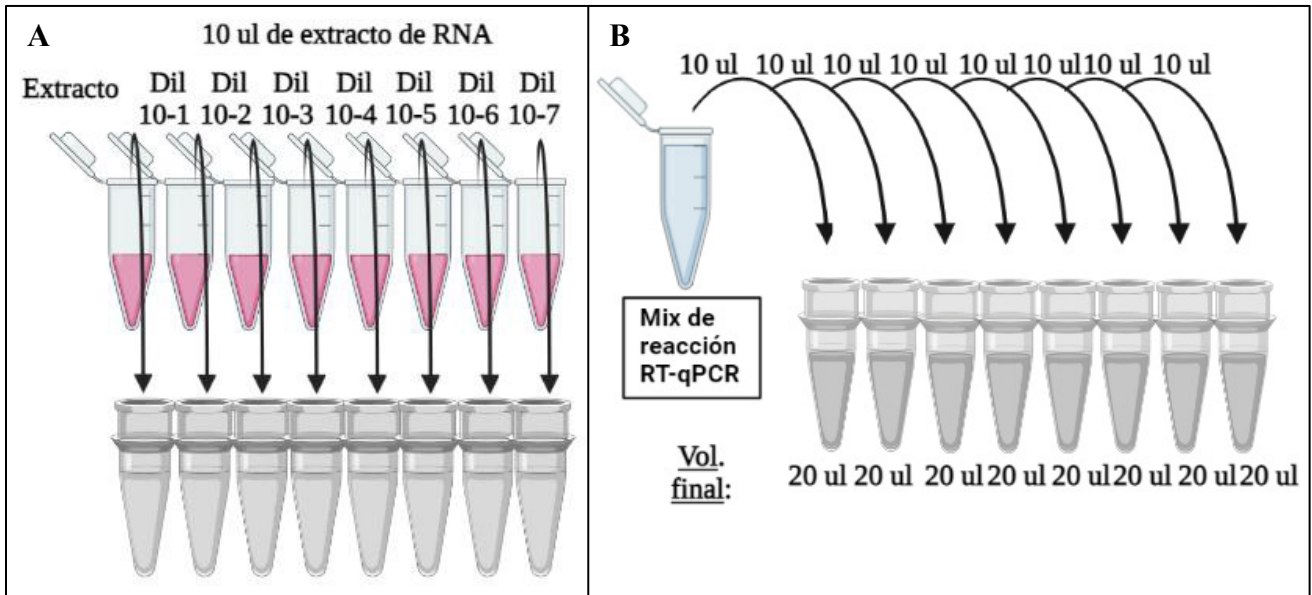


Figura 32. A) Se añadió 10 µl de extracto de cultivo de RSV a cada well y B) Se añadieron 10 µl de mix de reacción dando un volumen final de 20 µl. Imagen diseñada para el trabajo

7. Resultados por RT-qPCR

Resultados RSV Corrida 1

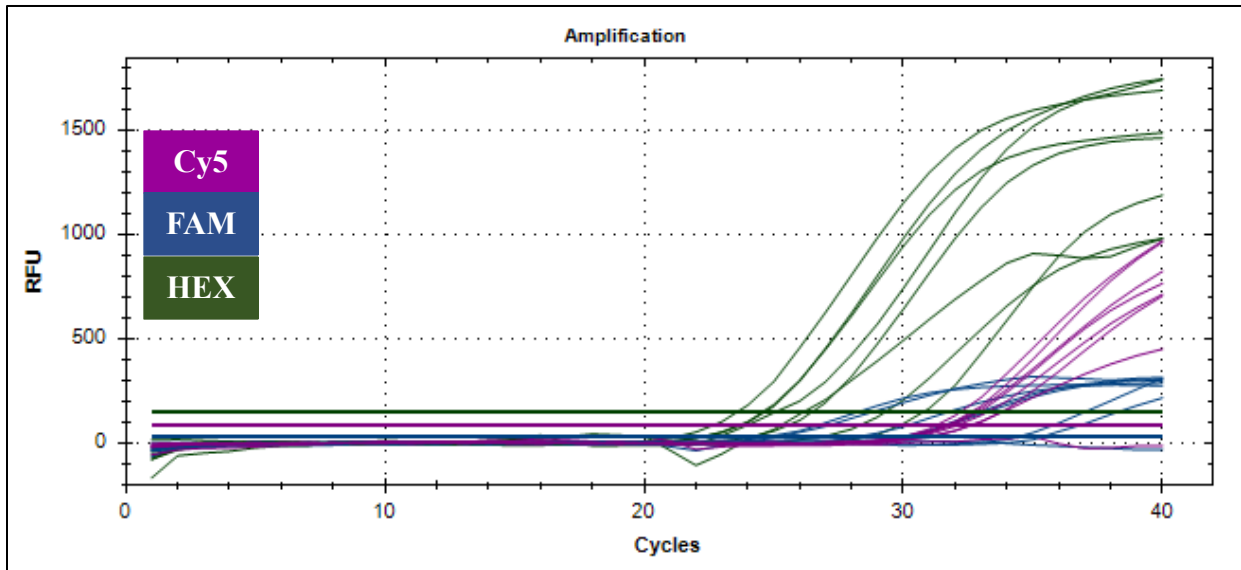


Figura 33. Curvas de fluorescencia (FAM), control interno (Cy5) y control endógeno (HEX) obtenidas para el análisis de 8 muestras positivas para RSV. Imagen extraída de CFX96-Manager

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A07	HEX	RM00001	26.18	A07	FAM	RM00001	25.05	A07	Cy5	RM00001	N/A
B07	HEX	RM00002	25.09	B07	FAM	RM00002	34.32	B07	Cy5	RM00002	31.26
C07	HEX	RM00003	30.80	C07	FAM	RM00003	N/A	C07	Cy5	RM00003	31.58
D07	HEX	RM00004	24.67	D07	FAM	RM00004	28.12	D07	Cy5	RM00004	32.59
E07	HEX	RM00005	23.61	E07	FAM	RM00005	30.10	E07	Cy5	RM00005	31.68
F07	HEX	RM00006	29.33	F07	FAM	RM00006	24.55	F07	Cy5	RM00006	32.05
G07	HEX	RM00007	24.59	G07	FAM	RM00007	29.75	G07	Cy5	RM00007	32.54
H07	HEX	RM00008	26.49	H07	FAM	RM00008	35.27	H07	Cy5	RM00008	31.81

Tabla 3. Valores de Ct obtenidos para el control endógeno (HEX), el fluoróforo (FAM) y el control interno (Cy5) durante el análisis de 8 muestras positivas para RSV. Tabla extraída de CFX96- Manager.

Resultados RSV Corrida 2

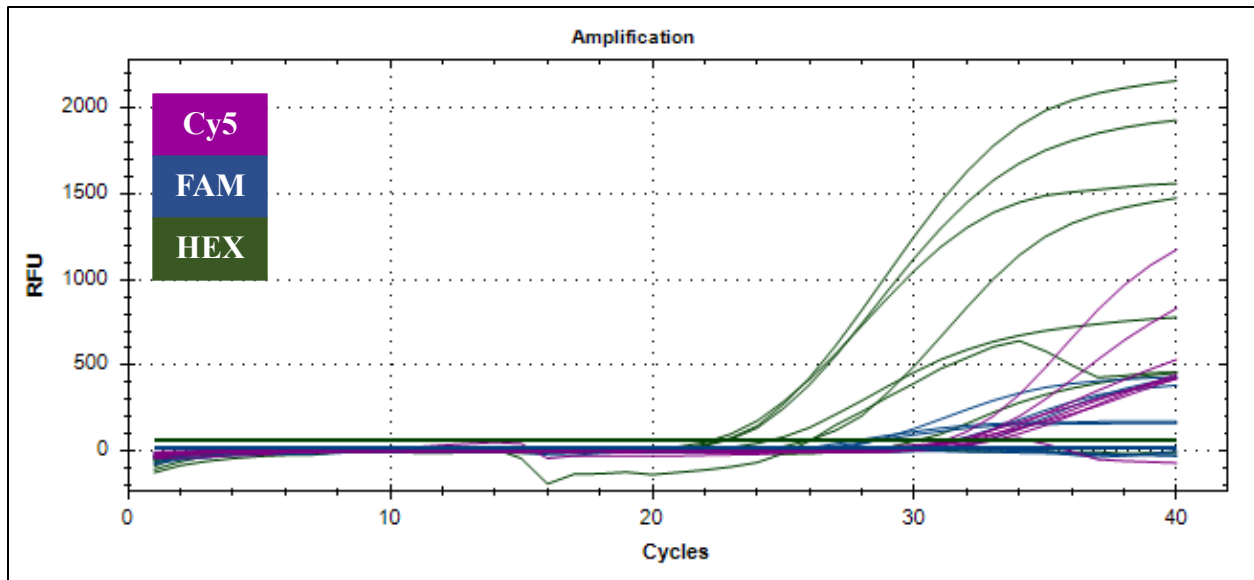


Figura 34. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control de inhibición (Cy5) durante el análisis de 7 muestras positivas para RSV y el control negativo (agua destilada). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A07	FAM	RM00009	N/A	A07	HEX	RM00009	26.06	A07	Cy5	RM00009	27.20
B07	FAM	RM00010	25.79	B07	HEX	RM00010	30.17	B07	Cy5	RM00010	30.84
C07	FAM	RM00011	25.94	C07	HEX	RM00011	24.55	C07	Cy5	RM00011	30.33
D07	FAM	RM00012	26.77	D07	HEX	RM00012	22.88	D07	Cy5	RM00012	29.60
E07	FAM	RM00013	31.25	E07	HEX	RM00013	22.31	E07	Cy5	RM00013	30.46
F07	FAM	RM00014	29.57	F07	HEX	RM00014	26.03	F07	Cy5	RM00014	29.47
G07	FAM	RM00015	24.64	G07	HEX	RM00015	22.70	G07	Cy5	RM00015	30.02
H07	FAM	Control-	N/A	H07	HEX	Control -	N/A	H07	Cy5	Control-	29.38

Tabla 4. Valores de Ct obtenidos para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno (Cy5) durante el análisis de 7 muestras positivas para RSV y el control negativo (agua destilada). Tabla extraída de CFX96- Manager.

Resultados RSV Corrida 3:

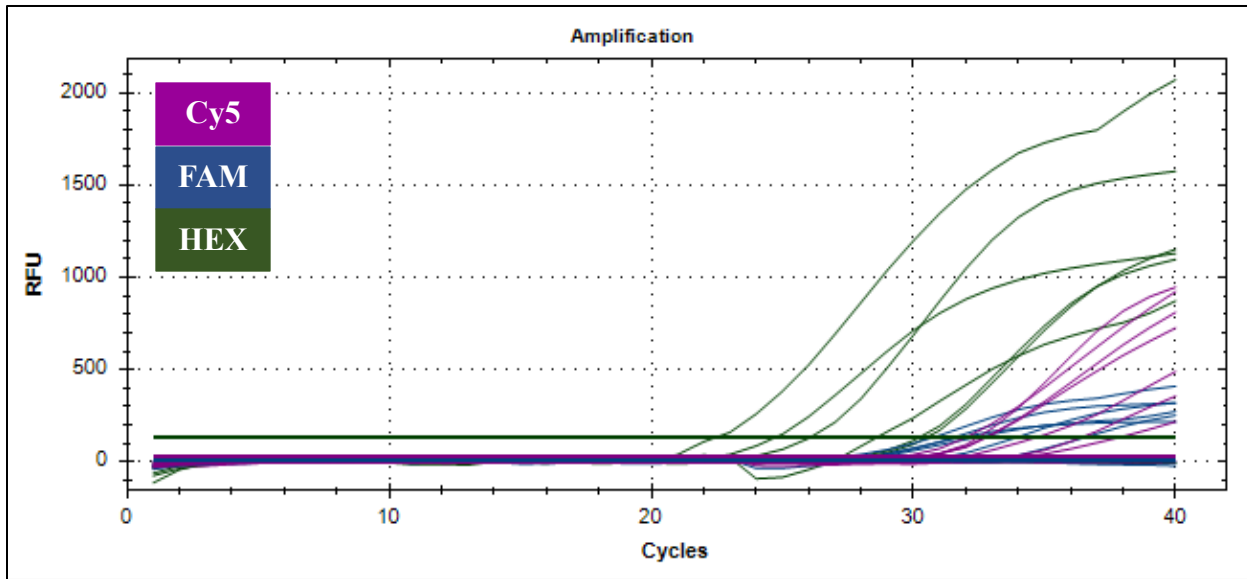


Figura 35. Curvas de amplificación obtenidas para para el control interno (Cy5), el fluoróforo (FAM) y el control endógeno (HEX) durante el análisis de 6 muestras positivas para RSV y el control negativo (agua destilada). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A07	Cy5	RM00016	34.24	A07	FAM	RM00016	28.07	A07	HEX	RM00016	28.65
B07	Cy5	RM00017	31.97	B07	FAM	RM00017	24.50	B07	HEX	RM00017	22.53
C07	Cy5	RM00018	30.37	C07	FAM	RM00018	32.82	C07	HEX	RM00018	30.27
D07	Cy5	RM00019	33.68	D07	FAM	RM00019	27.39	D07	HEX	RM00019	24.78
E07	Cy5	RM00020	29.50	E07	FAM	RM00020	27.33	E07	HEX	RM00020	30.54
F07	Cy5	RM00021	30.41	F07	FAM	RM00021	30.42	F07	HEX	RM00021	26.10
G07	Cy5	Control-	30.23	G07	FAM	Control-	N/A	G07	HEX	Control-	N/A

Tabla 5. Valores de Ct obtenidos para el control interno (Cy5), el fluoróforo (FAM) y el control endógeno (HEX) durante el análisis de 6 muestras positivas para RSV y el control negativo (agua destilada). Tabla extraída de CFX96- Manager.

