



**RIDUNAJ**  
Repositorio Institucional  
Digital UNAJ



Universidad Nacional  
**ARTURO JAURETCHE**

## Tesinas de Grado

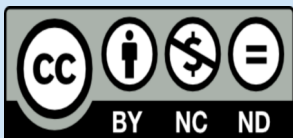
Viceconte, Sebastian

# Puesta a punto y comparación del desempeño de un reactivo nacional contra métodos de rutina en el laboratorio bioquímico para la detección del Virus Sincicial Respiratorio (VSR) por RT-qPCR

2025

*Instituto de 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:

Viceconte, Sebastian (2025). Puesta a punto y comparación del desempeño de un reactivo nacional contra métodos de rutina en el laboratorio bioquímico para la detección del Virus Sincicial Respiratorio (VSR) por RT-qPCR [Trabajo final de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche].

<https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/3180>

**“Puesta a punto y comparación del desempeño de un reactivo nacional  
contra métodos de rutina en el laboratorio bioquímico para la  
detección del Virus Sincicial Respiratorio (VSR) por RT-qPCR”**



**Carrera: Bioquímica**

**Instituto de Ciencias de la Salud**

**Alumno: Viceconte, Sebastian**

**Director: Dr. Castello, Alejandro**

**Co-Directora: Bqca. Diaz, Rosa Viviana**

**Fecha de entrega: 06/03/2025**

*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 del Dr. Alejandro Castello, profesor de Virología para la Carrera de Bioquímica, Instituto de Ciencias de La Salud, Universidad Nacional Arturo Jauretche y la codirección de la Bioquímica Rosa Viviana Díaz.*

## **Agradecimientos**

Quiero dar las gracias a la Dra. Viviana Fanessi quien me permitió realizar el trabajo final en las instalaciones del Centro de Medicina Traslacional del Hospital del Cruce más precisamente en los laboratorios de facilidades comunes.

También agradecerle al Dr. Alejandro Castello por aceptar mi petición de realizar el trabajo final bajo su tutela, el conocimiento brindado, los buenos ratos en el laboratorio, la paciencia y su guía al momento de realizar el trabajo.

Mencionar también la ayuda y el apoyo brindado por la Bioquímica Viviana Diaz no solo como profesora durante la cursada de virología sino también al momento de realizar el trabajo final.

Una parte importante de mi formación como profesional fue poder coincidir durante las cursadas con Adrián, Dani y Aye personas que fueron indispensables para llevar el día a día en la facultad, cada uno de ellos cumplía un rol diferente e importante, por eso son dignos de mención y agradecerles por su amistad y paciencia durante tantos años.

No quiero dejar afuera de esta sección a mi abuela Haydee, compañera de miles de mates, mirar novelas en conjunto y de siempre estar pendiente de mi progreso y alegrarse como si fuese mérito propio.

Por ultimo y no menos importante quería agradecer a mi círculo familiar más cercano, aquellas personas que son mis bases, mis pilares y hasta incluso mi techo; mi papa, mama y hermana. Es gracias a mis padres que soy la persona quien soy ahora, agradecido por ello no puedo expresar con palabras lo mucho que los amo. Gracias por soportar y apoyarme todos estos años, gracias por criarme y hacerme crecer en un ambiente lleno de amor y gracias por darme una familia de la cual siempre sentirme orgulloso.

## Resumen

La infección respiratoria aguda (IRA) producida por VSR es una de las principales causas de hospitalizaciones de lactantes y niños (1) y de una elevada morbilidad y mortalidad entre ancianos y adultos con condiciones debilitantes subyacentes (2). El diagnóstico preciso y rápido disminuye el uso innecesario de antibióticos y pruebas adicionales de laboratorio, el tiempo de hospitalización y la transmisión intrahospitalaria (3, 4). 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 utilizando la mix y reactivos suministrados por Productos Bio-Lógicos (PB-L) y comparación de los resultados obtenidos con las técnicas de rutina en un servicio hospitalario.

**Materiales y métodos:** Se utilizó el kit de One-Step qRT-PCR Plex de PB-L diseñados para realizar la RT y la qPCR 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 y el de Cy5 para el control endógeno (RNAsa-P). 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 sincicial respiratorio humano que resultó comparable en cuanto a su capacidad de amplificación a la isotérmica LAMP y que ofrece mayor sensibilidad con respecto a las técnicas de rutina de inmunofluorescencia directa (IFD). Es de destacar que los reactivos utilizados son de producción nacional por lo que, si se cuenta con el equipamiento, la RT-qPCR suma la economía a las grandes ventajas que ofrece: la mencionada mayor sensibilidad, gran versatilidad ya que permite la opción de multiplexado, el procesamiento de muchas más muestras por hora y la posibilidad de rediseño y modificación por el operador.

## **Abreviaturas**

**Ab / Ac:** Antibody – Anticuerpo

**ADN / DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**Ag:** Antígeno

**ARN / RNA:** Ácido Ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>:** Ácido Ribonucleico mensajero

**Ct / C<sub>q</sub>:** Cycle Threshold (Umbral del Ciclo)

**CV:** Carga Viral

**FDA:** Food and Drugs Administration / Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

**IF:** Inmunofluorescencia

**IFD:** Inmunofluorescencia Directa

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IRA:** Infección respiratoria aguda

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

**LOD:** Limite de detección

**PBS:** Phosphate-buffered saline / Buffer fosfato salino

**RT:** Retrotranscriptasa

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

**VSR / RSV:** Virus Respiratorio Sincitial

**TRI:** Tracto respiratorio inferior

**TRS:** Tracto respiratorio superior

## Índice

1- Justificación e importancia del tema -----	7
2- Virus respiratorio sincitial (VSR) -----	10
2.1- Presentación clínica y epidemiológica-----	10
2.2- Clasificación y estructura del VSR -----	10
2.3- Entrada y ciclo de infección -----	11
2.4- Transmisión -----	13
2.5- Prevención -----	14
2.6- Manejo clínico y tratamiento -----	14
3- Diagnostico -----	15
3.1- Diagnostico virológico -----	15
3.2- Diagnostico diferencial -----	15
3.3- Métodos de detección -----	16
3.3.1- Inmunofluorescencia -----	16
3.3.2- Loop-mediated isothermal amplification -----	19
3.3.3- RT-qPCR -----	21
4- Objetivos -----	24
5- Materiales y métodos -----	25
6- Desarrollo -----	30
6.1- Colección de muestras -----	30
6.2- Preparación de primers y probe -----	30
6.3- Extracción -----	30
6.3.1- Protocolo del PURO  Genomic -----	31
6.4- RT y amplificación en tiempo real RT-qPCR -----	32
6.4.1- Kit QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen -----	32
6.4.2- Kit One-Step qRT-PCR Plex de productos Bio-lógicos -----	34
6.5- Búsqueda y selección de material de referencia -----	36
7- Procesos y resultados -----	37
Procesamiento N°1 -----	37
Procesamiento N°2 -----	41
Procesamiento N°3 -----	48
Procesamiento N°4 -----	50

Procesamiento N°5 -----	51
Procesamiento N°6 -----	54
Procesamiento N°7 -----	59
Procesamiento N°8 -----	63
Procesamiento N°9 -----	67
Procesamiento N°10 -----	71
Procesamiento N°11 -----	73
Procesamiento N°12 -----	76
8- Análisis de resultados -----	80
9- Conclusiones -----	83
10- Fuentes de información y referencias bibliográficas -----	84

## **1. Justificación e importancia del tema**

La infección respiratoria aguda (IRA) producida por VSR es una de las principales causas de hospitalizaciones de lactantes y niños (1) y de una elevada morbilidad y mortalidad entre ancianos y adultos con condiciones debilitantes subyacentes (2). El diagnóstico preciso y rápido disminuye el uso innecesario de antibióticos y pruebas adicionales de laboratorio, el tiempo de hospitalización y la transmisión intrahospitalaria (3, 4). Los estudios de etiología viral son fundamentales para determinar la incidencia en distintos grupos, su cinética de diseminación e identificación de factores de vulnerabilidad en la población (5).

En la actualidad, la inmunofluorescencia (IF) es el método de uso rutinario en la mayoría de los hospitales 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, 288 (38,4%) fueron positivas, mientras que otras 214 (28,5%) fueron positivas por PCR multiplex, para una tasa de positividad total del 66,9% (6). Es importante destacar que la falta de sensibilidad de la técnica de IF es particularmente notable en muestras de adultos.

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 (7) y una mortalidad global mayor a 118.000 infantes cada año con el 99% de las muertes ocurriendo en países en desarrollo (8). 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 citotóxico (9). Actualmente hay muchos desarrollos en marcha en fases preclínicas y clínicas, con cuatro que han alcanzado la fase III, incluyendo vacunas a mRNA y a vector Adenovirus (10) y dos que ya han sido autorizadas para su uso. Si bien las vacunas se destinarán a proteger poblaciones susceptibles a enfermedad severa (niños pequeños y tercera edad), las

pruebas clínicas actuales se enfocan en poblaciones de mayores de 60 años y en estrategias de inmunización de embarazadas para obtener protección en el recién nacido por pasaje de anticuerpos transplacentarios y vía amamantamiento. Como resultado de la eficacia demostrada en pruebas clínicas, la FDA dio su aprobación a la vacuna Abrysvo (Pfizer Inc.) en mayo de 2023 para la prevención de la enfermedad de las vías respiratorias inferiores causadas por el VSR en personas mayores de 60 años y en agosto del mismo año para su uso entre las 32 y 36 semanas de edad gestacional de embarazo. Muy poco después, esta vacuna fue autorizada por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) para su uso en embarazadas y el 1 de enero de 2024 comenzó en Argentina la vacunación contra el VSR con esta vacuna para personas gestantes. El objetivo es proporcionar, a través del pasaje transplacentario de anticuerpos, protección contra la bronquiolitis durante los primeros seis meses de vida. A tal fin, se aplica una dosis de esta vacuna a todas las mujeres embarazadas entre las semanas 32 y 36 de gestación, antes del inicio y durante la temporada de circulación del VSR. Esta nueva estrategia fue incorporada al Calendario Nacional de Vacunación (CNV) con carácter gratuito y obligatorio, mediante la resolución 4218/2023 publicada el 18 de diciembre en el Boletín Oficial. 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 de análisis 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 (solo 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 la detección de VSR en muestras clínicas utilizando reactivos (reactivos de extracción, mezcla de enzimas y buffers) de producción local (PB-L, Argentina) y la comparación de los resultados obtenidos respecto al método utilizado actualmente en el Hospital Mi Pueblo de Varela (IFD).