Resultados RSV Corrida 4:

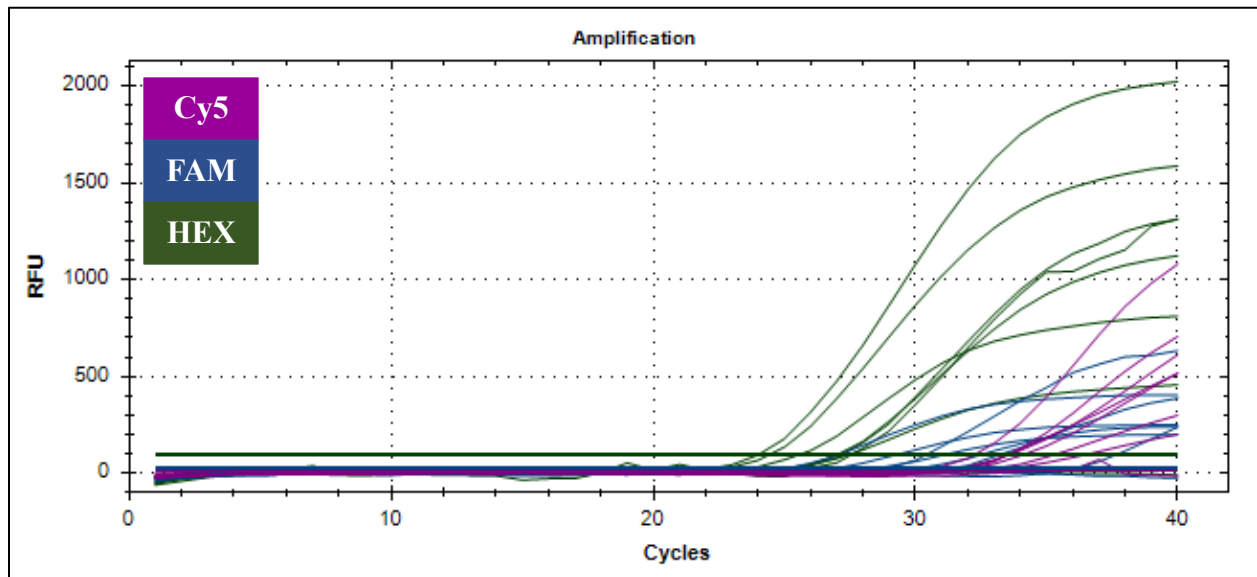


Figura 36. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control de inhibición (Cy5) durante el análisis de 7 muestras positivas para RSV y el control negativo (agua destilada). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A07	FAM	RM00030	28.77	A07	HEX	RM00030	27.50	A07	Cy5	RM00030	36.01
B07	FAM	RM00037	31.30	B07	HEX	RM00037	27.15	B07	Cy5	RM00037	31.30
C07	FAM	RM00041	30.12	C07	HEX	RM00041	27.35	C07	Cy5	RM00041	32.38
D07	FAM	RM00043	28.43	D07	HEX	RM00043	25.47	D07	Cy5	RM00043	31.53
E07	FAM	RM00044	26.95	E07	HEX	RM00044	26.93	E07	Cy5	RM00044	31.05
F07	FAM	RM00045	25.11	F07	HEX	RM00045	24.36	F07	Cy5	RM00045	32.83
G07	FAM	RM00057	36.16	G07	HEX	RM00057	23.94	G07	Cy5	RM00057	31.51
H07	FAM	Control-	N/A	H07	HEX	Control-	N/A	H07	Cy5	Control-	30.04

Tabla 6. Valores de Ct obtenidos para el control endógeno (HEX), el fluoróforo (FAM) y el control interno (Cy5) durante el análisis de 7 muestras positivas para RSV y el control negativo (agua destilada). Tabla extraída de CFX96- Manager.

Resultados RSV Corrida 5:

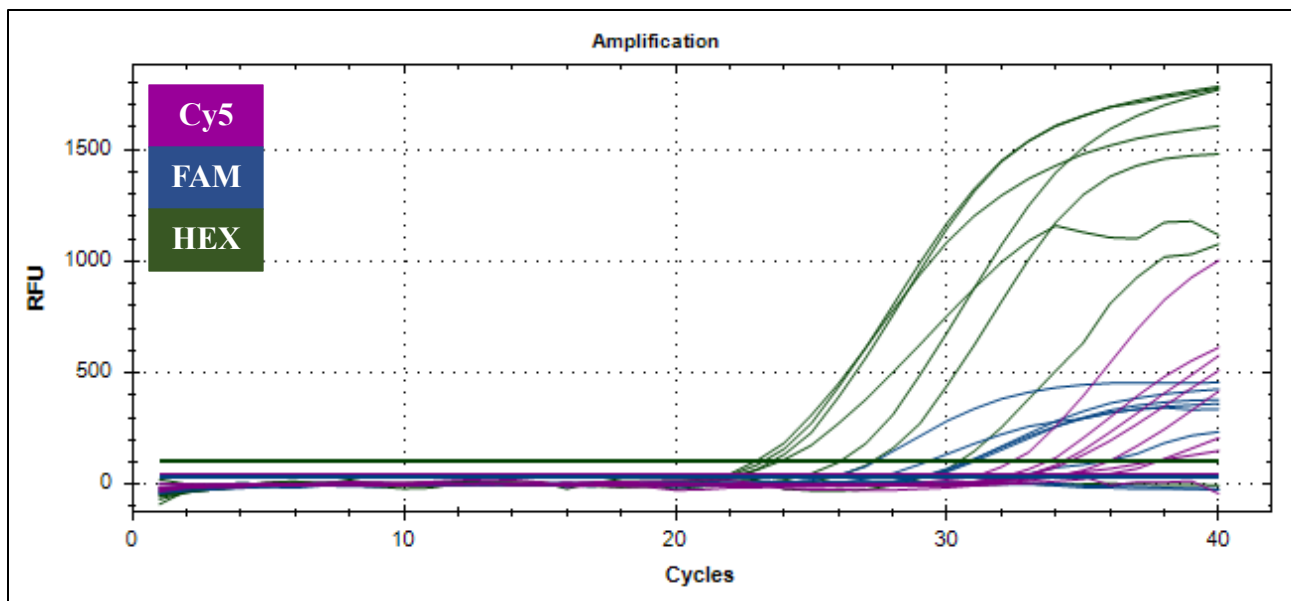


Figura 37. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control de inhibición (Cy5) durante el análisis de 7 muestras positivas para RSV y el control negativo (agua destilada). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A07	FAM	RM00062	32.47	A07	HEX	RM00062	23.91	A07	Cy5	RM00062	N/A
B07	FAM	RM00081	27.47	B07	HEX	RM00081	30.49	B07	Cy5	RM00081	32.88
C07	FAM	RM00083	29.17	C07	HEX	RM00083	23.59	C07	Cy5	RM00083	34.04
D07	FAM	RM00102	29.09	D07	HEX	RM00102	23.27	D07	Cy5	RM00102	34.15
E07	FAM	RM00113	29.19	E07	HEX	RM00113	26.10	E07	Cy5	RM00113	32.95
F07	FAM	RM00133	N/A	F07	HEX	RM00133	27.29	F07	Cy5	RM00133	32.23
G07	FAM	RM00140	25.71	G07	HEX	RM00140	23.00	G07	Cy5	RM00140	35.66
H07	FAM	Control-	N/A	H07	HEX	Control-	N/A	H07	Cy5	Control-	31.14

Tabla 7. Valores de Ct obtenidos para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno (Cy5) durante el análisis de 7 muestras positivas para RSV y el control negativo (agua destilada). Tabla extraída de CFX96- Manager.

Resultados RSV Corrida 6:

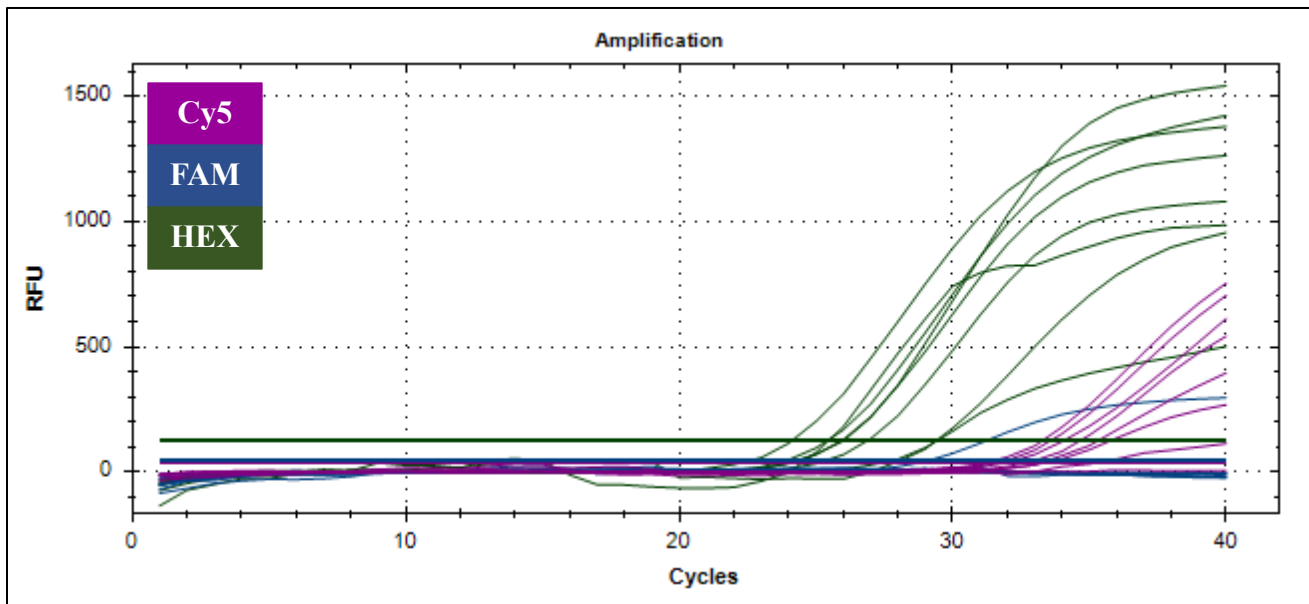


Figura 38. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control de inhibición (Cy5) durante el análisis de 5 muestras positivas para hMPV, 2 positivas para Flu A y el control positivo (Muestra RM00017). Imagen extraída de CFX96-Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A07	FAM	RM00033	N/A	A07	HEX	RM00033	25.50	A07	Cy5	RM00033	35.24
B07	FAM	RM00035	N/A	B07	HEX	RM00035	29.45	B07	Cy5	RM00035	33.23
C07	FAM	RM00038	N/A	C07	HEX	RM00038	26.00	C07	Cy5	RM00038	31.22
E07	FAM	RM00039	N/A	E07	HEX	RM00039	24.16	E07	Cy5	RM00039	31.51
F07	FAM	RM00134	N/A	F07	HEX	RM00134	26.94	F07	Cy5	RM00134	33.33
G07	FAM	RM00134	N/A	G07	HEX	RM00134	26.06	G07	Cy5	RM00134	32.63
H07	FAM	Control +	29.12	H07	HEX	Control +	25.46	H07	Cy5	Control +	31.94

Tabla 8. Valores de Ct obtenidos para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno (Cy5) durante el análisis de 5 muestras positivas para hMPV, 2 positivas para Flu A y el control positivo (Muestra RM00017). Tabla extraída de CFX96- Manager.

Resultados RSV Corrida 7

Strip 1)

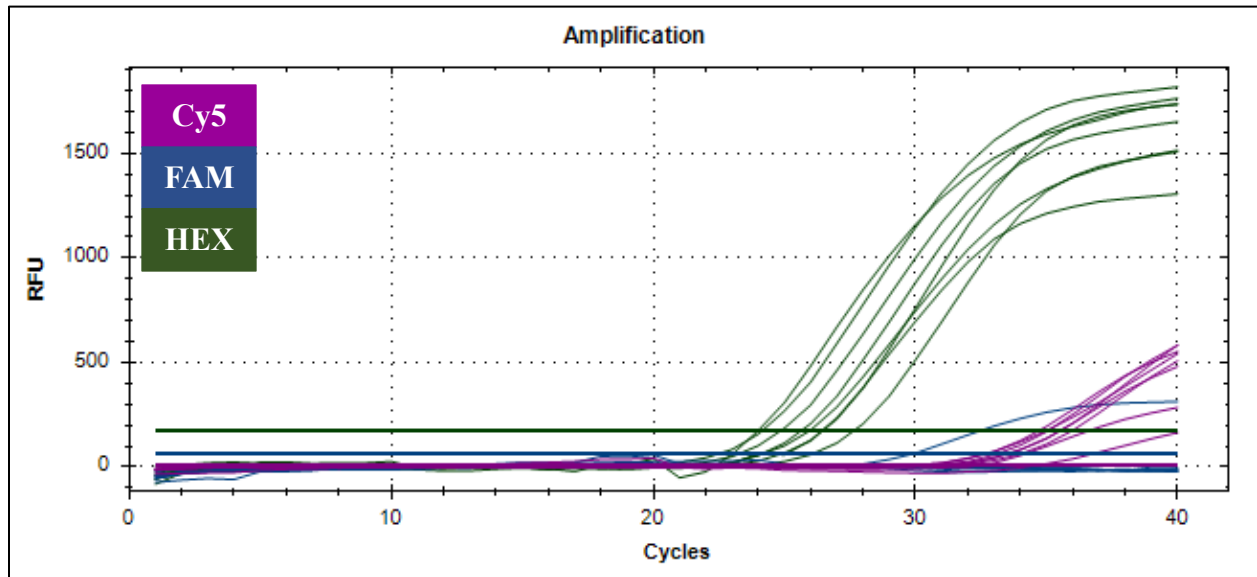


Figura 39. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control de inhibición (Cy5) durante el análisis de 7 muestras positivas para Flu B y el control positivo (Muestra RM00017). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A06	FAM	RM00142	N/A	A06	HEX	RM00142	24.02	A06	Cy5	RM00142	34.46
B06	FAM	RM00143	N/A	B06	HEX	RM00143	26.45	B06	Cy5	RM00143	32.29
C06	FAM	RM00144	N/A	C06	HEX	RM00144	27.68	C06	Cy5	RM00144	29.35
D06	FAM	RM00145	N/A	D06	HEX	RM00145	26.50	D06	Cy5	RM00145	30.93
E06	FAM	RM00146	N/A	E06	HEX	RM00146	24.89	E06	Cy5	RM00146	30.21
F06	FAM	RM00147	N/A	F06	HEX	RM00147	25.68	F06	Cy5	RM00147	30.20
G06	FAM	RM00141	N/A	G06	HEX	RM00141	24.18	G06	Cy5	RM00141	30.09
H06	FAM	Control +	30.00	H06	HEX	Control +	26.01	H06	Cy5	Control +	29.24

Tabla 9. Valores de Ct obtenidos para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno (Cy5) durante el análisis de 7 muestras para Flu B y el control positivo (Muestra RM00017). Tabla extraída de CFX96- Manager.

Strip 2)

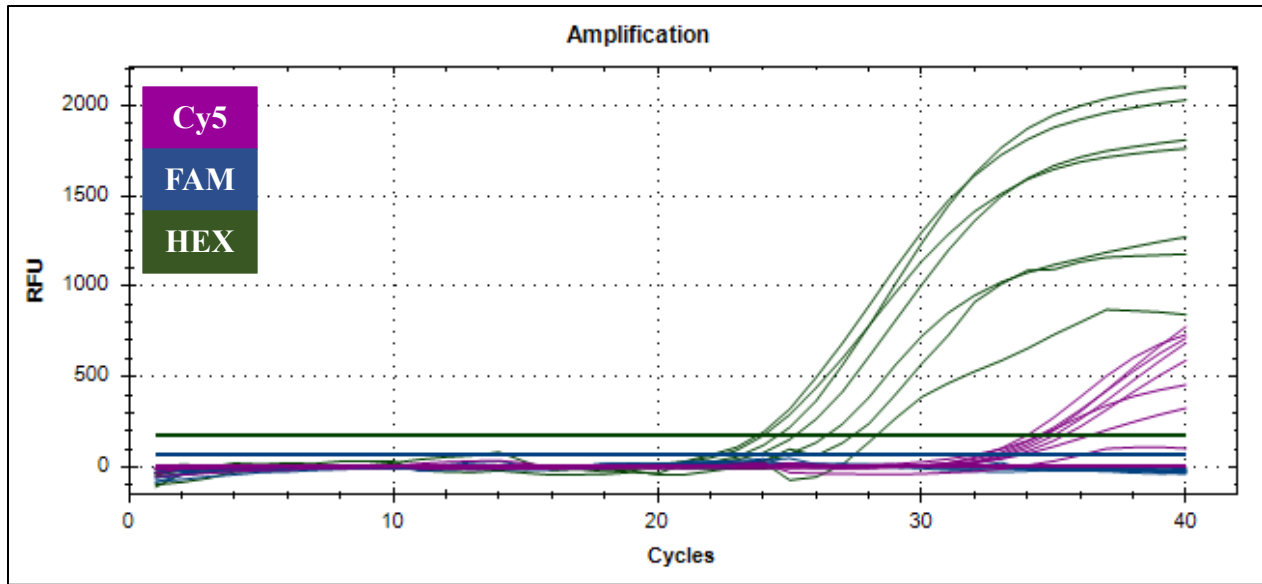


Figura 40. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control de inhibición (Cy5) durante el análisis de muestras 7 positivas para hMPV y el control negativo (agua destilada). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A07	FAM	RM00029	N/A	A07	HEX	RM00029	28.30	A07	Cy5	RM00029	33.72
B07	FAM	RM00031	N/A	B07	HEX	RM00031	27.40	B07	Cy5	RM00031	23.12
C07	FAM	RM00032	N/A	C07	HEX	RM00032	24.02	C07	Cy5	RM00032	30.52
D07	FAM	RM00034	N/A	D07	HEX	RM00034	25.22	D07	Cy5	RM00034	28.62
E07	FAM	RM00036	N/A	E07	HEX	RM00036	23.80	E07	Cy5	RM00036	29.84
F07	FAM	RM00040	N/A	F07	HEX	RM00040	26.40	F07	Cy5	RM00040	30.45
G07	FAM	RM00042	N/A	G07	HEX	RM00042	24.57	G07	Cy5	RM00042	30.16
H07	FAM	Control -	N/A	H07	HEX	Control -	N/A	H07	Cy5	Control -	22.29

Tabla 10. Valores de Ct obtenidos para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno (Cy5) durante el análisis de 7 muestras para hMPV y el control negativo (agua destilada). Tabla extraída de CFX96- Manager.

Resultados Corrida 8:

Strip 1)

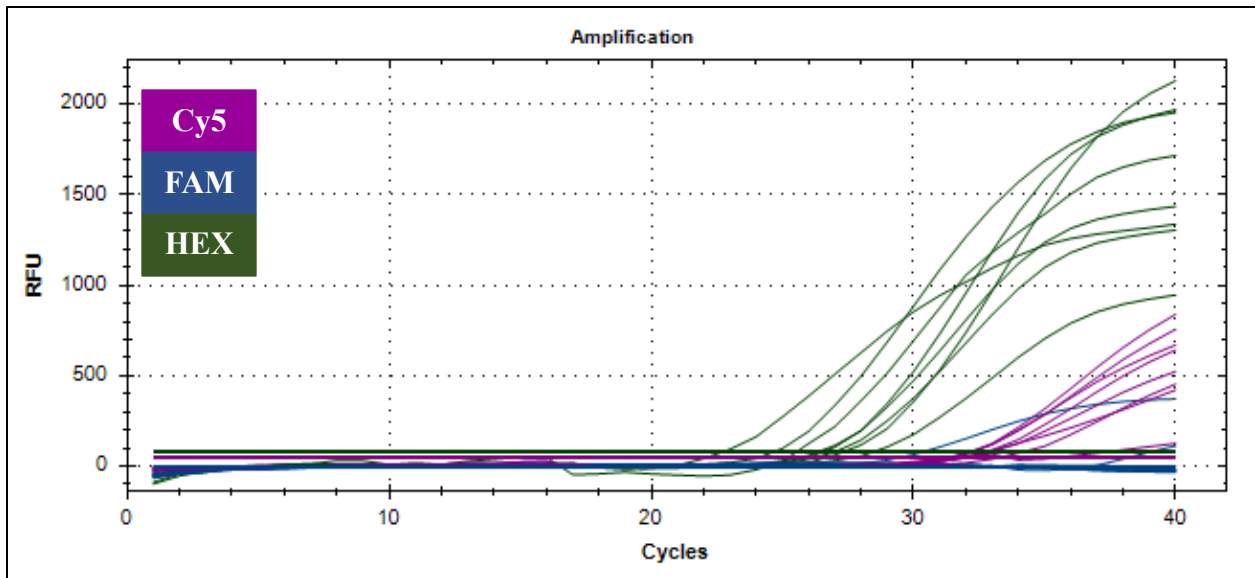


Figura 41. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control de inhibición (Cy5) durante el análisis de muestras 7 negativas para todos los virus y el control positivo (Muestra RM00017). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A06	FAM	RM00099	37.82	A06	HEX	RM00099	25.52	A06	Cy5	RM00099	35.40
B06	FAM	RM00101	N/A	B06	HEX	RM00101	22.70	B06	Cy5	RM00101	33.22
C06	FAM	RM00103	N/A	C06	HEX	RM00103	26.99	C06	Cy5	RM00103	31.36
D06	FAM	RM00104	N/A	D06	HEX	RM00104	28.43	D06	Cy5	RM00104	32.01
E06	FAM	RM00108	N/A	E06	HEX	RM00108	26.50	E06	Cy5	RM00108	31.36
F06	FAM	RM00114	N/A	F06	HEX	RM00114	26.33	F06	Cy5	RM00114	31.02
G06	FAM	RM00116	N/A	G06	HEX	RM00116	27.29	G06	Cy5	RM00116	31.24
H06	FAM	Control +	29.02	H06	HEX	Control +	24.64	H06	Cy5	Control +	31.80

Tabla 11. Valores de Ct obtenidos para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno (Cy5) durante el análisis de durante el análisis de muestras 7 negativas para todos los virus y el control positivo (Muestra RM00017). Tabla extraída de CFX96- Manager.

Strip 2

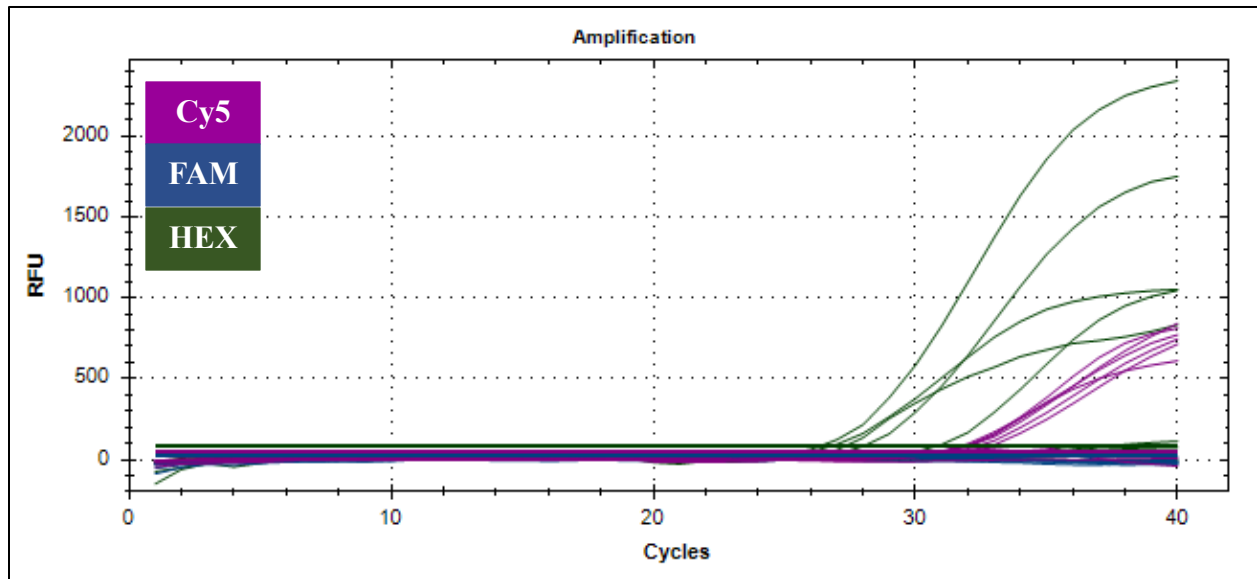


Figura 42. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control de inhibición (Cy5) durante el análisis de muestras 6 negativas para todos los virus y el control negativo (agua destilada). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A07	FAM	RM00116	N/A	A07	HEX	RM00116	35.79	A07	Cy5	RM00116	30.76
B07	FAM	RM00124	N/A	B07	HEX	RM00124	27.25	B07	Cy5	RM00124	N/A
C07	FAM	RM00129	N/A	C07	HEX	RM00129	27.93	C07	Cy5	RM00129	30.80
D07	FAM	RM00131	N/A	D07	HEX	RM00131	26.66	D07	Cy5	RM00131	31.50
E07	FAM	RM00132	N/A	E07	HEX	RM00132	26.27	E07	Cy5	RM00132	31.14
F07	FAM	RM00138	N/A	F07	HEX	RM00138	30.69	F07	Cy5	RM00138	31.34
G07	FAM	Control -	N/A	G07	HEX	Control -	36.91	G07	Cy5	Control -	31.03

Tabla 12. Valores de Ct obtenidos para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno (Cy5) durante el análisis de muestras 6 negativas para todos los virus y el control negativo (agua destilada). Tabla extraída de CFX96- Manager.