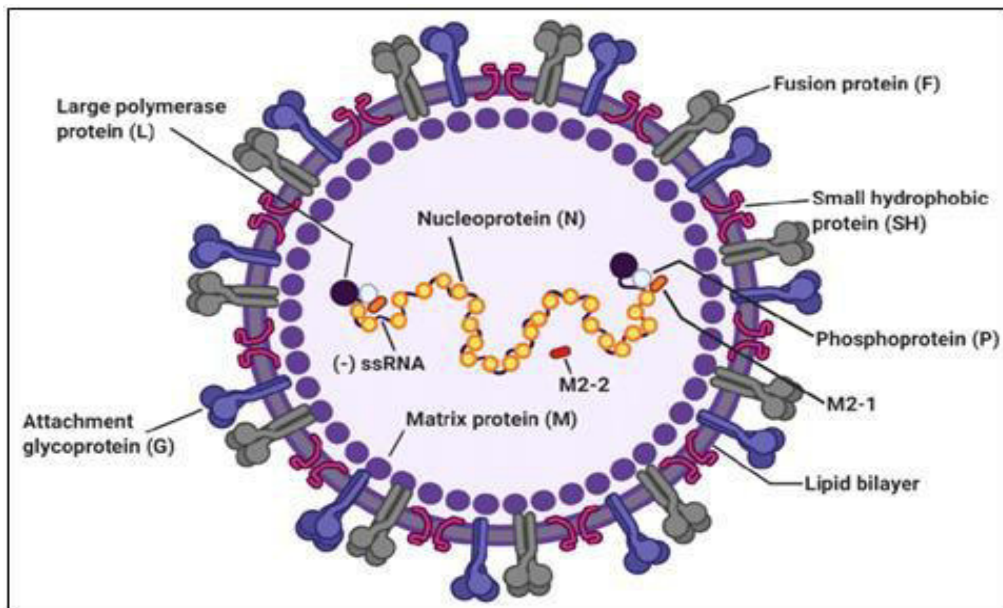
## **2. Virus Respiratorio Sincitial (VSR)**

### **2.1 Presentación clínica y epidemiología**

El virus VSR puede ir desde infecciones leves del tracto respiratorio superior donde el tratamiento es sintomático, hasta presentaciones graves, con afectación del tracto respiratorio inferior (bronquiolitis, bronquitis y neumonía), que requieren hospitalizaciones y asistencia respiratoria mecánica pudiendo generar casos fatales (1). 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 (11). En niños mayores y adultos la infección causa frecuentemente resfrío común suave. En adultos mayores e inmunocomprometidos la infección por VSR da lugar a infecciones bajas y casos severos de una elevada morbilidad y mortalidad (2). Tiene una estacionalidad marcada que comprende desde otoño tardío hasta los primeros días de primavera.

### **2.2 Clasificación y estructura del VSR**

El virus respiratorio humano (nombre clásico), según clasificación ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) 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 V de Baltimore. Rodeando este material genético en toda su extensión se une la nucleoproteína (NP) formando una nucleocápside helicoidal, hacia el exterior del virión se halla la proteína matriz (M) tapizando el interior de una envoltura constituida por una bicapa lipídica (derivada de la membrana plasmática de la célula huésped) donde se insertan las principales proteínas de superficie: glicoproteínas F (de fusión) y glicoproteínas G (de unión), características de este virus. Además, en la envoltura se encuentran también pequeñas proteínas hidrofóbicas no glicosiladas, SH, cuya 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. (1)

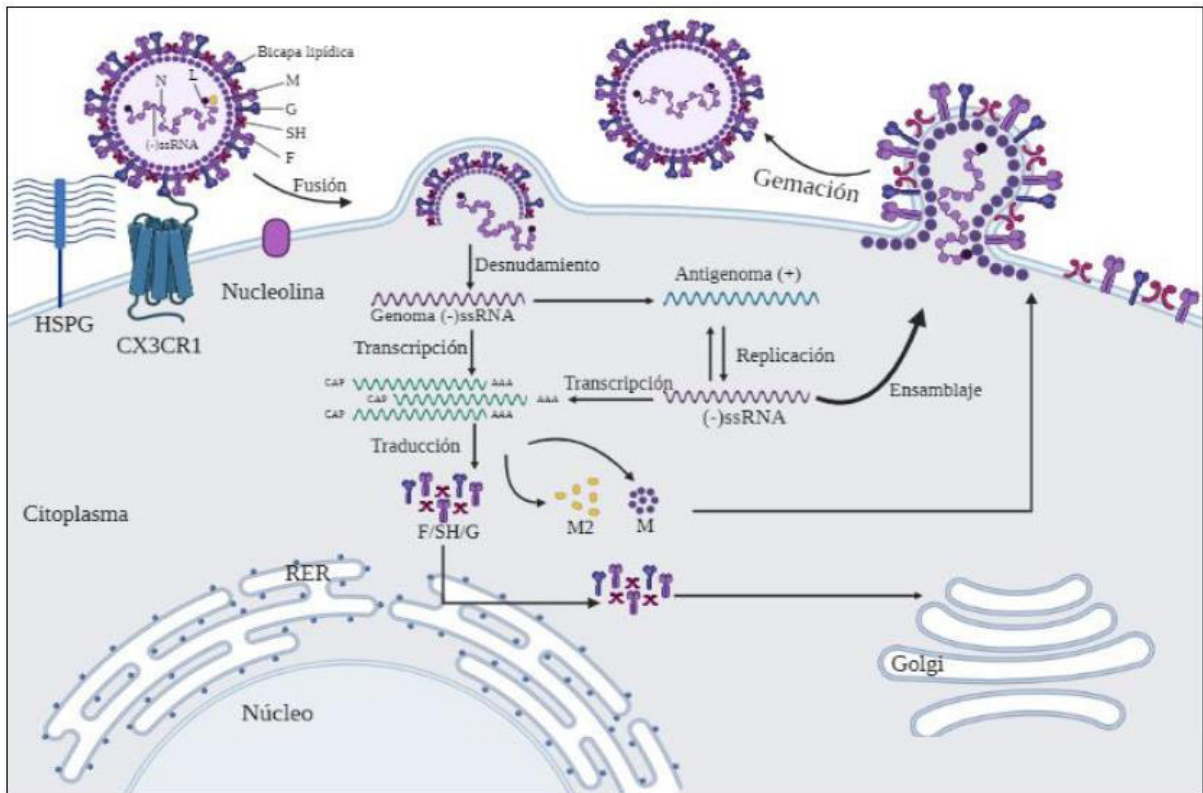


**Figura 1. Estructura del Virus Respiratorio Sincitial (VRS)**

### 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 (3, 12):

**Fusión de la membrana celular con la envoltura viral:** Es el mecanismo más aceptado y eficiente (3, 13) mediada por las proteínas transmembranales de superficie del VSR, las proteínas F y G. La glicoproteína G de unión interacciona con glicosaminoglicanos (GAG) celulares, principalmente proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) y CX3CR1 (receptor de quimioquinas), sufriendo cambios conformacionales que, consecuentemente inducen la reorientación del péptido de fusión en la proteína F permitiendo que comience a insertarse en la membrana de la célula huésped con la consiguiente fusión de las membranas (viral y celular). Posteriormente la infección desemboca en un evento que da lugar a la formación de sincitios por la expresión de estas proteínas en la superficie celular. El receptor putativo para RSV-F es la nucleolina. (Figura 2)

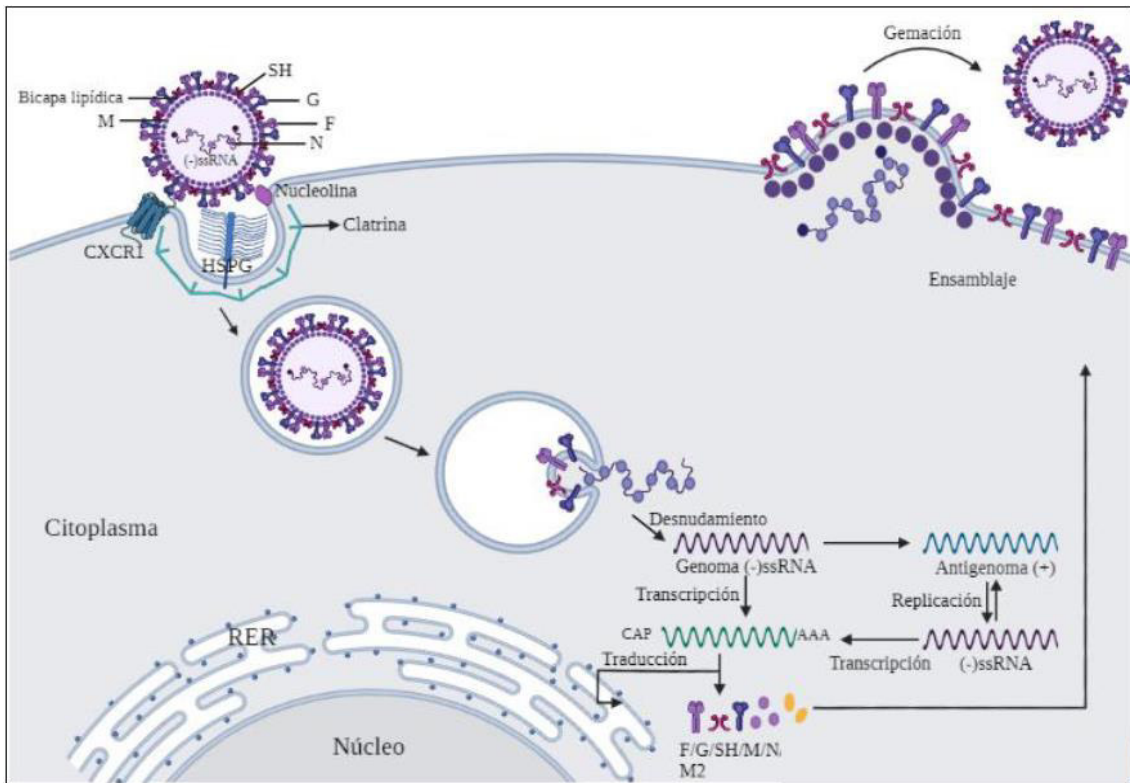


**Figura 2.** Ingreso de VRS por interacción de las glicoproteínas virales con los receptores celulares y posterior fusión de membranas. Imagen diseñada particularmente para este trabajo.

**Endocitosis mediada por clatrina:** Es el 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. (Figura 3)

Luego de la fusión de membranas se produce el desnudamiento o liberación de la nucleocápside en el citoplasma de la célula blanco. Ésta nucleocápside incluye el RNA genómico en una estructura helicoidal cuya proteína principal es la N y también la maquinaria de replicación cuyos componentes principales son la polimerasa L y la fosfoproteína P. A partir de este momento tiene lugar la producción de RNAs mensajeros (mRNAs) y la replicación del genoma en el citoplasma. Estos procesos ocurren de forma sucesiva y coordinada por la síntesis y abundancia relativa de las proteínas de nucleocápside. La cadena de RNA de sentido negativo sirve inicialmente como molde para la síntesis de varios RNAs subgenómicos de polaridad positiva cuya función es de ser mRNAs para la producción de proteínas tanto tempranas como tardías. Posteriormente a la acumulación de las proteínas N, L, P y M2 se produce un *switch* hacia la actividad

replicasa de la polimerasa generándose, a partir del molde negativo copias de genoma completo de polaridad positiva que, a su vez, sirven como molde para para la síntesis de RNA genómico de polaridad negativa. Finalmente se ensambla la partícula viral y se libera por gemación (13).



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

## 2.4 Transmisión

Las principales formas de transmisión del VSR ocurren por contacto directo con una persona infectada y por contacto con superficies y fómites contaminados con partículas relativamente grandes de secreciones respiratorias liberadas por la tos o estornudo de personas cursando infección de VSR. Esto permite la inoculación directa y la autoinoculación en los ojos y nariz por secreciones infecciosas, también ocupa un lugar importante en la transmisión del VSR la vía aérea a partir de aerosoles de partículas más pequeñas (<4  $\mu\text{m}$ ) (1, 14).