Resultados corrida 9:

Determinación del LOD a partir de diluciones seriadas 1/5

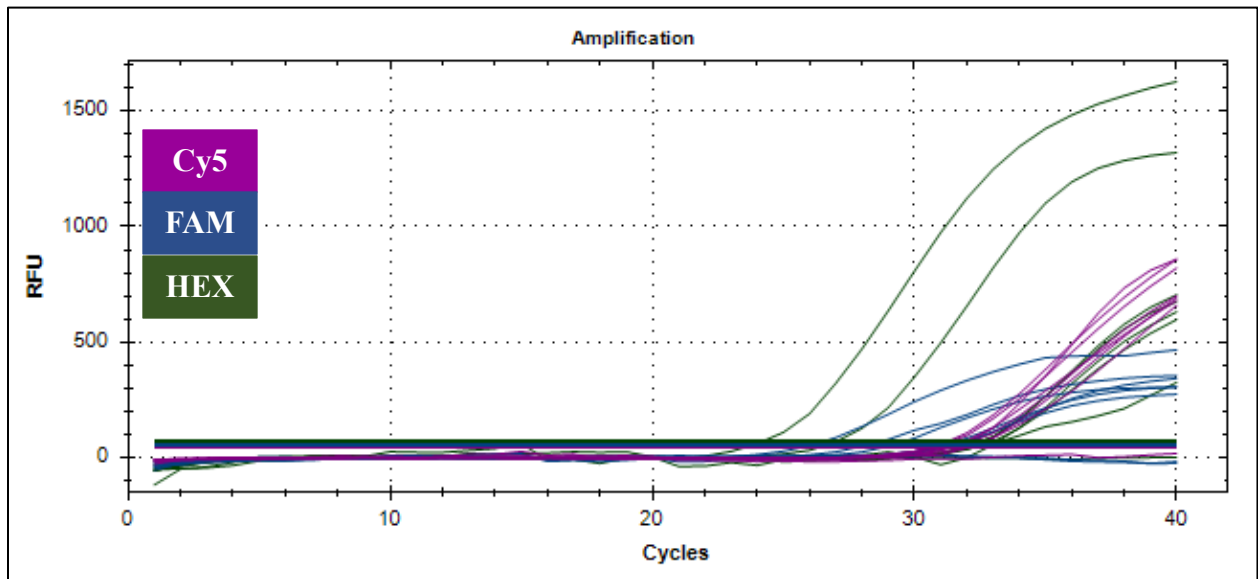


Figura 43. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno o de inhibición (Cy5) durante el análisis de 5 diluciones seriadas 1/5 a partir de la muestra RM00006, RM00117 (negativa para todos los virus), control positivo (RM00006) y control negativo (agua destilada). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A06	FAM	1/5	25.97	A06	HEX	1/5	33.40	A06	Cy5	1/5	N/A
B06	FAM	1/25	28.04	B06	HEX	1/25	33.24	B06	Cy5	1/25	32.00
C06	FAM	1/125	31.26	C06	HEX	1/125	33.07	C06	Cy5	1/125	31.06
D06	FAM	1/625	31.41	D06	HEX	1/625	32.63	D06	Cy5	1/625	30.55
E06	FAM	1/3125	31.01	E06	HEX	1/3125	32.60	E06	Cy5	1/3125	30.59
F06	FAM	RM00117	N/A	F06	HEX	RM00117	27.09	F06	Cy5	RM00117	31.36
G06	FAM	Control +	29.05	G06	HEX	Control +	24.28	G06	Cy5	Control +	31.89
H06	FAM	Control -	N/A	H06	HEX	Control -	N/A	H06	Cy5	Control -	31.26

Tabla 13. Valores de Ct obtenidos para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno (Cy5) durante el análisis de 5 diluciones seriadas 1/5 a partir de la muestra RM00006, RM00117 (negativa para todos los virus), control positivo (RM00006) y control negativo (agua destilada). Tabla extraída de CFX96- Manager.

Resultados Corrida 10

Determinación del LOD a partir de diluciones seriadas en base 10

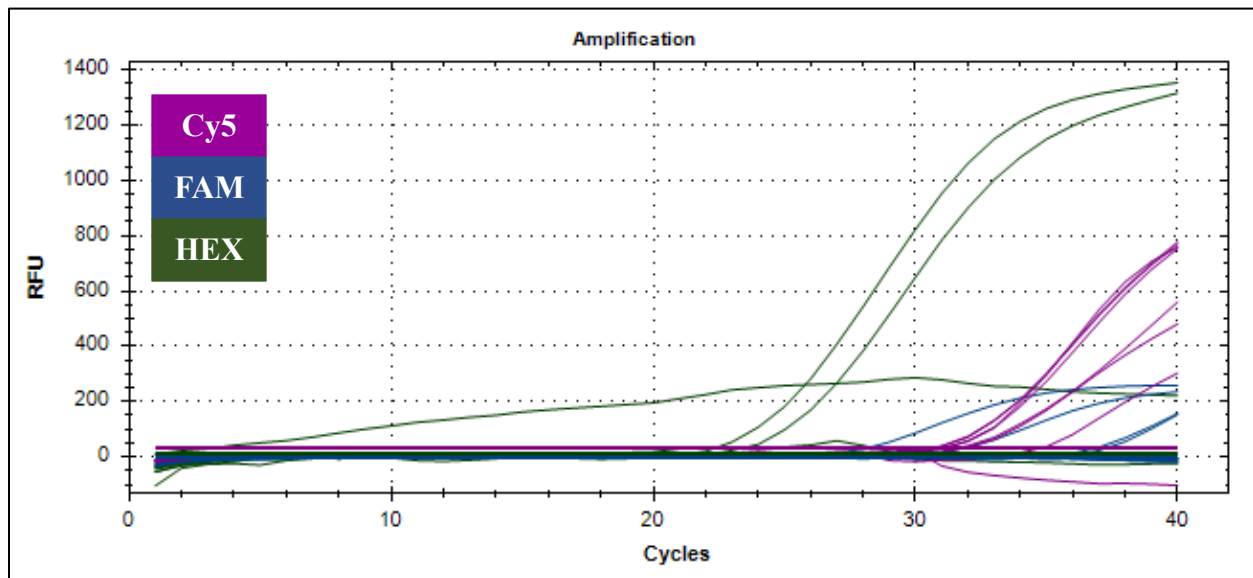


Figura 44. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno o de inhibición (Cy5) durante el análisis de 5 diluciones seriadas 1/10 a partir de la muestra RM00006, control negativo (agua destilada) control positivo (RM00006) y una nueva muestra positiva para RSV (RM00150). Imagen extraída de CFX96-Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A07	FAM	1/1.000	25.97	A07	HEX	1/1.000	N/A	A07	Cy5	1/1.000	N/A
B07	FAM	1/10.000	28.04	B07	HEX	1/10.000	33.24	B07	Cy5	1/10.000	34.84
C07	FAM	1/100.000	N/A	C07	HEX	1/100.000	N/A	C07	Cy5	1/100.000	30.71
D07	FAM	1/1.000.000	N/A	D07	HEX	1/1.000.000	N/A	D07	Cy5	1/1.000.000	31.14
E07	FAM	1/10.000.000	N/A	E07	HEX	1/10.000.000	N/A	E07	Cy5	1/10.000.000	30.69
F07	FAM	Control -	N/A	F07	HEX	Control -	N/A	F07	Cy5	Control -	31.15
G07	FAM	Control +	27.19	G07	HEX	Control +	24.57	G07	Cy5	Control +	31.66
H07	FAM	RM00150	31.05	H07	HEX	RM00150	23.37	H0	Cy5	RM00150	31.91

Tabla 14. Valores de Ct obtenidos para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno (Cy5) durante el análisis de 5 diluciones seriadas 1/10 a partir de la muestra RM00006, control negativo (agua destilada) control positivo (RM00006) y una nueva muestra positiva para RSV (RM00150). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Resultados Corrida 11: Reprocesamiento de muestras discordantes

Strip 1)

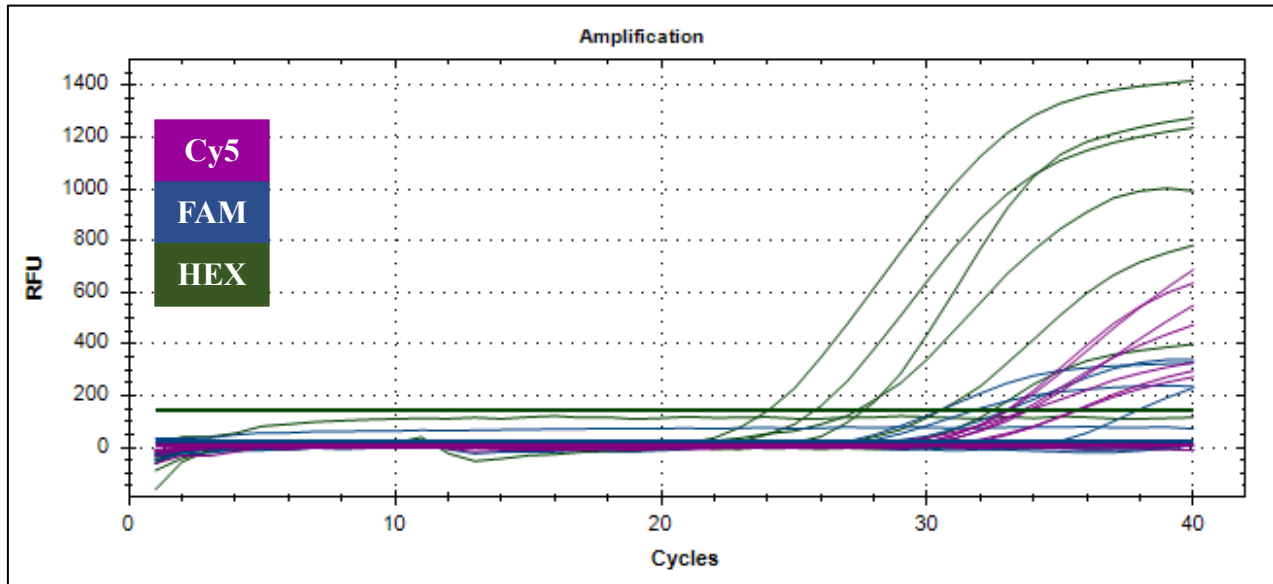


Figura 45. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control de inhibición (Cy5) durante el reprocesamiento de 7 muestras positivas para RSV y el control negativo (agua destilada). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A06	FAM	RM00001	27.74	A06	HEX	RM00001	27.28	A06	Cy5	RM00001	26.69
B06	FAM	RM00003	N/A	B06	HEX	RM00003	N/A	B06	Cy5	RM00003	30.34
C06	FAM	RM00009	N/A	C06	HEX	RM00009	32.37	C06	Cy5	RM00009	30.86
D06	FAM	RM00015	N/A	D06	HEX	RM00015	N/A	D06	Cy5	RM00015	29.98
E06	FAM	RM00030	26.82	E06	HEX	RM00030	30.42	E06	Cy5	RM00030	28.99
F06	FAM	RM00062	34.75	F06	HEX	RM00062	23.96	F06	Cy5	RM00062	28.38
G06	FAM	RM00133	N/A	G06	HEX	RM00133	27.55	G06	Cy5	RM00133	28.79
H06	FAM	Control +	31.05	H06	HEX	Control +	25.71	H06	Cy5	Control +	29.23

Tabla 15. Valores de Ct obtenidos para el control interno (Cy5), el fluoróforo (FAM) y el control endógeno (HEX) durante el reprocesamiento de 7 muestras positivas para RSV y el control negativo (agua destilada). Tabla extraída de CFX96- Manager.

Strip 2)

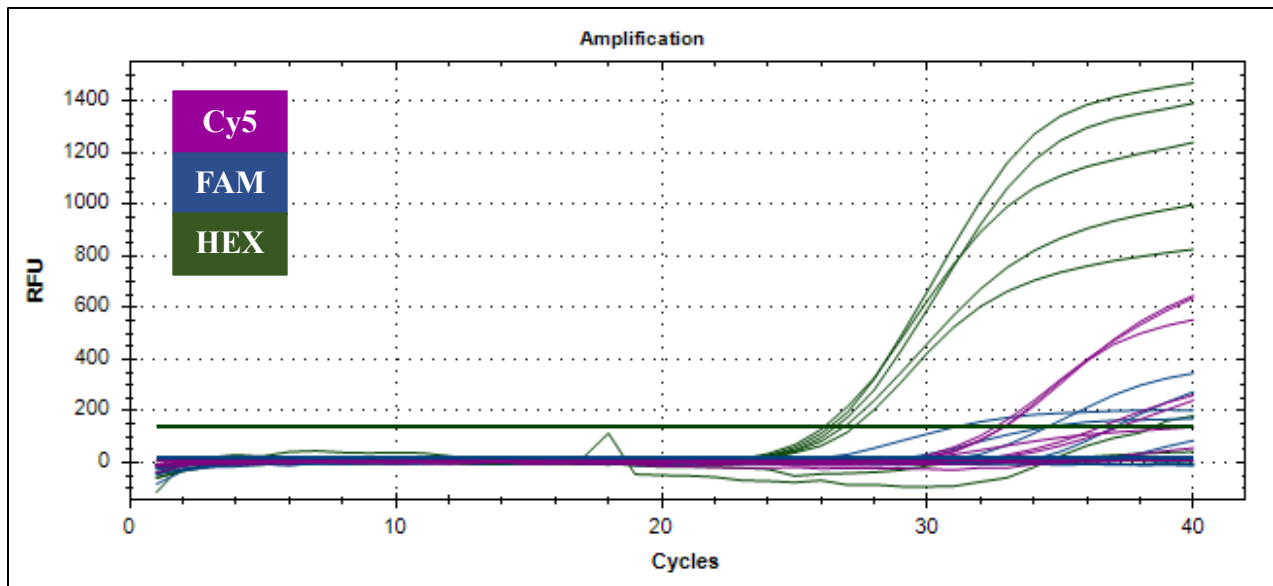


Figura 46. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control de inhibición (Cy5) durante el reprocesamiento de 2 muestras negativas para todos los virus, 4 muestras nuevas positivas para RSV y el control negativo (agua destilada). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A07	FAM	RM00099	37.02	A07	HEX	RM00099	38.51	A07	Cy5	RM00099	35.92
B07	FAM	RM00124	N/A	B07	HEX	RM00124	27.74	B07	Cy5	RM00124	29.12
C07	FAM	RM00151	31.25	C07	HEX	RM00151	26.54	C07	Cy5	RM00151	28.44
D07	FAM	RM00152	34.24	D07	HEX	RM00152	26.32	D07	Cy5	RM00152	29.26
E07	FAM	RM00153	26.14	E07	HEX	RM00153	26.86	E07	Cy5	RM00153	31.60
F07	FAM	RM00154	29.31	F07	HEX	RM00154	26.12	F07	Cy5	RM00154	31.39
G07	FAM	Control -	N/A	G07	HEX	Control -	N/A	G07	Cy5	Control -	29.05

Tabla 16. Valores de Ct obtenidos para el control interno (Cy5), el fluoróforo (FAM) y el control endógeno (HEX) durante el reprocesamiento de 2 muestras negativas para todos los virus, 4 muestras nuevas positivas para RSV y el control negativo (agua destilada). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Resultados corrida 12

Determinación del LOD a partir de cultivo celular de RSV

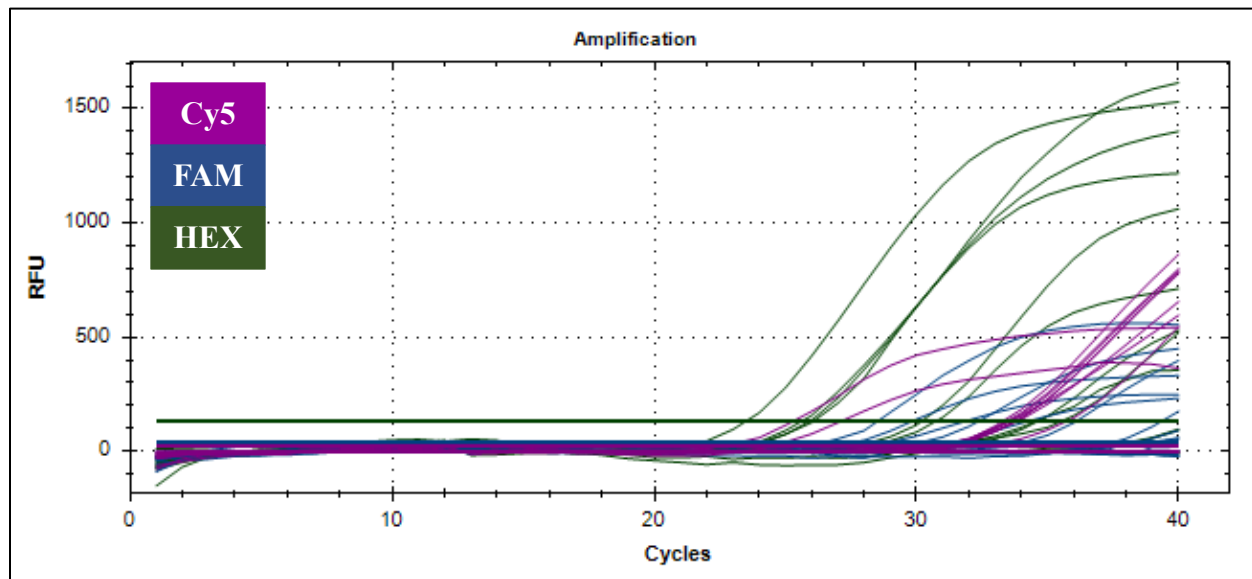


Figura 47. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno o de inhibición (Cy5) durante el análisis de 7 diluciones seriadas 1/10 a partir de cultivo de RSV y del control positivo (RM00006). Imagen extraída de CFX96-Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A07	FAM	1/10	26.49	A07	HEX	1/10	35.49	A07	Cy5	1/10	32.05
B07	FAM	1/100	30.16	B07	HEX	1/100	N/A	B07	Cy5	1/100	30.19
C07	FAM	1/1000	34.07	C07	HEX	1/1000	N/A	C07	Cy5	1/1000	30.40
D07	FAM	1/10.000	37.50	D07	HEX	1/10.000	N/A	D07	Cy5	1/10.000	31.78
E07	FAM	1/100.000	N/A	E07	HEX	1/100.000	N/A	E07	Cy5	1/100.000	30.36
F07	FAM	1/1.000.000	N/A	F07	HEX	1/1.000.000	N/A	F07	Cy5	1/1.000.000	30.94
G07	FAM	1/10.000.000	N/A	G07	HEX	1/10.000.000	N/A	G07	Cy5	1/10.000.000	30.37
H07	FAM	Control +	28.95	H07	HEX	Control +	23.37	H0	Cy5	Control +	30.56

Tabla 17. Valores de Ct obtenidos para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno (Cy5) durante el análisis de 7 diluciones seriadas 1/10 a partir de cultivo de RSV y del control positivo (RM00006). Imagen extraída de CFX96- Manager.

Resultados corrida 13

Determinación del LOD a partir de extracto de cultivo

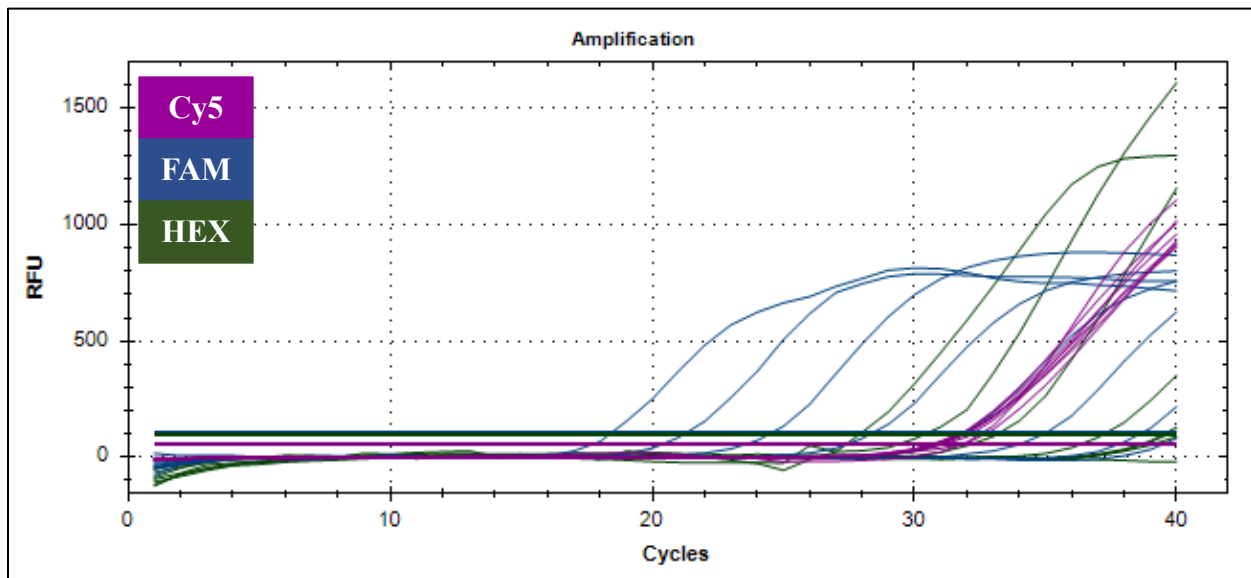


Figura 48. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno o de inhibición (Cy5) durante el análisis de 7 diluciones seriadas 1/10 a partir de cultivo de RSV y del extracto de cultivo “puro”. Imagen extraída de CFx96-Manager.

Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq	Well	Fluor	Sample	Cq
A07	FAM	Ext. Cul.	17.59	A07	HEX	Ext.cul.	27.84	A07	Cy5	Ext.cul	31.83
B07	FAM	1/10	20.25	B07	HEX	1/10	30.28	B07	Cy5	1/10	31.89
C07	FAM	1/100	23.40	C07	HEX	1/100	33.07	C07	Cy5	1/100	30.85
D07	FAM	1/1000	27.28	D07	HEX	1/1000	37.13	D07	Cy5	1/1000	30.95
E07	FAM	1/10.000	30.84	E07	HEX	1/10.000	N/A	E07	Cy5	1/10.000	31.04
F07	FAM	1/100.000	33.83	F07	HEX	1/100.000	33.39	F07	Cy5	1/100.000	30.74
G07	FAM	1/1.000.000	37.64	G07	HEX	1/1.000.000	39.57	G07	Cy5	1/1.000.000	31.16
H07	FAM	1/10.000.000	39.36	H07	HEX	1/10.000.000	N/A	H0	Cy5	1/10.000.000	30.69

Tabla 18. Valores de Ct obtenidos para el fluoróforo (FAM), el control endógeno (HEX) y el control interno (Cy5) durante el análisis de extracto de cultivo de RSV y 7 diluciones seriadas 1/10 realizadas a partir del mismo y del extracto de cultivo “puro”. Imagen extraída de CFx96-Manager.