## 2.5 Prevención

Para los niños con alto riesgo de enfermedad severa por VSR, existe una terapia preventiva basada en el anticuerpo monoclonal llamado palivizumab. Es una profilaxis que consta de anticuerpos monoclonales humanizados que ayuda al sistema inmune a retrasar o detener la propagación del virus y reduce las hospitalizaciones, se administra durante la temporada de VSR y va dirigido a niños con alto riesgo debido a comorbilidades como displasia broncopulmonar, cardiopatía congénita o prematuros. Se administra una dosis de 15mg/Kg una vez al mes (máximo de 5 dosis) en niños de 0 a 24 meses (15, 16).

En el año 2023 para la prevención de la enfermedad del tracto respiratorio inferior en adultos mayores de 60 años, la FDA aprobó vacunas para el VSR, estas son Arexvy (GSK) y Abrysvo (Pfizer), esta última también autorizada por ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Medica) (17, 18, 19) e incorporada en el calendario nacional a partir de 2024 para ser aplicada en embarazadas, entre las 32 y 36 semanas de gestación (20, 21, 22) como se describe más arriba.

## 2.6 Manejo clínico y tratamiento

El manejo clínico consiste en la profilaxis inmunológica para los casos de infantes de alto riesgo 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 VSR. 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. (2)

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). En julio de 2023, la FDA aprobó Nirsevimab para uso en bebés y niños pequeños vulnerables menores de 2 años de edad. Nirsevimab, un monoclonal de unión a proteína F es fabricado por AstraZeneca y Sanofi y exhibió

eficacias superiores al 70% en la prevención de la enfermedad del tracto respiratorio inferior por VSR en prematuros y lactantes sanos (26).

La terapia de apoyo consiste en la administración de broncodilatadores, antipiréticos, corticoesteroides (para pacientes con EPOC o asma) y suplementos de oxígeno (1).

### **3. Diagnostico**

#### **3.1 Diagnostico 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), y reducir el uso inadecuado de antimicrobianos. En particular, es importante instaurar un diagnóstico preciso para VSR 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 Diagnostico diferencial**

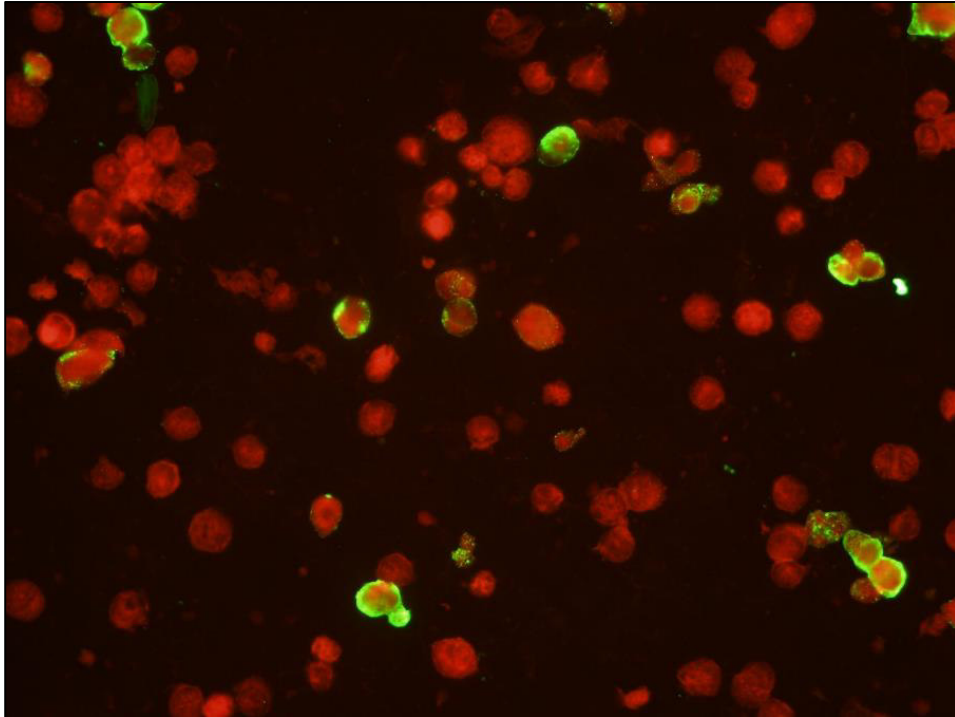
Dado que las presentaciones clínicas de distintos agentes respiratorios son similares, el diagnóstico diferencial requiere del laboratorio para una adecuada identificación del agente viral causal. Existen métodos de diagnóstico virológico directos (se basan en la detección del antígeno) e indirectos (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 comparación entre métodos directos, los realizados como rutina en el laboratorio hospitalario (detección de Ag por IFD y, ocasionalmente LAMP) y las RT-qPCR que optimizamos en este trabajo para la detección específica de VSR.

### 3.3 Métodos de detección

#### 3.3.1 Inmunofluorescencia (IF)

La IF es una técnica muy utilizada en la detección de virus respiratorios. Existe en dos formatos: directo, en el cual el anticuerpo específico contra el antígeno blanco (primer Ac) está conjugado con un fluoróforo e indirecto, en el cual este primer Ac no es conjugado, sino que se une en un segundo paso a un anticuerpo anti-especie conjugado con un fluoróforo (segundo Ac marcado).

Para la realización del presente trabajo se ha llevado a cabo la metodología directa que es la actualmente utilizada en el Hospital Mi Pueblo de Varela. Esta técnica consiste en la inmunomarcación de células epiteliales del tracto respiratorio provenientes del muestreo por hisopado nasofaríngeo distribuidas sobre un portaobjeto. Luego de un proceso de fijación y permeabilización, esta preparación (impronta) es tratada con un anticuerpo monoclonal específico marcado con un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína que es el más común). Se lo incuba 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 fluoresceína 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 (ver figura 4). Cada virus tiene un patrón de tinción típico. Para la infección por VSR consiste en fluorescencia verde citoplasmática punteada y con pequeñas inclusiones como se observa en la figura 4.

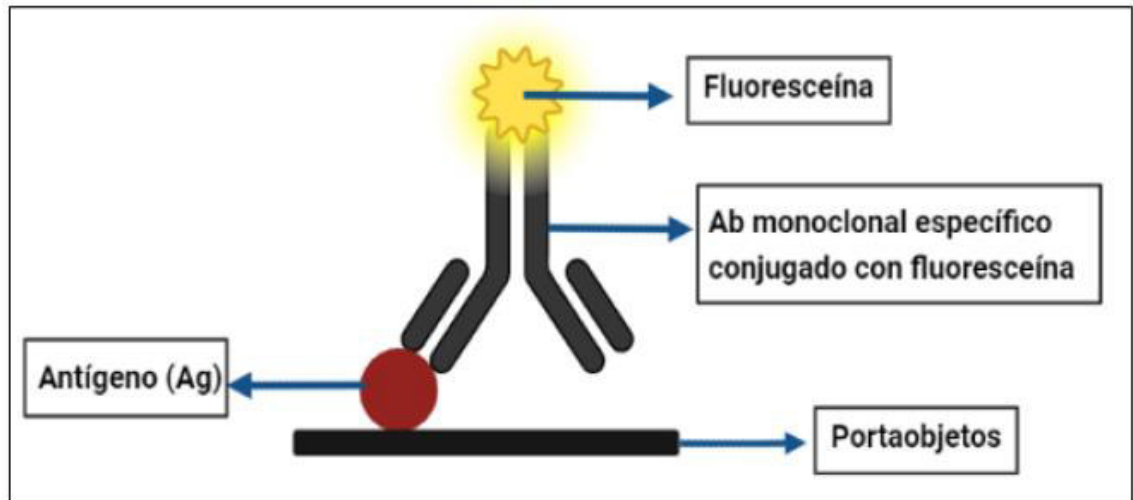


**Figura 4.** Células epiteliales del tracto respiratorio ligadas a un anticuerpo monoclonal específico marcado con un fluorocromo observadas por microscopio de fluorescencia.

Esta metodología requiere de un buen muestreo que permita obtener gran cantidad de células en la impronta y con 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 significativas de células.

En este trabajo, se ha utilizado el kit D<sup>3</sup> Ultra 8<sup>TM</sup> DFA Respiratory Virus Screening & Identification, el cual, como su nombre lo indica, permite la detección e identificación de 8 virus respiratorios (VSR, PIV 1,2,3, hMPV, Flu A, Flu B y adenovirus) a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos. El kit consta de reactivos para la detección por inmunofluorescencia directa (DFA = *Direct Fluorescence Assay*) incluyendo anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos contra cada uno de los virus mencionados marcados con fluoresceína. Por un lado, se incluye un vial con una mezcla de los 8 AcMos marcados y por otro lado viales individuales (DFA) con cada AcMo

marcado individual. Inicialmente, se realiza la detección de virus en la muestra haciendo tamizaje con la mezcla y, en el caso de obtener algún positivo, se procede a la identificación con los monoclonales individuales.



**Figura 5.** Esquema del fundamento IFD diseñado para este

**Desventajas:**

- La necesidad de disponer de un microscopio de fluorescencia y de personal capacitado 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. Otro factor que influye en estos casos es el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopes específicos de un virus. Este hecho implica la posibilidad de que mutaciones en ese epítipo en particular pueda hacer que el AcMo ya no se una eficientemente anulando la detección de los virus mutantes por esta metodología.

**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 un paso de extracción previa del material genético ya que, supuestamente (dado que se trata de tecnología propia del fabricante no revelado 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 de 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 VSR (A y B). Además, tiene moldes (“similares a primers” según el inserto) específicos para amplificar una región del gen NS2 como diana para VSR-A y una región del gen N como diana para VSR-B. La amplificación es detectada mediante “molecular beacons” que consiste 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 amplicón 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 200ul 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 2,5ml 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 VSR e hisopos estériles que funcionan como control negativo. Estos controles permiten la monitorización completa del ensayo.



**Figura 6.** Equipo ID NOW RSV (imagen extraída del inserto del kit)

### **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 (amplificación isotérmica)

### **Desventajas:**

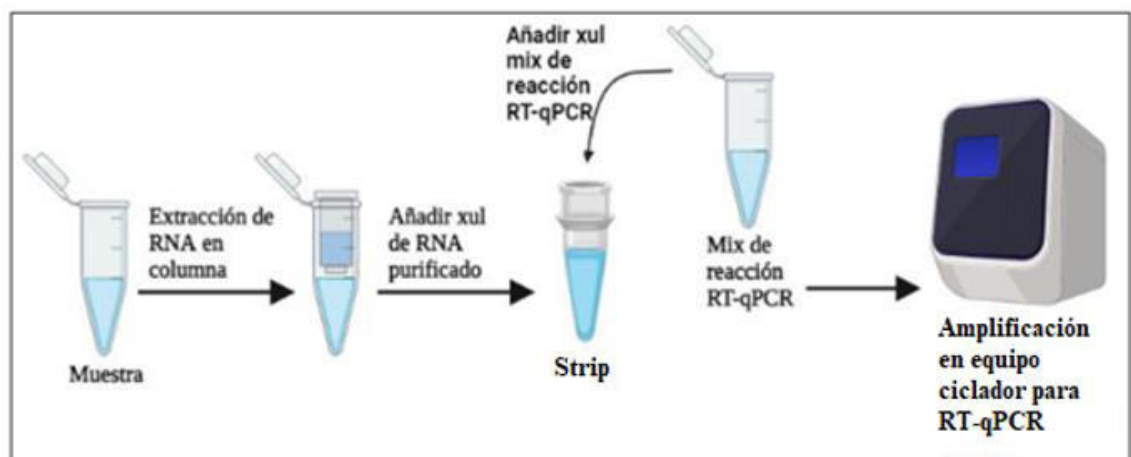
- El rendimiento de la técnica ID NOW RSV depende de la carga viral de RNA
- La posibilidad de obtención de falsos negativos por presencia de mutaciones en la secuencia genética del VSR que no le permite ser detectados o los detecta, pero en forma menos eficaz. El test también puede rendir falsos negativos por muestras mal recogidas, acondicionadas o mal transportadas. Un resultado negativo no garantiza la ausencia de infección por VSR.
- Sensible a reactividad cruzada que puede derivar 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 que permita monitorear la calidad de la muestra.

### 3.3.3 RT-qPCR

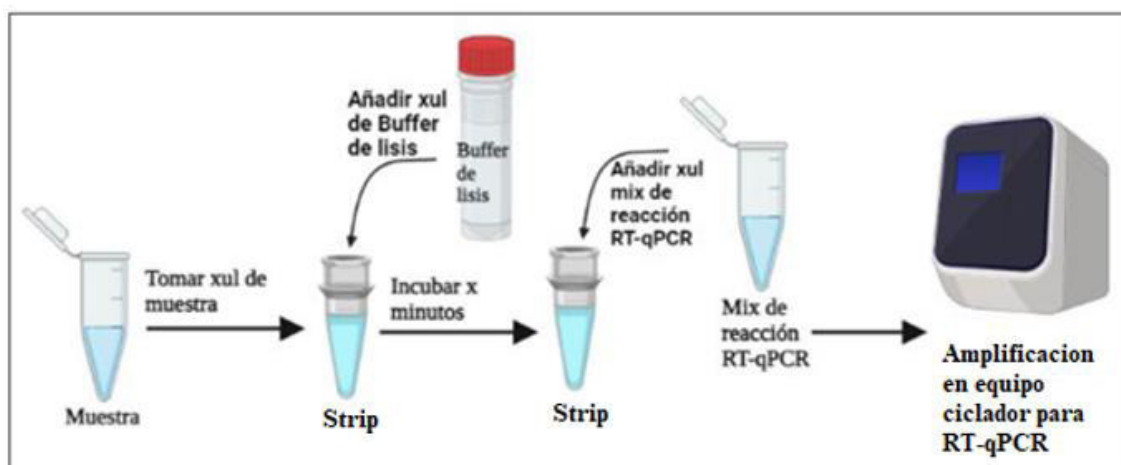
Las técnicas que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa o PCR amplifican un blanco de DNA y cuando el virus a detectar tiene genoma RNA, el mismo debe ser retrotranscrito a DNA (cDNA) como paso previo a la amplificación utilizando una enzima llamada transcriptasa reversa. La PCR en tiempo real (qPCR) con transcripción reversa o retro transcripción previa se denomina RT-qPCR y es una técnica que permite la detección del ARN viral con la posibilidad de cuantificación relativa a *standards*. El analito en este caso es el RNA viral en partículas libres y en células infectadas contenidas en el material clínico de partida (hisopado nasofaríngeo). Por ello se requiere un paso previo de extracción del RNA que puede realizarse de distintas formas:

A. Por método de extracción en columna basado en la técnica de Boom (23) basado en un aislamiento del material genético y una semipurificación basada en la unión de los ácidos nucleicos a una matriz de sílica inmovilizada en columnas plásticas comerciales. Los kits contienen todos los reactivos y elementos para la lisis inicial, las columnas y tubos para la unión y lavados por centrifugación y elución del producto RNA.



**Figura 7.** RT-qPCR con previa extracción en columna del RNA. (imagen diseñada para este 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 8.** RT-qPCR con buffer de lisis (imagen diseñada para este 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 y complementándose el volumen con agua destilada libre de RNAsas para un volumen final de 20 ul en cada reacción individual. 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 20ul por tubo de reacción, lo cual finalmente se lleva al equipo termociclador en tiempo real previamente configurado (Para este trabajo se hizo uso del 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 continua con un paso de inactivación de la RT y activación de la Taq Pol en la mix. Esto se logra elevando la temperatura a 95°C unos 5-15 minutos. Luego de este paso el programa incluye alrededor 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 simultaneo 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 de VSR 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. 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  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.
2. Realizar la producción de extractos de RNA a partir de las muestras almacenadas utilizando el método de purificación de RNA/DNA suministrado por Productos Bio-Lógicos (PB-L).
3. Optimizar la reacción de detección de VSR utilizando la mix y reactivos para RT-qPCR de Productos Bio-Lógicos (PB-L).
4. Realizar las RT-qPCR sobre al menos 67 muestras para obtener los correspondientes resultados a comparar: 20 positivas para VSR y 47 negativas o positivas para otros agentes respiratorios.
5. En base a los resultados obtenidos en “4” obtener los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del método PB-L tomando los métodos de IFD y LAMP del Hospital Mi Pueblo como referencia.

## 5. Materiales y métodos

**Muestras:** Se cuenta para este estudio con muestras de hisopados nasofaríngeos tomadas en el transcurso del año 2023 en el Hospital Mi Pueblo (HMP) de Florencio Varela y almacenadas a -20°C. Las muestras para analizar en este estudio se seleccionaron por los resultados obtenidos con las técnicas de rutina utilizadas en el laboratorio del HMP. Se coleccionaron un total de 20 muestras positivas para VSR y otras 47 muestras negativas y positivas para otros agentes respiratorios para realizar la comparación.

<b>Muestras RSV Positivo</b>	
<b>N° de Muestra</b>	<b>N° de Extracto</b>
R00148	23
R00149	27
R00150	24
R00151	25
R00152	26
R00157	28
R00273	44
R00272	45
R00269	47
R00266	46
R00264	48
R00261	49
R00155	38
R00154	39
R00156	40
R00194	41
R00195	42
R00196	43
R00257	60
R00254	61

<b>Muestras RSV Negativo</b>			
N° de Muestra	N° de Extracto	N° de Muestra	N° de Extracto
R00295	62	R00276	103
R00296	63	R00275	104
R00297	64	R00274	105
R00298	65	R00271	106
R00299	66	R00270	107
R00300	67	R00265	108
R00290	68	R00228	111
R00292	69	R00246	110
R00293	70	R00263	115
R00294	71	R00302	112
R00336	99	R00360	113
R00329	98	R00364	114
R00328	97	R00371	116
R00327	96	R00377	117
R00325	95	R00380	118
R00324	94	R00381	119
R00320	93	R00389	120
R00318	92	R00402	121
R00314	91	R00658	122
R00262	90	R00659	123
R00288	100	R00660	124
R00287	101	R00661	125
R00284	102	R00662	126
R00259	109		

**Controles:** Se utilizará una muestra con Ct muy bajo a la cual se le realizó una dilución 1/10 y se repartió en alícuotas que fueron congeladas a -20°C para ser utilizadas como control positivo Ad-hoc. El control negativo diario consiste en agua destilada grado molecular (18 Mohms, filtrada y autoclavada dos veces (ddH2O)). También se utiliza un control endógeno para evaluar celularidad que consiste en la detección de la RNAsa-P en cada muestra. Adicionalmente se utilizará un control interno para evaluar potencial inhibitorio de la muestra sobre los procesos enzimáticos de detección tomado de un kit importado, el QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen. Este control interno provisto en el kit consiste en la introducción de un RNA (de ahí que en este trabajo lo denominemos

control “exógeno”) y el juego de primers y probe para su detección. Estos componentes vienen como una premezcla del RNA (sintético y por lo tanto inexistente en la naturaleza) primers y sonda marcada con fluoróforo Cy5 que se agrega en una cantidad estipulada y permite monitorear la posible inhibición de RT-qPCR.

**Procesamiento de la muestra:** Se trabajará con RNA extraído como material de partida. El RNA será extraído a partir de 200ul de muestra utilizando un método de matriz de sílica en formato de columna del kit nacional PURO Genomic DNA/RNA, (PB-L <http://www.pb-l.com.ar>) .

**Transcripción reversa (RT) y amplificación (PCR) en tiempo real:** Se utilizarán kits que integran ambas reacciones en un único paso (técnicas One-step), principalmente se usará el kit nacional One-Step qRT-PCR Plex de PB-L para la comparación con la IFD. Parte de las muestras fueron también procesadas con el kit importado QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen. Ambos kits fueron diseñados para realizar la RT y las PCR subsiguiente en forma directa y en un solo tubo y permiten el multiplexado, es decir la detección de más de un blanco en cada tubo de reacción. Los métodos se utilizan con el juego de primers y sondas originalmente descritas por Fry y colaboradores (24) que hacen blanco en la zona del gen M (ver figura 9). La reacción y detección del virus se realizará con un equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories) utilizando el canal FAM para el VSR, el de HEX para el control endógeno y el Cy5 para el control interno en el caso de Qiagen y para el control endógeno de PB-L (RNAsa-P). Los resultados se analizarán con el Software Maestro (CFX Maestro Software, BioRad Laboratories).



**Figura 9. A) Secuencia genética RSV. B) Amplicon. 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 AAAAAAGACGA TGACCCTGCA TCACTTACAA  
3361 TATGGGTGCC CATGTTCAA TCATCTATGC CAGCAGATTT ACTTATAAAA GAACTAGCTA  
3421 ATGTCAACAT ACTAGTGAAA CAAATATCCA CACCCAAGGG ACCTTACTA AGAGTCATGA  
3481 TAAACTCAAG AAGTGCAGTG CTAGCACAAA TGCCCAGCAA ATTTACCATA TGCGCTAATG

PRIMERS

PROBE

**Figura 10.** 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 Colección de muestras**

Se coleccionó un total de 20 muestras positivas para VSR y otras 47 muestras negativas y positivas para otros agentes respiratorios para realizar la comparación.

### **6.2 Preparación de primers y probe**

Los primers se resuspendieron en buffer TE (Tris EDTA) estéril y autoclavado y las probes siguiendo las indicaciones del inserto del fabricante que se corresponde a Eurofins Genomic, Louisville, KY para la preparación de soluciones madres.

Las soluciones de primers fueron llevadas a 24uM y la probe a 6uM, estas son las concentraciones de trabajo utilizadas por Mancini (25) para preparar la mix, del cual vamos a adaptar en nuestro equipo.

Para resuspender los primers reverse y el forward liofilizado, el protocolo indicado por el fabricante, pide añadir 4561ul de buffer TE (Tris EDTA) estéril, para obtener una solución madre de 100uM de concentración, como ese volumen supera los 2000ul del tubo, se procede a agregar 912,2ul para tener una solución madre más concentrada, a 500uM, posteriormente se homogeneizo bien.

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

$$4561\text{ul} \times 100\text{uM} = V_f \times 500\text{uM}$$

$$\text{Por despeje de } V_f \text{ se obtiene: } V_f = 912,2\text{ul}$$

De esta solución madre se realizó una dilución para llevarla a 24uM. Vamos a preparar un volumen de 100ul.