Comparación de curvas de amplificación para la determinación del LOD a partir de cultivo RSV y de extracto de cultivo de RSV

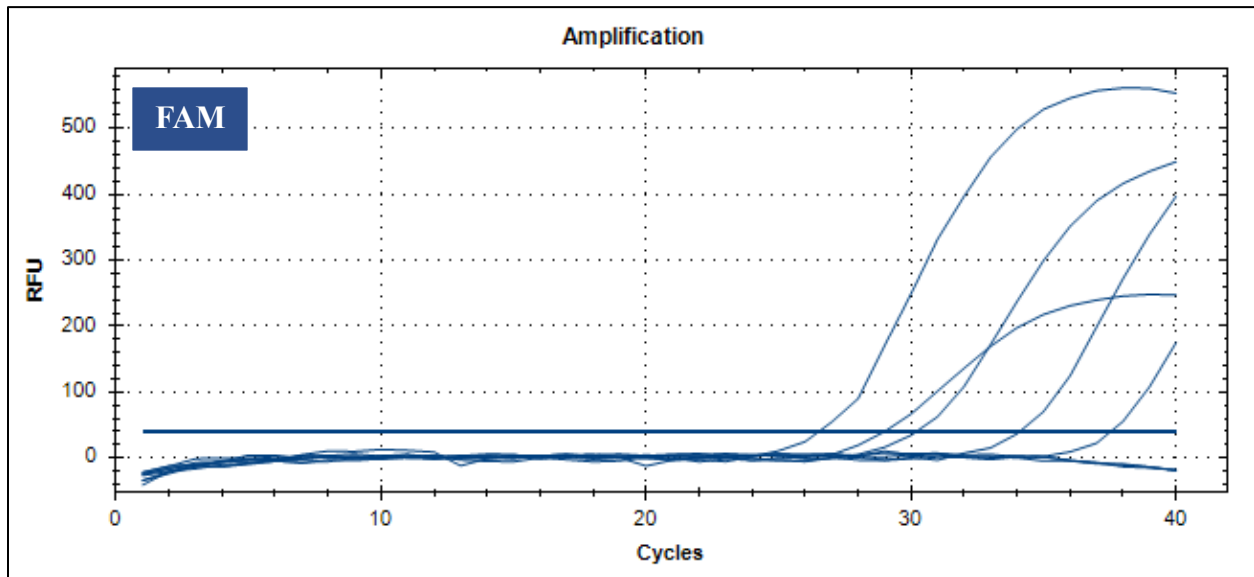


Figura 49. Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM) durante el análisis de 7 diluciones seriadas 1/10 a partir de cultivo de RSV. En el strip se añadió **8 ul de sobrenadante de cultivo congelado descongelado + 2 ul buffer lisis UM Qiagen**. Imagen extraída de CFX96- Manager.

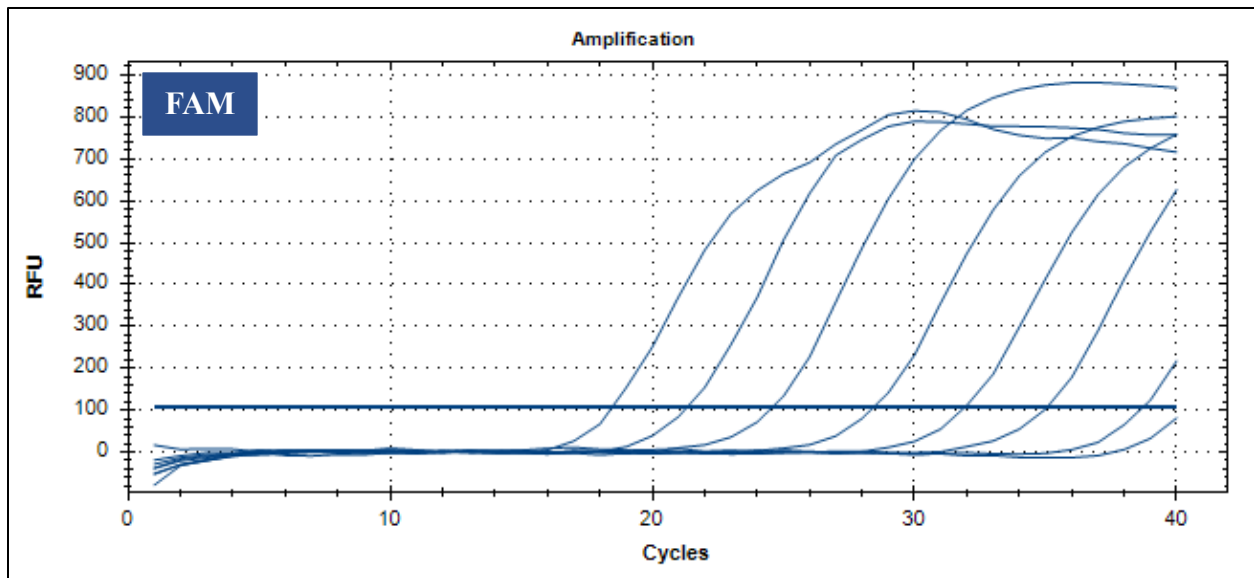


Figura 50 Curvas de amplificación obtenidas para el fluoróforo (FAM) durante el análisis de 7 diluciones seriadas 1/10 a partir de cultivo de RSV y del extracto de cultivo “puro”. En el strip se añadió **4 ul de extracto RNA de 50 ul de eluido de columna (material de partida: 200 ul de sobrenadante de cultivo extraído con columna Zymo Research y eluido AD)**. Imagen extraída de CFX96- Manager.

MUESTRA	PRIMER PROCESAMIENTO					SEGUNDO PROCESAMIENTO			
	Resultado Hospital		RT-qPCR Ct			Resultado Hospital	RT-qPCR		
	LAMP	IFD	FAM	HEX	Cy5	LAMP	FAM	HEX	Cy5
RM00001	-	Positivo	25.05	26.18	N/A	Detectable	27.74	27.28	26.69
RM00002	-	Positivo	34.32	25.09	31.26	-	-	-	-
RM00003	-	Positivo	Neg.	30.80	31.58	Detectable	Neg.	N/A	30.34
RM00004	-	Positivo	28.12	24.67	32.59	-	-	-	-
RM00005	-	Positivo	30.10	23.61	31.68	-	-	-	-
RM00006	-	Positivo	24.55	29.33	32.05	-	-	-	-
RM00007	-	Positivo	29.75	24.59	32.54	-	-	-	-
RM00008	Detectable	-	35.27	26.49	31.81	-	-	-	-
RM00009	-	Positivo	Neg.	26.06	N/A	Detectable	Neg.	32.37	30.86
RM00010	-	Positivo	25.79	30.17	30.84	-	-	-	-
RM00011	Detectable	-	25.94	24.55	30.33	-	-	-	-
RM00012	Detectable	-	26.77	22.88	29.60	-	-	-	-
RM00013	Detectable	-	31.25	22.31	30.46	-	-	-	-
RM00014	Detectable	-	29.57	26.03	29.47	-	-	-	-
RM00015	Detectable	-	Neg.	22.70	30.02	Detectable	Neg.	N/A	29.98
RM00016	Detectable	-	28.07	28.65	34.24	-	-	-	-
RM00017	Detectable	-	24.50	22.53	31.97	-	-	-	-
RM00018	Detectable	-	32.82	30.27	30.37	-	-	-	-
RM00019	Detectable	-	27.39	24.78	33.68	-	-	-	-
RM00021	Detectable	-	27.33	30.54	29.50	-	-	-	-
RM00020	Detectable	-	30.42	26.10	30.41	-	-	-	-
RM00030	-	Positivo	28.77	25.50	N/A	Detectable	26.82	30.42	28.99
RM00037	-	Positivo	31.30	27.15	31.30	-	-	-	-
RM00041	-	Positivo	30.12	27.35	32.38	-	-	-	-
RM00043	-	Positivo RSV y hMPV	28.43	25.47	31.53	-	-	-	-

RM00044	-	Positivo	26.95	26.93	31.05	-	-	-	-
RM00045	-	Positivo	25.11	24.36	32.83	-	-	-	-
RM00057	Detectable	-	36.16	23.94	31.51	-	-	-	-
RM00062	Detectable	-	32.47	23.91	N/A	Detectable	34.75	23.96	29.38
RM00081	Detectable	-	27.47	30.49	32.88	-	-	-	-
RM00083	Detectable	-	29.17	23.59	34.04	-	-	-	-
RM00102	Detectable	-	29.09	23.27	34.15	-	-	-	-
RM00113	Detectable	-	29.19	26.10	32.95	-	-	-	-
RM00133	Detectable	-	Neg.	27.29	32.23	Detectable	N/A	27.55	28.79
RM00140	Detectable	-	25.71	23.00	35.66	-	-	-	-
RM00150	-	Positivo	28.2			-	-	-	-
RM00151	Detectable	-	31.25	26.54	28.44	-	-	-	-
RM00152	Detectable	-	34.24	26.32	29.26	-	-	-	-
RM00153	-	Positivo	26.14	26.86	31.60	-	-	-	-
RM00154	-	Positivo	29.31	26.12	31.39	-	-	-	-

Cuadro 1. Comparación de los resultados obtenidos para las muestras RSV positivas procesadas por las técnicas disponibles en el Hospital Mi Pueblo y por nuestro ensayo, RT-qPCR. Las muestras con resultados discordantes entre las metodologías analizadas se procesaron nuevamente.

PRIMER PROCESAMIENTO					
MUESTRA	Resultado Hospital		RT-qPCR Ct		
	LAMP	IFD	FAM	HEX	Cy5
	RM00033	-	Positivo hMPV	Negativo	25.50
RM00035	-	Positivo hMPV	Negativo	29.45	33.23
RM00038	-	Positivo hMPV	Negativo	26.00	31.22
RM00039	-	Positivo hMPV	Negativo	24.16	31.51
RM00134	Detectable Flu A	-	Negativo	26.94	33.33
RM00139	Detectable Flu A	-	Negativo	26.06	32.63
RM00142	Detectable Flu B	-	Negativo	24.02	34.46
RM00143	Detectable Flu B	-	Negativo	26.45	32.29
RM00144	Detectable Flu B	-	Negativo	27.68	29.35
RM00145	Detectable Flu B	-	Negativo	26.50	30.93
RM00146	Detectable Flu B	-	Negativo	24.89	30.21
RM00147	Detectable Flu B	-	Negativo	25.68	30.20
RM00141	-	Positivo Flu B	Negativo	24.18	30.09
RM00029	-	Positivo hMPV	Negativo	28.30	33.72
RM00031	-	Positivo hMPV	Negativo	27.40	23.12
RM00032	-	Positivo hMPV	Negativo	24.02	30.52
RM00034	-	Positivo hMPV	Negativo	25.22	28.62
RM00036	-	Positivo hMPV	Negativo	23.80	29.84
RM00040	-	Positivo hMPV	Negativo	26.40	30.45
RM00042	-	Positivo hMPV	Negativo	24.57	30.16

Cuadro 2. Comparación de los resultados obtenidos para las muestras RSV negativas pero positivas para otros virus (11hMPV, 2 Flu A, 8 Flu B) procesadas por las técnicas disponibles en el Hospital Mi Pueblo y por nuestro ensayo, RT-qPCR.

MUESTRA	PRIMER PROCESAMIENTO				SEGUNDO PROCESAMIENTO			
	Resultado Hospital	RT-qPCR Ct			Resultado Hospital	RT-qPCR		
	IFD	FAM	HEX	Cy5	LAMP	FAM	HEX	Cy5
RM00099	Negativo	37.62	25.52	35.40	No detectable	37.02	38.51	35.92
RM00101	Negativo	Negativo	22.70	33.22	-	-	-	-
RM00103	Negativo	Negativo	26.99	31.36	-	-	-	-
RM00104	Negativo	Negativo	28.43	32.01	-	-	-	-
RM00108	Negativo	Negativo	26.50	31.36	-	-	-	-
RM00114	Negativo	Negativo	26.33	32.02	-	-	-	-
RM00116	Negativo	Negativo	27.29	31.24	-	-	-	-
RM00117	Negativo	Negativo	35.79	N/A	-	Negativo	27.09	31.36
RM00124	Negativo	Negativo	27.25	N/A	-	Negativo	27.24	29.12
RM00129	Negativo	Negativo	27.93	30.80	-	-	-	-
RM00131	Negativo	Negativo	26.66	31.80	-	-	-	-
RM00132	Negativo	Negativo	26.27	31.14	-	-	-	-
RM00138	Negativo	Negativo	30.69	31.34	-	-	-	-

Cuadro 3. Comparación de los resultados obtenidos para las muestras negativas para todos los virus procesadas por las técnicas disponibles en el Hospital Mi Pueblo y por nuestro ensayo, RT-qPCR.

Estimación del LOD de RT-qPCR y comparación con el método molecular comercial ID NOW™ RSV de Abbott Laboratories a partir de una muestra RSV positiva, cultivo celular de RSV o extracto de cultivo.

Dilución	RT-qPCR (FAM)	ID NOW™ RSV ABBOT
1/5	Ct= 25.97	Detectable
1/25	Ct= 28.04	Detectable
1/125	Ct= 31.26	Detectable
1/625	Ct= 31.41	Detectable
1/3125	Ct=31.01	Detectable

Cuadro 4. Comparación de los resultados obtenidos para la determinación del LOD por LAMP y por RT-qPCR, a partir de diluciones seriadas 1/5 realizadas con muestra RSV positiva (RM00006)

Dilución	RT-qPCR (FAM)	ID NOW™ RSV ABBOT
1/1.000	Ct= 36.68	Detectable
1/10.000	Ct= 37.24	Detectable
1/100.000	N/A	No detectable
1/1.000.000	N/A	No detectable
1/10.000.000	N/A	No detectable

Cuadro 5. Comparación de los resultados obtenidos para la determinación del LOD por LAMP y por RT-qPCR, a partir de diluciones seriadas 1/10 realizadas con muestra RSV positiva (RM00006).