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

$$V_i \times 500\text{uM} = 100\text{ul} \times 24\text{uM}$$

$$\text{Por despeje de } V_i \text{ se obtiene: } V_i = 4,8\text{ul}$$

### **6.3 Extracción de material genético**

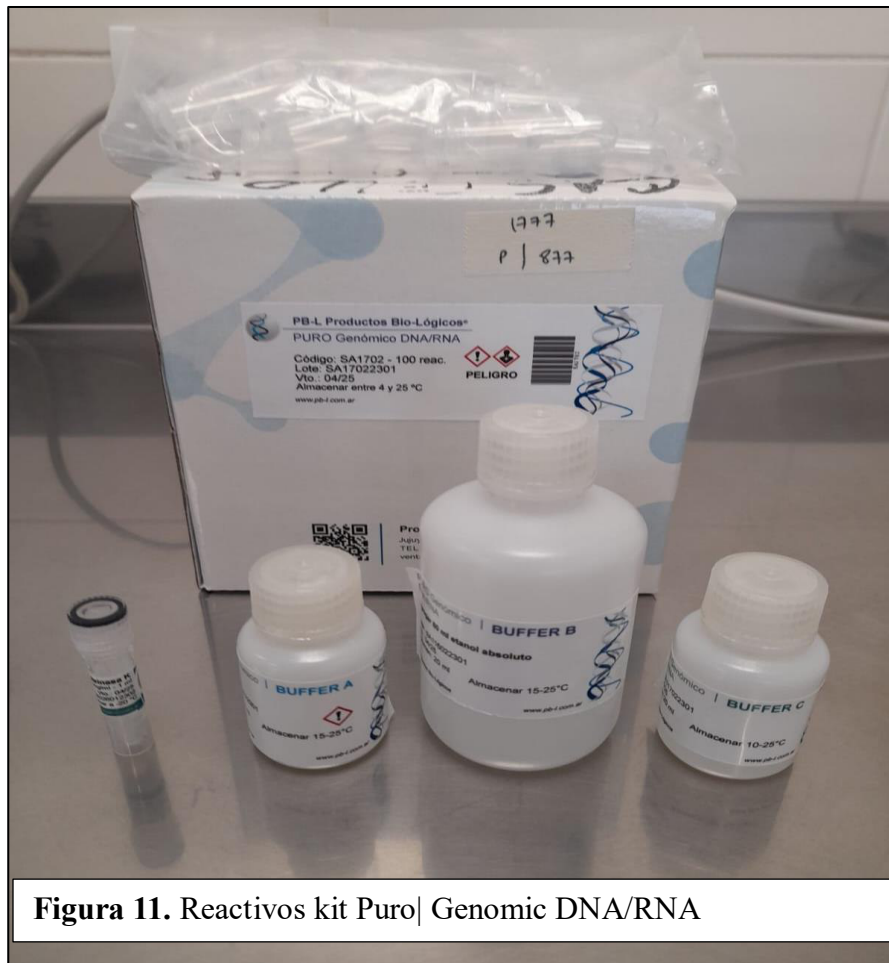
Se realizó extracción en columna para las muestras de los virus en estudio y se empleó el kit de PURO| Genomic DNA/RNA distribuido por Productos Bio-Lógicos (PB-L <http://www.pb-l.com.ar>).

Este kit es un método rápido y sencillo basado en columnas para aislar el material genético viral. El procedimiento consiste en un paso de lisis, seguidos de un paso de enriquecimiento del material genético mediante un Carrier, el cual se une a la membrana

de sílica durante los lavados y por último el RNA es eluido de la columna listo para su uso en aplicaciones posteriores.

#### 6.3.1 Protocolo del PURO| Genomic DNA/RNA

1. Agregar 200ul de la muestra al tubo de microcentrifuga.
2. Agregar 20ul de Proteinasa K (20mg/ml), mezclar con vortex.
3. Agregar 200ul de Buffer A + Carrier ARN/ddH<sub>2</sub>O libre de RNAsas a la muestra, mezclar bien con vortex e incubar a 60°C durante 15min para obtener una solución homogénea. Centrifugar brevemente 5 segundos el tubo de microcentrifuga de 1,5ml para eliminar las gotas del interior de la tapa.
4. Agregar 200ul de etanol (96-100%) a la muestra y mezclar bien con vortex durante 15seg.
5. Depositar la mezcla del paso 4 en la columna con la membrana de sílica (armada con el tubo de recolección de 2ml) incluyendo el precipitado que pueda haberse formado, y centrifugar a 12,000 rpm durante 30seg, luego desechar el eluato y colocar la columna en el tubo de recolección.
6. Agregar 500ul de Buffer B (preparado con el volumen apropiado de etanol 96-100%) a la columna, y centrifugar a 12,000 rpm durante 30seg, luego desechar el eluato y colocar la columna en el tubo de recolección.
7. Centrifugar a 12,000 rpm por 2min para secar completamente la membrana.
8. Colocar la columna de centrifugación en un nuevo tubo de microcentrifuga de 1,5ml limpio y agregar 50-200ul de Buffer C o ddH<sub>2</sub>O libre de RNAsas directamente en el centro de la membrana. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) durante 2-5min, y luego centrifugar durante 2 min a 12,000 rpm.



**Figura 11.** Reactivos kit Puro| Genomic DNA/RNA

#### 6.4 RT y amplificación en tiempo real RT-qPCR

##### 6.4.1 Kit QIAprep&amp; Viral RNA UM de Qiagen

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

- ❖ Viral RNA Master Mix
- ❖ Human Sampling IC Assay (Control endógeno)
- ❖ RNA IC Template Assay (Control exógeno)
- ❖ Viral RNA UM Prep Buffer (Buffer de lisis)

Protocolo para el kit QIAprep&amp; Viral RNA UM de Qiagen

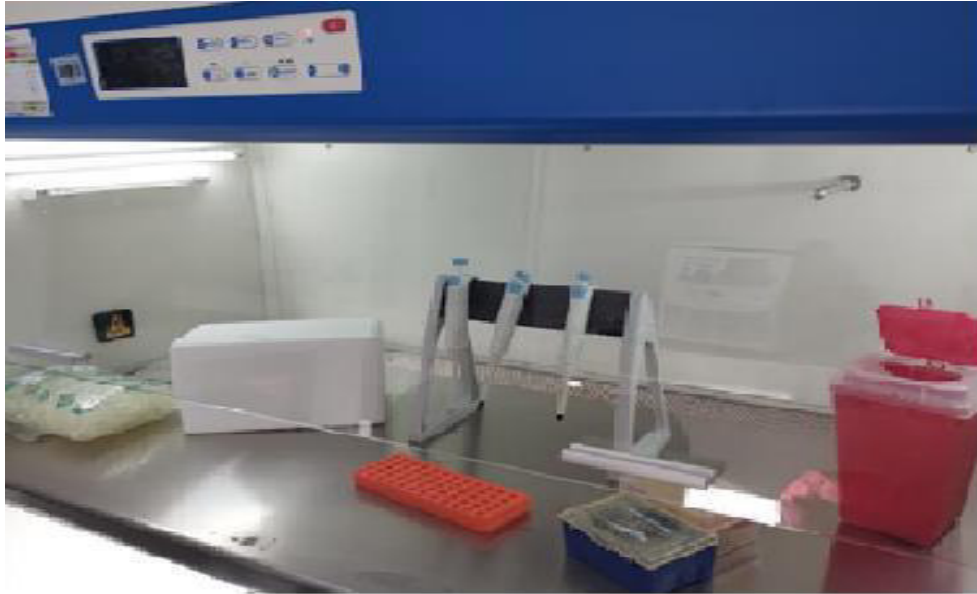
1. Se descongelan gradualmente los reactivos del kit (Viral RNA master mix, Human Sampling IC, RNA IC Template y Viral RNA UM Prep Buffer), los

primers y probe. Una vez descongelados se vortexean y centrifugan para homogeneizar los reactivos.

2. Se preparo la mix de reacción bajo flujo laminar (Tabla 1), para evitar contaminación tanto de los reactivos como de la mix (Figura 12). La mix se prepara para la cantidad de muestras analizadas por día, más una para tener un volumen extra, y así evitar posibles pérdidas de volumen (por error de pipeteo o formación de burbujas, por ejemplo.)
3. Se descongelan y vortexean las muestras para homogeneizar el contenido, y se realiza una breve centrifugación para que todo el volumen quede en el fondo del tubo.
4. Bajo flujo laminar se añaden 3ul del extracto de RNA a un tubo del strip más el agregado de ddH<sub>2</sub>O libre de RNAsas necesario para completar el volumen de trabajo.
5. Por último, se añade el volumen de mix de reacción calculado previamente en la tabla 1 a cada tubo del strip, se cierra herméticamente, se centrifugo con el fin de recolectar las gotas que hayan quedado en la pared o tapa del tubo y la eliminación de burbujas en caso de que se hayan formado. Finalmente se lleva al equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Figura 13) para el ciclado y detección.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen original (ul)</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Fluoróforo</b>
Mix UM	5	1x	
RSV F (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RSV R (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RSV P (6 uM)	0,23	0,07 uM	FAM
Control Endógeno del kit	1	1x	HEX
Control Exógeno del kit	2	1x	Cy5
Vol mix	9,07		
AD	1,93		
	Molde: 3 ul muestra ARN		
Vol total	20		

**Tabla 1.** Premix Qiagen



**Figura 12.** Preparación de la mix en flujo laminar.



**Figura 13.** Equipo CFX96 Touch Real Time PCR Detection System.

#### 6.4.2 Kit One-Step qRT-PCR Plex de Productos Bio-Lógicos (PB-L)

El kit de PBL es nacional y está diseñado para realizar la síntesis de cDNA y la reacción de Real-time cuantitativa basada en la detección de fluorescencia emitida por hidrolisis de la sonda específica, mediada por la actividad exonucleolítica 5'-3' de la enzima Taq polimerasa, en un solo paso. Esta mix contiene todos los componentes necesarios para una reacción de transcripción reversa a partir de ARN purificado, seguido de una PCR en tiempo real. La mezcla enzimática contiene una enzima transcriptasa reversa optimizada (mayor termoestabilidad y actividad RNasa H-) y una Taq ADN polimerasa Hot Start (con actividad exo 5'-3') con dos sistemas hot-start que eliminan la

formación de dímeros de primers y permiten la utilización de un formato de reacción multiplex con varios juegos de primers y probes. La mezcla contiene dNTPs/dUTPs para eliminar contaminantes de arrastre de amplicones por preincubación con UDG (no incluida en el kit).

El kit cuenta con los siguientes reactivos:

- ❖ One-Step qRT-PCR Plex Probe Master Mix 2x
- ❖ Mix de enzimas 25x
- ❖ DTT 10mM (10x)

Protocolo para el kit de PBL

El protocolo para el kit es muy similar al de Qiagen con la excepción de la mix de reacción, aunque estén al mismo volumen final (20ul).

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (ul)</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Fluoróforo</b>
Master Mix 2x	10	1x	
Mix enzimas 25x	0,8	1x	
DTT 1 mM	1,6	1x	
RSV F (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RSV R (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RSV P (6 uM)	0,23	0,07 uM	FAM
RNAsaP F 24 uM (C. endógeno)	0,2	0,19 uM	
RNAsaP R 24 uM R (C. endógeno)	0,2	0,19 uM	
RNAsaP P 6 uM P (C. endógeno)	0,1	0,024	Cy5
AD	3		
Molde: RNA extracto	3 ul RNA		
Vol total	20		

**Tabla 2.** Premix PB-L

**El perfil de ciclado es común para ambos protocolos:**

<b>Etapa</b>	<b>Temp. (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Nro. ciclos</b>	<b>Paso</b>	<b>Recolección de señal</b>
Síntesis de cDNA	50	10´	1	Actividad de la RT	No
Desnaturalización inicial	95	2´	1	Descomposición de la RT	No
Amplificación por PCR	95	5”	40 ciclos	Desnaturalización	No
	58	30”		Hibridación y extensión	Si

**Tabla 3.** Perfil de ciclado común a ambos protocolos

### 6.5 Búsqueda y selección de material de referencia (Control Positivo)

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 6 muestras positivas para RSV analizadas por LAMP o IFD. Entre las 6 muestras se buscó aquellas con Ct bajo lo que indicaba una buena cantidad de virus. Se seleccionó la muestra R00152 positiva para RSV determinada por RT-qPCR cuyo Ct obtenido fue 24,50. A partir de esta muestra, se realizó una dilución 1/10 y se alicuotó en 20 tubos eppendorf que fueron almacenados a -20°C para utilizar en cada corrida como controles positivos con valor de Ct conocido (~28).

## 7. Procesos y resultados

Procesamiento N°1: Inicialmente se procesaron varias muestras en paralelo con los reactivos de Qiagen y PB-L intentando una comparación directa entre estas dos marcas de reactivos de RT-qPCR, una nacional y otra importada de gran calidad. Se procesaron seis muestras recientemente tomadas en el Hospital Mi Pueblo en las cuales se detectó RSV con el sistema Abbot (ID NOW™ RSV Test Kit, amplificación isotérmica). Como control positivo se usó una muestra previamente procesada y como control negativo AD.

En esta primera prueba los programas de amplificación al usar los reactivos de Qiagen o PB-L eran distintos ya que se respetaron las sugerencias generales de cada fabricante. Por esta razón se trabajó en dos turnos manteniendo las muestras en heladera entre los mismos. En este caso se procesó primero por Qiagen con el protocolo monoplex puesto a punto por Melisa Herasimiuk (TFB, UNAJ, mayo del 2023). Para lograr un material de partida comparable, en esta primera prueba se trabajó con el producto de lisis obtenido con el buffer lisis (BL) de Qiagen para ambas reacciones, no con extractos de RNA. Sin embargo, es de hacer notar que, debido al volumen que queda disponible usando la mix de PB-L, solo fue posible usar 8,5 ul de muestra/BL en la reacción con este kit mientras que con la mix de Qiagen se usan 10 ul. Por esta razón la cantidad neta de muestra es algo mayor en las reacciones importado con respecto al nacional (8 ul vs 6,8 ul, ver tablas 4 y 5). Por otro lado, y por la misma razón de no exceder el volumen máximo, tampoco se utilizó control endógeno con PB-L, el cual, de cualquier forma, se incluye en la reacción de Qiagen por lo que la muestra está controlada.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (ul)</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Fluoróforo</b>
Mix UM	5	1x	
RSV F (20 uM)	0,9	0,9 uM	
RSV R (20 uM)	0,9	0,9 uM	
RSV P (10 uM)	0,2	0,2 uM	FAM
Control Endógeno del kit	1	1x	HEX
Control Exógeno del kit	2	1x	Cy5
Molde: 8 ul muestra + 2 ul buffer extracción	10		
Vol. total	20		

**Tabla 4.** Premix Qiagen

Reactivo	Volumen (ul)	Concentración final	Fluoróforo
Máster Mix 2x	12,5	1x	
Mix enzimas 25x	1	1x	
DTT 1mM	2	1x	
RSV F (20 uM)	0,4	0,32 uM	
RSV R (20 uM)	0,4	0,32 uM	
RSV P (6 uM)	0,25	0,1 uM	FAM
Molde: 6,8 ul muestra + 1,7 ul buffer extracción	8,5		
Vol. total	25		

**Tabla 5.** Premix PB-L

Perfil OneStep VSR Qiagen		
Temp.	Tiempo	
50	10 min	
95	2 min	
95	5 seg	40 ciclos
58	30 seg	

Perfil OneStep VSR PB-L		
Temp.	Tiempo	
48	10 min	
95	5 min	
95	15 seg	45 ciclos
55	1 min	

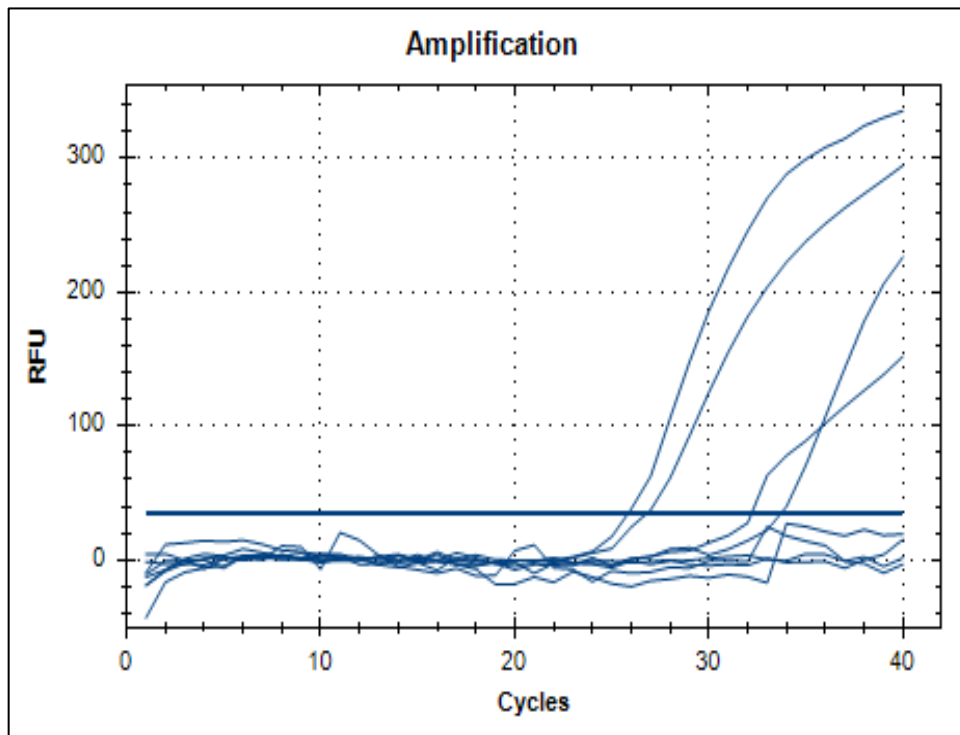
## Resultados

Resultados con reactivo PB-L (Sin control endógeno)

Well	Fluor	Sample	Cq	Resultado
A07	FAM	M0001	>40	Negativo
B07	FAM	23	>40	Negativo
C07	FAM	27	33,65	Positivo
D07	FAM	24	>40	Negativo
E07	FAM	25	26,72	Positivo

F07	FAM	26	25,79	Positivo
G07	FAM	28	32,17	Positivo
H07	FAM	Neg. Ctrl.	--	Negativo

**Tabla 6.** Resultados PB-L

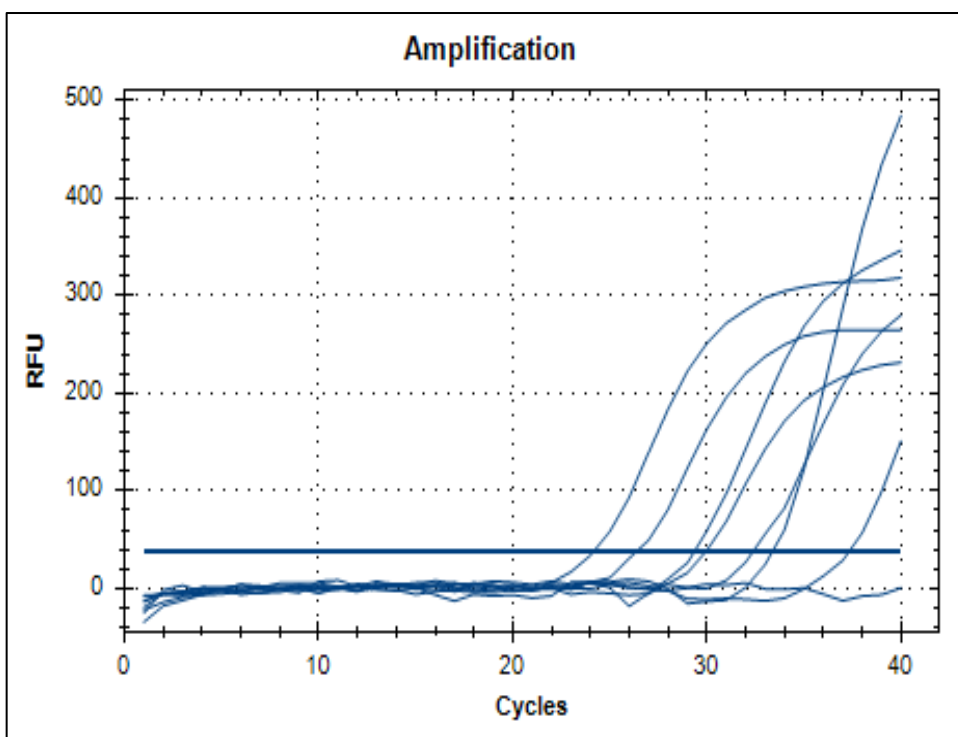


**Figura 14.** Curvas de fluorescencia (FAM) obtenidas por el análisis de 6 muestras positivas para VSR y una adicional positiva como control (M001 proveniente de una muestra positiva previamente analizada en el trabajo de Melisa) utilizando el kit de PB-L.

Resultados con reactivo Qiagen

Well	Fluor	Sample	Cq	Resultado
A07	Cy5	M0001	Inhibida	Inhibida
A07	FAM	M0001	29,31	Positivo
A07	HEX	M0001	31,22	
B07	Cy5	23	33,91	
B07	FAM	23	33,34	Positivo
B07	HEX	23	24,48	
C07	Cy5	27	34,79	
C07	FAM	27	32,33	Positivo
C07	HEX	27	27,18	
D07	Cy5	24	38,93	
D07	FAM	24	37,28	Positivo
D07	HEX	24	22,97	
E07	Cy5	25	34,63	
E07	FAM	25	24,11	Positivo
E07	HEX	25	26,04	
F07	Cy5	26	34,18	
F07	FAM	26	26,31	Positivo
F07	HEX	26	27,97	
G07	Cy5	28	38,75	
G07	FAM	28	29,89	Positivo
G07	HEX	28	22,42	
H07	Cy5	AGUA	32,13	
H07	FAM	AGUA		
H07	HEX	AGUA		

**Tabla 7.** Resultados Qiagen



**Figura 15.** Curvas de fluorescencia (FAM) obtenidas por el análisis de 7 muestras positivas para VSR por el kit de Qiagen

Fluor	Sample	Cq Qiagen	Cq PB-L
FAM	M0001	29,31	-*
FAM	23	33,34	-
FAM	27	32,33	33,65
FAM	24	37,28	-
FAM	25	24,11	26,72
FAM	26	26,31	25,79
FAM	28	29,89	32,17

**Tabla 7 bis.** Comparación de los Cq específicos de detección de RSV obtenidos por los dos kits. \*Notar que la muestra M001 presentó inhibición.