Dilución	RT-qPCR (FAM)	ID NOW™ RSV ABBOT
1/10	Ct= 26.49	Detectable
1/100	Ct= 30.16	Detectable
1/1000	Ct= 34.07	Detectable
1/10.000	Ct= 37.57	Detectable
1/100.000	Ct= N/A	Detectable
1/1.000.000	Ct= N/A	Detectable
1/10.000.000	Ct= N/A	No detectable

Cuadro 6. Comparación de los resultados obtenidos para la determinación del LOD por LAMP y por RT-qPCR, mediante diluciones seriadas 1/10 realizadas a partir de cultivo de RSV.

Dilución	RT-qPCR (FAM)	ID NOW™ RSV ABBOT
1/10	Ct= 20.54	Detectable
1/100	Ct= 23.78	Detectable
1/1000	Ct= 27.60	Detectable
1/10.000	Ct= 31.60	Detectable
1/100.000	Ct= 34.18	Detectable
1/1.000.000	Ct=37.97	Detectable
1/10.000.000	Ct= 39.64	No detectable

Cuadro 7. Comparación de los resultados obtenidos para la determinación del LOD por LAMP y por RT-qPCR, mediante diluciones seriadas 1/10 realizadas a partir de extracto cultivo de RSV.

8. Discusión de resultados

En este trabajo se puso a punto un ensayo de RT-PCR en tiempo real de tipo monoplex para la detección temprana de RSV en pacientes pediátricos, utilizando el Kit QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen (ver sección 6.2), primers y sondas (sección 6.1) específicos para el virus en cuestión. Con este fin, como ya hemos mencionado anteriormente, se procesaron muestras que habían sido determinadas como positivas para RSV por distintos métodos de rutina en el laboratorio clínico y muestras negativas para RSV, algunas de ellas positivas para otros virus y/o negativas para todos los virus testeados. La presencia o no del agente viral en la muestra fue determinada, en principio, por las técnicas disponibles en el Hospital Mi Pueblo, IFD y amplificación isotérmica mediada por bucle (ver sección 5).

En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos para las muestras RSV positivas luego de ser procesadas por cada metodología. De esta tanda, las comprendidas entre RM00001 y RM00020 inclusive, fueron recolectadas en el año 2021. En este rango, RM00003 confirmada por IFD y RM00015 confirmada por LAMP no amplificaron en FAM (Figura 31 y figura 32) cuando las mismas fueron procesadas por nuestra RT-qPCR. Ante esta discordancia en los resultados nos planteamos posibles escenarios. En primer lugar, consideramos que podría tratarse de una muestra mal recolectada, con escasa celularidad y en consecuencia poco material genético, o que se hubiera deteriorado por mala conservación, transporte no adecuado, entre otras razones (recordar que las muestras permanecieron más de un año a temperatura de congelador, no de freezer). No obstante, si observamos los valores de Ct que arrojaron los controles endógeno (de celularidad) e interno (de inhibición) notamos que estos amplificaron en sus respectivos canales con lo cual, podemos afirmar que la muestra tiene celularidad y que no hay inhibidores presentes en la misma, que pudieran interferir en la amplificación del fluoróforo (FAM). Para este punto, nos permitimos pensar que el material genético pudo haberse deteriorado, dado que al ser RNA es lábil al calor o que hubo un error durante el procedimiento de laboratorio en el manipulado de la muestra. Es sabido que el DNA y el RNA se degradan con el tiempo y temperaturas ambientales pero el RNA se degrada mucho más rápidamente dada su estructura química y la ubicuidad y estabilidad de las RNAsas de origen humano y ambiental (Beckskei, A., et al., 2022 ; Seear, P. J., et al., 2008).

Ahora bien, no conformes con esta divergencia procesamos las muestras nuevamente por el método basado en la amplificación isotérmica y por nuestro ensayo, obteniendo reproducibilidad de resultados en LAMP, siendo detectable RSV y dándonos a entender que el virus está presente en las muestras. Sin

embargo, repitieron negatividad cuando las mismas se analizaron por real time. En discrepancia con el resultado del primer procesamiento, los controles de celularidad (HEX) no amplificaron en el segundo estudio (procesamiento). En este punto, consideramos que las muestras se deterioraron durante el congelado-descongelado para el trabajo en mesada, el transporte al Hospital, la conservación a temperatura no adecuada y la remisión nuevamente a nuestro laboratorio.

En el caso de RM00009, se detectó amplificación por real time para el control de celularidad, pero no para el fluoróforo (FAM) ni para el control de inhibición (Cy5). Con esto podemos asumir que probablemente en la muestra haya presencia de inhibidores de las actividades enzimáticas de la RT o de la polimerasa de nuestro ensayo (sección 6.2). Por este motivo, la muestra fue analizada una segunda vez por LAMP donde RSV fue detectable y por RT-qPCR sin cambiar los parámetros ni hacer ningún acondicionamiento especial, repitió negatividad para FAM pero no para el control interno detectado en el canal Cy5 permitiéndonos descartar la presencia de inhibidores en la muestra. Por esto, consideramos que la divergencia de resultados entre ambos ensayos se debe a la diferencia en el volumen requerido para cada técnica (8ul para RT-qPCR respecto de 200 ul que necesita el equipo de ID NOW RSV) y, por ende, a la cantidad variable de material genético presente en el volumen tomado. Es por esto, que cuando se trabaja con volúmenes tan pequeños, como 8 ul, es importante que la muestra sea bien acondicionada previamente (vortexeada y centrifugada) para asegurarnos de tomar un volumen con considerable cantidad de células y material genético. Esto es particularmente cierto en muestras clínicas tan heterogéneas como las respiratorias cuyo contenido de mucus, células y debris celular no se distribuye homogéneamente y la toma de un micro volumen para el proceso de lisis implica cierto grado de incertidumbre muestral. El proceso de extracción, por otro lado, parte de un volumen mucho mayor y esta incertidumbre es menor.

Otro dato relevante de este rango muestrario, es que RM00001 mostró rasgos de inhibición dado que en el canal Cy5 no se detectó amplificación cuando la misma fue analizada por real time. Con esto, asumimos que en la muestra hay presencia de inhibidores. RM00001 se procesó nuevamente por el método de amplificación isotérmica detectando presencia de VSR, confirmando que la muestra contiene material genético viral. Antes de someter la muestra a nuestro ensayo, se vortexeó, centrifugó y se homogeneizó, tomándose con cuidado el volumen requerido. En discrepancia con los resultados obtenidos en el primer procesamiento por nuestro ensayo, los controles endógeno (HEX), exógeno (Cy5) y el fluoróforo (FAM) amplificaron. Estos nuevos datos, nos permiten descartar la presencia de

inhibidores (Cy5), la pérdida de celularidad (HEX) o material genético viral (FAM). Confirmamos positividad de RM00001 para VSR.

Las muestras comprendidas entre RM00030 y RM00140 fueron recolectadas durante el período epidemiológico característico para el Virus Respiratorio Sincitial correspondiente al año 2022. En este rango, RM00030 y RM00062 cuya positividad fue confirmada por IFD y por LAMP respectivamente, al igual que RM00009, mostraron resultados discordantes cuando se analizaron por real time, donde no se detectó amplificación en el canal de Cy5. Las conclusiones son las mismas que las razonadas para RM00009, por ende, creemos que la muestra tiene inhibidores. En un segundo procesamiento por amplificación isotérmica mediada por bucle y por RT-qPCR, se obtuvieron resultados concordantes dado que se descartó presencia de inhibidores ya que el control interno amplificó. FAM y HEX repitieron amplificación. RM00030 y RM00062 son positivas para RSV.

En el caso de RM00133, se procesó primeramente por una de las técnicas del Hospital Mi Pueblo (LAMP), siendo detectable para VSR. Sin embargo, cuando la muestra fue analizada mediante nuestro ensayo la misma arrojó un resultado negativo dado que no hubo amplificación en el canal detectado por el fluoróforo (FAM). No obstante, para los controles endógeno e interno se detectó amplificación en sus respectivos canales. Con esto, podemos asumir que, en la muestra hay celularidad (HEX) y no muestra presencia de inhibidores (Cy5) de las actividades enzimáticas de la RT o de la polimerasa de nuestro ensayo.

La muestra fue remitida al Hospital para ser procesada por la metodología basada en la amplificación isotérmica en la que RSV fue detectable, concluyendo que RM00133 es positiva para el Virus Respiratorio Sincitial. Ahora bien, al analizar la muestra por nuestra RT-qPCR se obtuvo reproducibilidad de resultados, siendo negativa para VSR pero afirmando presencia de celularidad y ausencia de inhibidores. Esta divergencia de resultados entre ambas metodologías puede deberse a la diferencia de volumen requerido para cada ensayo (como bien ya hemos mencionado anteriormente).

Por último, fueron procesadas 4 muestras recolectadas en el corriente año cuyos resultados fueron concordantes con cada metodología.

El cuadro 2 compara los resultados obtenidos para las muestras comprendidas entre RM00033 y RM00042, las cuales se corresponden con muestras positivas para otros virus tales como hMPV, Influenza A e Influenza B, y negativas para VSR. Los resultados obtenidos durante el procesamiento

por IFD, LAMP y real time fueron concordantes. Para nuestro ensayo, los controles interno y endógeno evidenciaron valores favorables permitiéndonos descartar que las muestras se hubiesen deteriorado o que en las mismas hubiese presencia de inhibidores.

Finalmente, el cuadro 3 refleja los resultados obtenidos para el análisis de las muestras consideradas como negativas para todos los virus (comprendidas entre RM00099 y RM00138). Un aspecto importante a mencionar es que RM00099 rindió un resultado positivo para VSR reflejado en un valor de $Ct = 37,87$ cuando la misma fue analizada por nuestra metodología. En principio, si bien se tomaron todas las medidas de “cuidado” al momento de acondicionar la muestra, consideramos que este resultado podía deberse a una posible contaminación durante el desarrollo del trabajo experimental (la preparación de la misma). En consecuencia, analizamos RM00099 nuevamente por el método que se basa en la amplificación isotérmica mediada por bucle repitiendo negatividad para VSR en tanto que, cuando volvimos a procesar la muestra por nuestra técnica, hubo repetibilidad en el resultado, dando positiva para VSR con un valor de $Ct = 37.07$ sobre el límite superior de ciclos de la real time (40 ciclos) para este ensayo. En base a estos datos, podemos afirmar que, en este caso en particular, nuestra metodología resulta ser más sensible respecto de la IFD y de LAMP. La RT-qPCR puede detectar la presencia de material genético viral, incluso en muestras con escasa celularidad y muy baja cantidad de virus y a partir de muestras con volúmenes escasos, dado que solo requiere 8 μ l de material biológico para el procesamiento. Estas características hacen de la RT-qPCR una técnica más sensible que la IFD al igual que el LAMP, sin embargo, dado que las dos técnicas moleculares utilizan distintas enzimas, en casos límite, ambas podrían o no detectar un blanco dependiendo del mayor o menor impacto que puedan tener distintos inhibidores sobre los dos juegos de enzimas.

Para este trabajo no es factible hablar de sensibilidad ni especificidad dado que para ello hace falta realizar en paralelo los ensayos en prueba y el de referencia con un número importante de muestras positivas, negativas y positivas para agentes de presentación clínica similar. En este caso, el planteo era verificar la utilidad de nuestra RT-qPCR como un test cuyo desempeño fuera comparable y no inferior a las técnicas comerciales en uso en el hospital. En base a los resultados hallados, es posible afirmar que nuestra técnica resultó comparable y muy probablemente no inferior a los métodos en uso en el hospital, uno de ellos de base molecular. Podemos concluir que la metodología puesta a punto aquí, es más que aceptable ya que como evidentes ventajas nos permite evaluar no solo la calidad de la muestra (dado que el kit utilizado incluye control de celularidad), la presencia de inhibidores (el kit incluye el control interno) sino también la cantidad de material genético vírico presente en la misma. En contraste,

mediante IFD solo se puede evaluar la calidad de la muestra cuando la misma es observada al microscopio óptico de fluorescencia arrojando resultados enunciados como “positivo IFD” o “negativo IFD”. En discrepancia con RT-qPCR, la técnica basada en amplificación isotérmica solo detecta o no la presencia del agente viral, no pudiendo estimar cantidad ya que es una metodología cualitativa cuyos resultados se expresan como “detectable LAMP” / “no detectable LAMP”. Esa limitante es la razón por la cual, en el Hospital Mi Pueblo de Florencio Varela, se usan las técnicas en conjunto a fin de aumentar el rendimiento de las mismas y otorgar un resultado más confiable.

Como ventajas comparativas, nuestro ensayo nos permite evaluar todos estos parámetros (calidad y cantidad) en conjunto no teniendo la necesidad de recurrir a otros métodos de diagnóstico molecular para brindar resultados lo más fidedignos posibles. Además, con nuestra metodología podemos analizar hasta 96 muestras en simultáneo y visualizar la corrida en tiempo real.

Estimación del LOD de RT-qPCR y comparación con el método molecular comercial ID NOW™ RSV de Abbott Laboratories a partir de una muestra RSV positiva.

La determinación del LOD se realizó para RT-qPCR y LAMP a fin de establecer una comparación entre ambas metodologías y poder determinar qué técnica es más sensible. En principio, en el cuadro 4 observamos que a partir de las diluciones en serie en base 5 (ver sección 6.5), no se pudo determinar un límite de detección para ninguna de las metodologías dado que incluso para la mayor dilución realizada (1/3125) se detectó presencia de virus (figura 41). Por este motivo, repetimos el estudio, con diluciones en base 10 (a partir de la misma muestra). Con esto, pudimos establecer un LOD de 10^{-4} para las dos metodologías comparadas (Cuadro 5). Sin embargo, para real time no obtuvimos el aumento de Ct teórico esperado para diluciones seriadas en base 10 que es de aproximadamente 3,3 por cada dilución al décimo a partir de un mismo material de partida. Probablemente, el hecho de que no se obtuvieran las curvas esperadas se debe a la presencia de interferentes en la muestra (Figura 42).

Estimación del LOD de RT-qPCR y comparación con el método molecular comercial ID NOW™ RSV de Abbott Laboratories a partir de un cultivo de RSV

Consecuentemente, a fin de evitar resultados afectados por interferentes o deterioro de la muestra, procedimos a realizar la determinación del LOD a partir de cultivo puro de RSV (ver sección 6.5.1). En

el cuadro 6 se muestran los resultados alcanzados para cada técnica. En este caso, el LOD fue mayor para la amplificación isotérmica mediada por bucle alcanzando un límite de 10^{-6} , respecto de RT-qPCR cuyo límite obtenido fue de 10^{-4} . Sin embargo, logramos que la progresión del aumento de Ct por dilución en base 10 estuviera muy cerca de la ideal (Figura 49) esperable en las curvas de amplificación del fluoróforo, FAM. Como ya hemos mencionado en líneas anteriores, la divergencia en LOD entre los dos métodos podría deberse a la considerable diferencia de volumen requerido para cada técnica (8ul real time y 200 ul para LAMP). Por esta razón determinamos el LOD a partir del extracto de RNA del virus de cultivo (6.5.2) partiendo de una cantidad igual para los dos métodos y, en el cuadro 7 podemos observar que ahora, RT-qPCR supera el límite de detección de IDNOW RSV Abbot, siendo de 10^{-7} y 10^{-6} respectivamente.

9. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos y las consideraciones mencionadas anteriormente, concluimos que a partir del extracto de cultivo de RSV logramos aumentar la sensibilidad para nuestro ensayo (RT-qPCR), respecto de la amplificación isotérmica. Siendo el LOD de 10^{-7} para real time y de 10^{-6} para IDNOW RSV Abbot. Esto viene de la mano con que los resultados se ven afectados por la cantidad de volumen requerida para cada técnica y la cantidad de material genético que se recolecte en esos volúmenes.

Concluimos que la técnica puesta a punto funciona bien al igual que los primer y probe utilizada. Además, como gran ventaja RT-qPCR nos permite analizar hasta 96 muestras en simultáneo, además de visualizar los resultados en tiempo real conforme las muestras están en el equipo termociclador y arrojando resultados en aproximadamente una hora y veinte minutos (varía según el protocolo utilizado). En tanto que mediante ID NOW RSV Abbot solo se puede analizar una muestra por vez, arrojando resultados en un tiempo no mayor a 15 minutos y permitiendo diagnosticar así solo cuatro muestras en una hora.

En cuanto a la capacidad de detección, se puede concluir que ambos métodos se desempeñaron casi en forma equivalente, pero, basados en los resultados de LOD obtenidos previa extracción del RNA, es muy posible que la RT-qPCR supere en sensibilidad analítica a la técnica isotérmica de Abbott. Estas características nos permiten afirmar que RT-qPCR puede ser una opción más adecuada para el laboratorio clínico que IFD y IDNOW RSV Abbot dado que puede detectar presencia de virus donde LAMP o IFD no pueden, es más versátil y económica, permite la opción de multiplexado, el procesamiento de muchas más muestras por hora y la posibilidad de modificación por el operador.

Fuentes de información y referencias bibliográficas:

- ✓ **Acosta, P. L., M. T. Caballero, and F. P. Polack.** 2015. Brief History and Characterization of Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease. *Clinical and vaccine immunology : CVI* **23**:189-195.
- ✓ **Ali, A., G. Lopardo, B. Scarpellini, R. T. Stein, and D. Ribeiro.** 2020. Systematic review on respiratory syncytial virus epidemiology in adults and the elderly in Latin America. *Int J Infect Dis* **90**:170-180.
- ✓ **Ali, A., G. Lopardo, B. Scarpellini, R. T. Stein, and D. Ribeiro.** 2019. Systematic Review on Respiratory Syncytial Virus epidemiology in adults and the elderly in Latin America. *Int J Infect Dis* **25**:30418-30417.
- ✓ **Aranda, S. S., and F. P. Polack.** 2019. Prevention of Pediatric Respiratory Syncytial Virus Lower Respiratory Tract Illness: Perspectives for the Next Decade. *Frontiers in immunology* **10**:1006.
- ✓ **Barenfanger, J., C. Drake, N. Leon, T. Mueller, and T. Troutt.** 2000. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *Journal of clinical microbiology* **38**:2824-2828.
- ✓ **Becskei, A., and S. Rahaman.** 2022. The life and death of RNA across temperatures. *Computational and structural biotechnology journal* **20**:4325-4336.
- ✓ **Biagi, C., A. Dondi, S. Scarpini, A. Rocca, S. Vandini, G. Poletti, and M. Lanari.** 2020. Current State and Challenges in Developing Respiratory Syncytial Virus Vaccines. *Vaccines* **8**.

- ✓ **Boom, R., C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen, and J. van der Noordaa.** 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology* **28**:495-503.

- ✓ **Borchers, A. T., C. Chang, M. E. Gershwin, and L. J. Gershwin.** 2013. Respiratory syncytial virus--a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* **45**:331-379.

- ✓ **Collins, P. L., and R. A. Karron.** 2013. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus, p. 1086-1123. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 6th ed, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins (LWW), Philadelphia, USA.

- ✓ **Fry, A. M., M. Chittaganpitch, H. C. Baggett, T. C. Peret, R. K. Dare, P. Sawatwong, S. Thamthitiwat, P. Areerat, W. Sanasuttipun, J. Fischer, S. A. Maloney, D. D. Erdman, and S. J. Olsen.** 2010. The burden of hospitalized lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in rural Thailand. *PloS one* **5**:0015098.

- ✓ **Geoghegan, S., A. Erviti, M. T. Caballero, F. Vallone, S. M. Zanone, J. V. Losada, A. Bianchi, P. L. Acosta, L. B. Talarico, A. Ferretti, L. A. Grimaldi, A. Sancilio, K. Duenas, G. Sastre, A. Rodriguez, F. Ferrero, E. Barboza, G. F. Gago, C. Nocito, E. Flamenco, A. R. Perez, B. Rebec, F. M. Ferolla, R. Libster, R. A. Karron, E. Bergel, and F. P. Polack.** 2017. Mortality due to Respiratory Syncytial Virus. Burden and Risk Factors. *American journal of respiratory and critical care medicine* **195**:96-103.

- ✓ **Gharabaghi, F., A. Hawan, S. J. Drews, and S. E. Richardson.** 2011. Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clin Microbiol Infect* **17**:1900-1906.

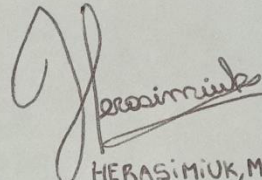
- ✓ **Griffiths, C., S. J. Drews, and D. J. Marchant.** 2017. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clin Microbiol Rev* **30**:277-319.

- ✓ **International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2022).** Taxon Details. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202201651

- ✓ **Knipe, David M.; Howley, Peter** (2013) “Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus”, Lippincott Williams & Wilkins (LWW), “Fields Virology” (6ta ed.,pp.1095-1096)
- ✓ **Popow-Kraupp, T., and J. H. Aberle.** 2011. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *Open Microbiol J* **5**:128-134.
- ✓ **Prendergast, C., and J. Papenburg.** 2013. Rapid antigen-based testing for respiratory syncytial virus: moving diagnostics from bench to bedside? *Future microbiology* **8**:435-444.
- ✓ **Read, S. J., D. Burnett, and C. G. Fink.** 2000. Molecular techniques for clinical diagnostic virology. *J Clin Pathol* **53**:502-506.
- ✓ **Richman, D. D., R. J. Whitley, and F. G. Hayden.** 2009. *Clinical virology*, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC.
- ✓ **Richman, D. D., R. J. Whitley, and F. G. Hayden,** 2017 *Clinical virology*, ASM Press, Washington, DC. “. Respiratory Syncytial Virus, Human Metapneumovirus, and Parainfluenza Viruses” (4ta ed,)
- ✓ **Rojo, G. L., S. Goya, M. Orellana, A. Sancilio, A. Rodriguez Perez, C. Montali, C. Garcia, L. Sosa, A. Musto, D. Alvarez, A. Castello, and M. Viegas.** 2017. Unravelling respiratory syncytial virus outbreaks in Buenos Aires, Argentina: Molecular basis of the spatio-temporal transmission. *Virology* **508**:118-126.
- ✓ **San Juan Vergara, ; Gutiérrez, Mohapatra, S.** (2006) “*Molecular biology of syncytial respiratory virus and development of phrophylactic strategies*”. *Salud Uninorte*, (vol. 22, núm. 2, pp. 135-153) Universidad del Norte Barranquilla, Colombia.
- ✓ **Shi, T., D. A. McAllister, K. L. O'Brien, E. A. F. Simoes, S. A. Madhi, B. D. Gessner, F. P. Polack, E. Balsells, S. Acacio, C. Aguayo, I. Alassani, A. Ali, M. Antonio, S. Awasthi, J. O. Awori, E. Azziz-Baumgartner, H. C. Baggett, V. L. Baillie, A. Balmaseda, A. Barahona, S. Basnet, Q. Bassat, W. Basualdo, G. Bigogo, L. Bont, R. F. Breiman, W. A. Brooks, S. Broor, N. Bruce, D. Bruden, P. Buchy, S. Campbell, P. Carosone-Link, M. Chadha, J. Chipeta, M. Chou, W. Clara, C. Cohen, E. de Cuellar, D. A. Dang, B. Dash-Yandag, M. Deloria-Knoll, M. Dherani, T. Eap, B. E. Ebruke, M. Echavarria, C. C. de Freitas Lázaro Emediato, R. A.**

Fasce, D. R. Feikin, L. Feng, A. Gentile, A. Gordon, D. Goswami, S. Goyet, M. Groome, N. Halasa, S. Hirve, N. Homaira, S. R. C. Howie, J. Jara, I. Jroundi, C. B. Kartasasmita, N. Khuri-Bulos, K. L. Kotloff, A. Krishnan, R. Libster, O. Lopez, M. G. Lucero, F. Lucion, S. P. Lupisan, D. N. Marcone, J. P. McCracken, M. Mejia, J. C. Moisi, J. M. Montgomery, D. P. Moore, C. Moraleda, J. Moyes, P. Munywoki, K. Mutyara, M. P. Nicol, D. J. Nokes, P. Nymadawa, M. T. da Costa Oliveira, H. Oshitani, N. Pandey, G. Paranhos-Baccalà, L. N. Phillips, V. S. Picot, M. Rahman, M. Rakoto-Andrianarivelo, Z. A. Rasmussen, B. A. Rath, A. Robinson, C. Romero, G. Russomando, V. Salimi, P. Sawatwong, N. Scheltema, B. Schweiger, et al. 2017. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet* **390**:946-958.

- ✓ **Srinivasakumar, N., P. L. Ogra, and T. D. Flanagan.** 1991. Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. *Journal of virology* **65**:4063-4069.
- ✓ **Williams, J. V., P. A. Piedra, and J. A. Englund.** 2017. Respiratory Syncytial Virus, Human Metapneumovirus, and Parainfluenza Viruses, p. 873-902. *In* D. D. Richman, R. J. Whitley, and F. G. Hayden (ed.), *Clinical Virology*, vol. 1. ASM Press, Washington DC.
- ✓ **Zhang, S., L. Z. Akmar, F. Bailey, B. A. Rath, M. Alchikh, B. Schweiger, M. G. Lucero, L. T. Nillos, M. H. Kyaw, A. Kieffer, S. Tong, H. Campbell, P. Beutels, and H. Nair.** 2020. Cost of Respiratory Syncytial Virus-Associated Acute Lower Respiratory Infection Management in Young Children at the Regional and Global Level: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of infectious diseases* **222**:S680-S687.



HERASIMUK, MELISA ANABEL
40.479.970