Procesamiento N°2: En esta ocasión se probó utilizando como molde 4 ul de RNA extraído por el método de columna (Puro genomic DNA/RNA, PBL). Dado que este volumen es menor con respecto al procedimiento N° 1 queda más volumen disponible por lo que la muestra se agrega en cantidades iguales para ambos kits y se incluye un

control endógeno (RNAsa P) en el protocolo de PBL. También se aumentó la concentración de primers de VSR de 0,32 a 0,48 uM.

<b>Protocolo OneStep VSR PB-L</b>		
Temp.	Tiempo	
45	30 min	
94	5 min	
94	15 seg	40 ciclos
55	15 seg	
72	10 seg	
<b>Tabla 8.</b> Protocolo utilizado para el procesamiento N°2		

Reactivo	Volumen (ul)	Concentración final	Fluoróforo
Master Mix 2x	12,5	1x	
Mix enzimas 25x	1	1x	
DTT 1 mM	2	1x	
RSV F (24 uM)	0,5	0,48 uM	
RSV R (24 uM)	0,5	0,48 uM	
RSV P (6 uM)	0,25	0,06 uM	FAM
RNAsaP F 24 uM (C. endógeno)	0,2	0,19 uM	
RNAsaP R 24 uM (C. endógeno)	0,2	0,19 uM	
RNAsaP P 6 uM (C. endógeno)	0,1	0,024 uM	Cy5
AD	3,75		
Molde: RNA extracto	4		
Vol. Total	25		

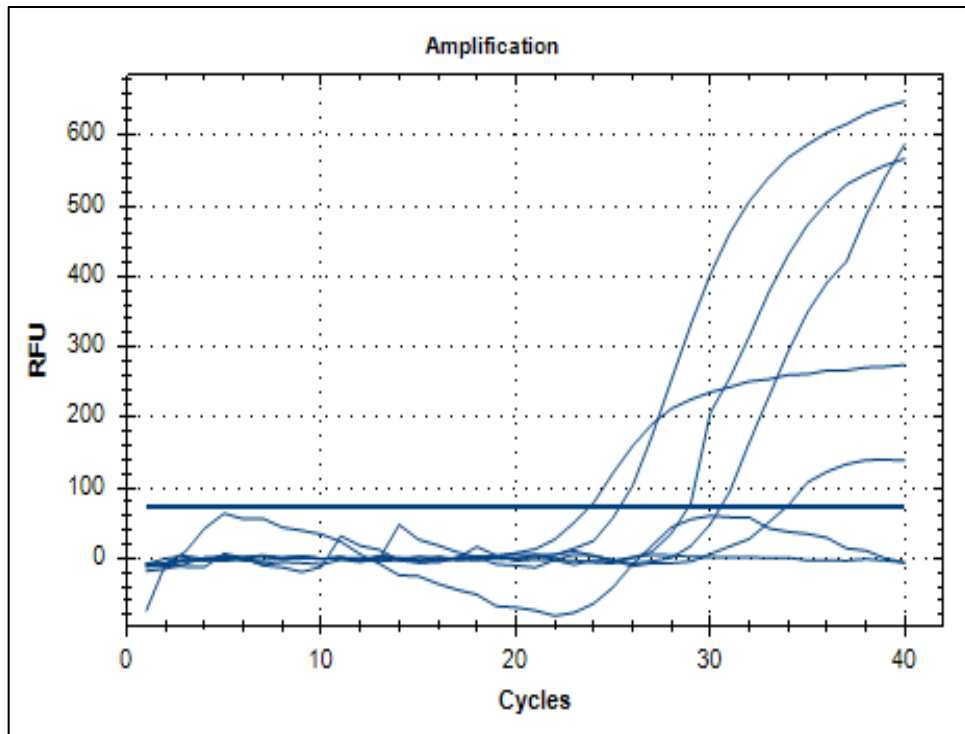
**Tabla 9.** Premix PB-L para el procesamiento N°2

#### Resultados

#### Resultados con reactivo PB-L:

Well	Fluor	Content	Sample	Cq
A07	FAM	Extracto	23	28,84
B07	FAM	Extracto	27	30,49
C07	FAM	Extracto	24	33,84
D07	FAM	Extracto	25	N/A
E07	FAM	Extracto	26	25,3
F07	FAM	Extracto	28	23,72
G07	FAM	Control Negativo	Agua	N/A

**Tabla 10.** Resultados PB-L (FAM)



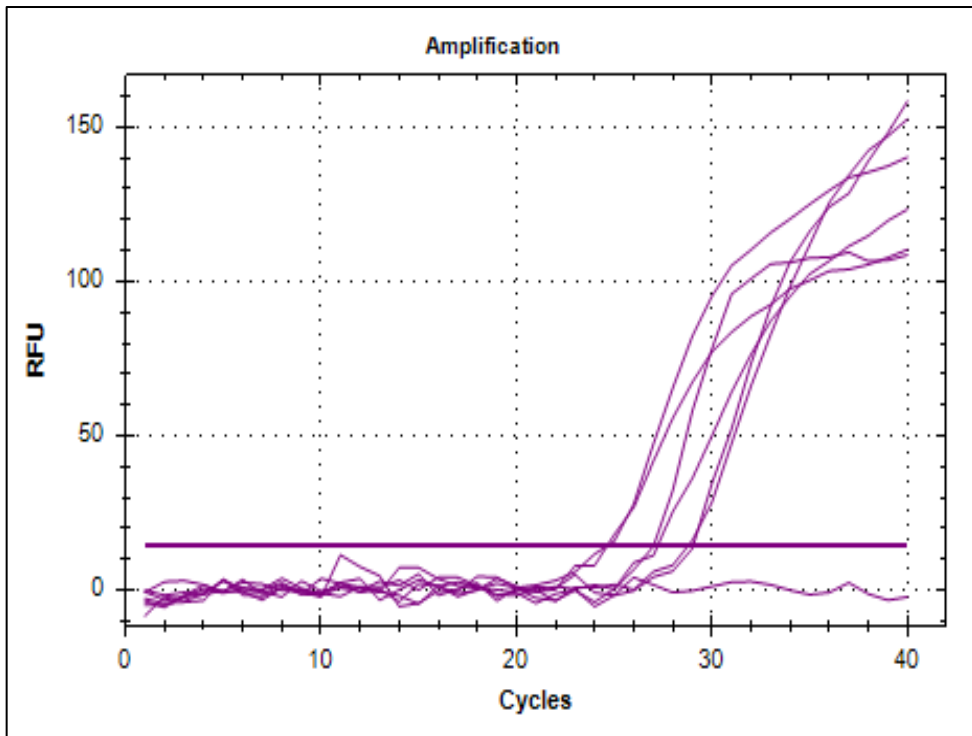
**Figura 16.** Curvas de fluorescencia (FAM) obtenidas por el kit de PB-L

En esta corrida todas las muestras dan positivo incluso las dos que no daban con el buffer de lisis (23 y 24 del procesamiento N°1). La muestra 25 da una curva que asciende y desciende y cuando se procesó con buffer de lisis daba positiva con PB-L y Qiagen, por lo que suponemos que hubo algún problema en el proceso de extracción.

Por otro lado, el control endógeno funcionó bien para todas las muestras incluso la 25:

Well	Fluor	Content	Sample	Cq
A07	Cy5	Extracto	23	26,98
B07	Cy5	Extracto	27	29,02
C07	Cy5	Extracto	24	24,57
D07	Cy5	Extracto	25	27,20
E07	Cy5	Extracto	26	28,73
F07	Cy5	Extracto	28	24,60
G07	Cy5	Control Negativo	Agua	N/A

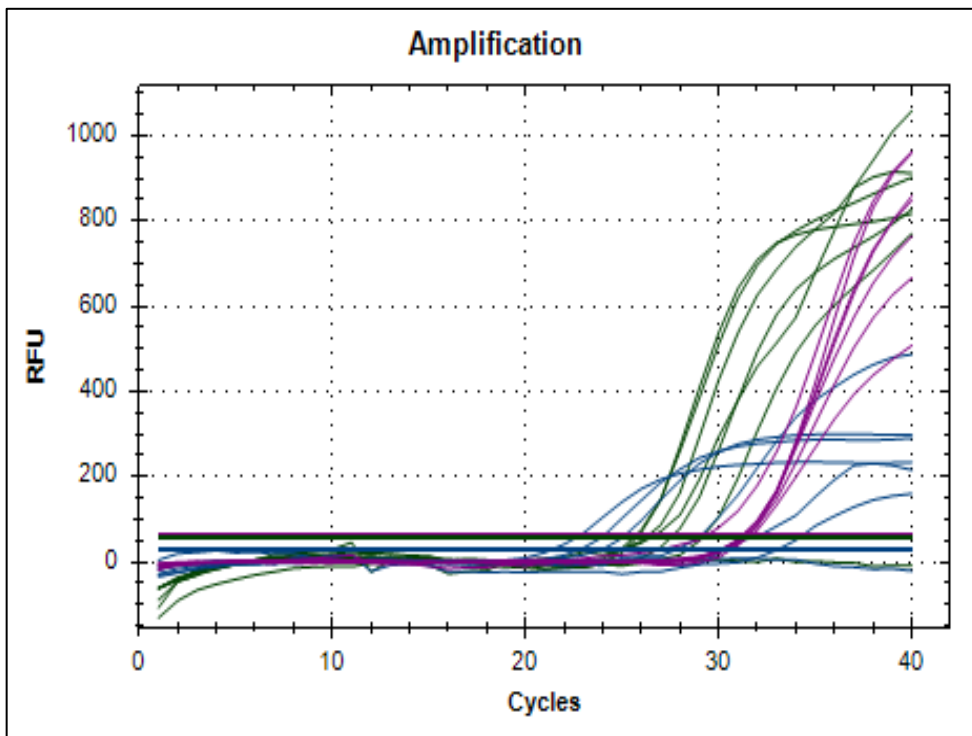
**Tabla 11.** Resultados PB-L (Cy5)



**Figura 17.** Curvas de fluorescencia (Cy5) obtenidas por el kit de PB-L

Resultados con reactivo de Qiagen:

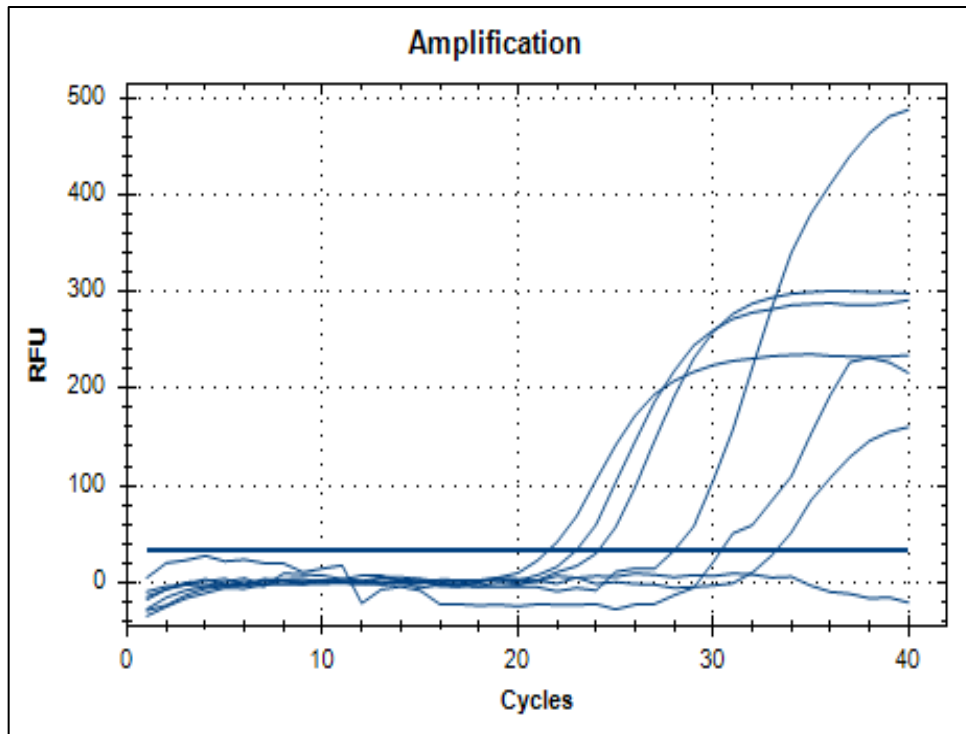
Para el reactivo de Qiagen la distribución de fluoróforos se da de la siguiente forma: C. exógeno (Cy5) / Virus (FAM) / C. endógeno (HEX)



**Figura 18.** Curvas de fluorescencia obtenidas por el kit de Qiagen

Well	Fluor	Content	Sample	Cq
A07	Cy5	Extracto	27	29,43
A07	FAM	Extracto	27	30,37
A07	HEX	Extracto	27	26,35
B07	Cy5	Extracto	23	31,57
B07	FAM	Extracto	23	27,94
B07	HEX	Extracto	23	26,14
C07	Cy5	Extracto	24	31,72
C07	FAM	Extracto	24	33,16
C07	HEX	Extracto	24	25,67
D07	Cy5	Extracto	25	31,27
D07	FAM	Extracto	25	22,91
D07	HEX	Extracto	25	27,45
E07	Cy5	Extracto	26	31,33
E07	FAM	Extracto	26	24,07
E07	HEX	Extracto	26	29,08
F07	Cy5	Extracto	28	31,48
F07	FAM	Extracto	28	21,49
F07	HEX	Extracto	28	25,51
G07	Cy5	Control negativo	Agua	31,39
G07	FAM	Control negativo	Agua	
G07	HEX	Control negativo	Agua	

**Tabla 12.** Resultados Qiagen



**Figura 19.** Curvas de fluorescencia (FAM) obtenidas por el kit de Qiagen

Sample	Cq Qiagen	Cq PB-L
28	21,49	23,72
25	22,91	N/A
26	24,07	25,30
23	27,94	28,84
27	30,37	30,49
24	33,16	33,84
Agua	N/A	N/A

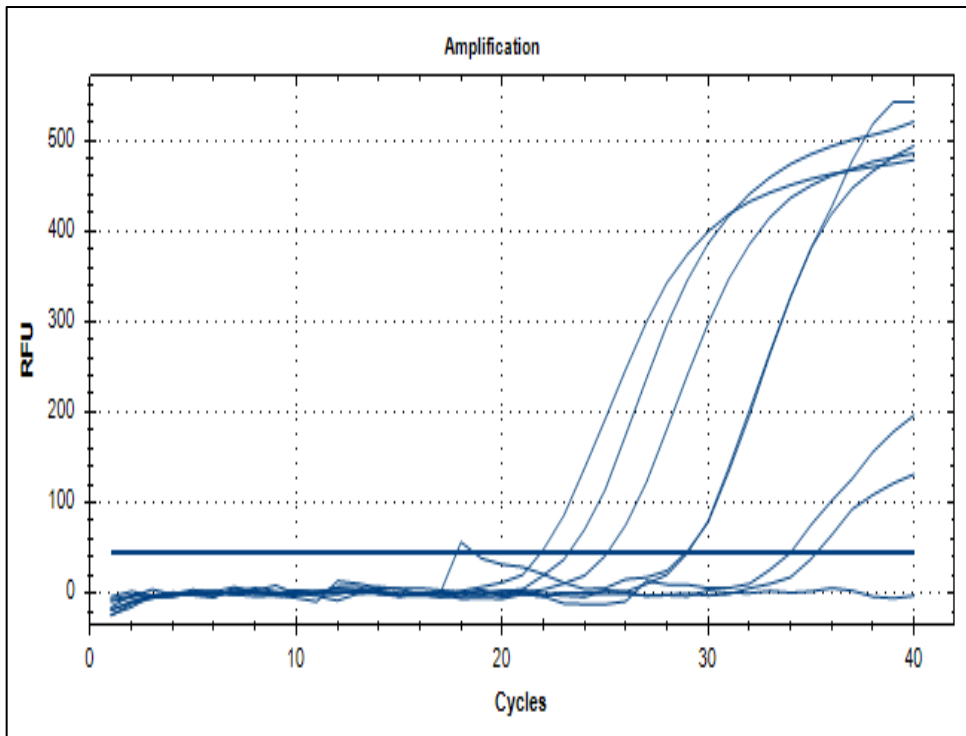
**Tabla 13.** Comparación de los Cq con los dos kits

Conclusiones procesamiento 2: Los resultados que se obtuvieron fueron comparables a excepción de la muestra 25 que al parecer hubo un algún error en la corrida (mala extracción del material genético, burbujas en el strip) ya que es una muestra que ya había sido positiva con el buffer de lisis. Debido al buen desempeño que demostró el kit de PB-L utilizando la extracción por columna de las muestras se procedió a realizar la extracción de todas las muestras por este procedimiento para continuar con el trabajo final.

Procesamiento N°3: En esta ocasión se probó de mejorar los resultados que se pueden obtener mediante el uso del kit PB-L modificando dos parámetros en la mix de reacción: i) se agregaron 10 segundos en el paso de extensión de cadena y ii) se aumentó ligeramente la concentración de probe de VSR de 0,06 a 0,072 uM. Por otro lado, se preparó un control positivo a ser utilizado en todos los procesos desde aquí en adelante diluyendo y preservando alícuotas en freezer de una muestra con valor de Cq bajo (muestra R00152). En este proceso se corren las mismas muestras que en los ensayos anteriores para tener una idea comparativa.

Well	Fluor	Content	Sample	Cq
A07	FAM	Extracto	23	33,93
B07	FAM	Extracto	27	28,85
C07	FAM	Extracto	24	35,21
D07	FAM	Extracto	25	23,19
E07	FAM	Extracto	26	25,07
F07	FAM	Extracto	28	21,83
G07	FAM	Control Positivo		28,96
H07	FAM	Control Negativo		

**Tabla 14.** Resultados PB-L (FAM)



**Figura 20.** Curvas de fluorescencia (FAM) obtenidas por el kit de PB-L

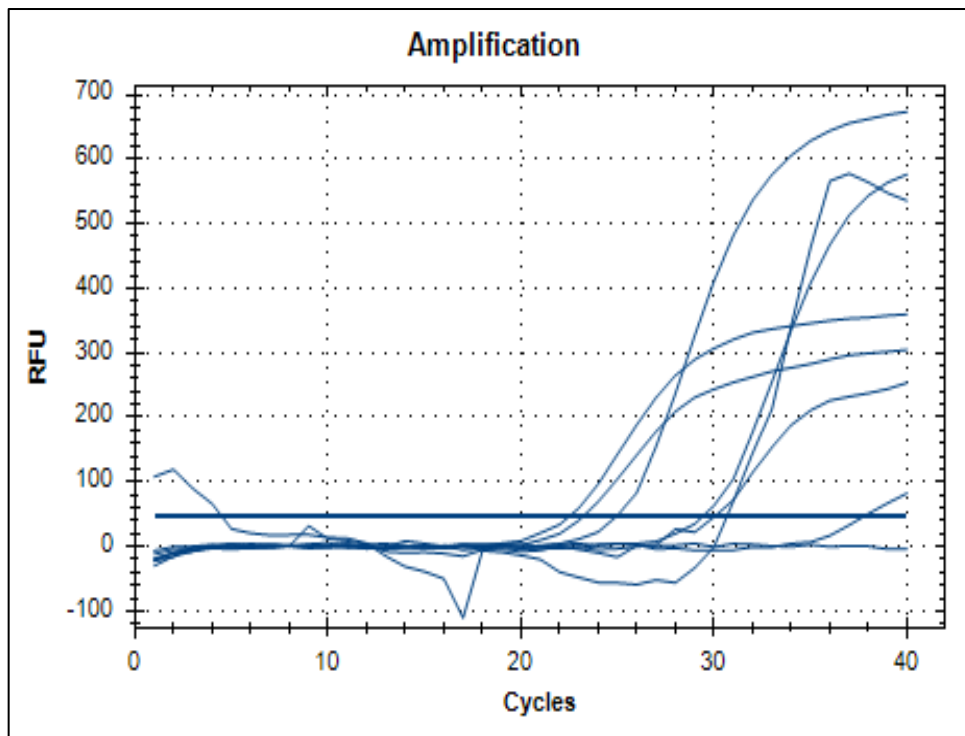
Conclusiones procesamiento 3: Los Cts se modificaron muy poco pero las sigmoideas son mucho mejores incluyendo la muestra 25 que en esta ocasión dio una sigmoidea perfecta. No se observaron diferencias importantes con respecto a los resultados de los ensayos anteriores.

Procesamiento N°4: En este proceso se cambió el perfil de ciclado combinando las temperaturas de annealing y extensión es una sola. En este caso usamos 55°C por un minuto para el annealing/extensión en lugar de las dos temperaturas 55°C por 15” y 75° por 20” (las dos temperaturas son sugeridas por PB-L como la técnica más conservadora). El perfil de ciclado con la temperatura única es el que usa Fry en su técnica original y es similar a la mayoría de los protocolos que se usan en otros kits incluyendo el de Qiagen que usamos como referencia.

<b>Protocolo OneStep VSR PB-L</b>		
Temp.	Tiempo	
45	30 min	
94	5 min	
94	15 seg	40 ciclos
55	1 min	
<b>Tabla 15.</b> Protocolo utilizado para el procesamiento N°4		

Resultados

Well	Fluor	Content	Sample	Cq
A07	FAM	Extracto	23	30,64
B07	FAM	Extracto	27	29,98
C07	FAM	Extracto	24	37,66
D07	FAM	Extracto	25	23,15
E07	FAM	Extracto	26	24,88
F07	FAM	Extracto	28	22,43
G07	FAM	Control Positivo		29,36
H07	FAM	Control Negativo		
<b>Tabla 16.</b> Resultados PB-L (FAM)				



**Figura 21.** Curvas de fluorescencia (FAM) obtenidas por el kit de PB-L

Conclusiones procesamiento 4: Se utilizaron nuevamente las mismas seis muestras y no se observaron diferencias significativas por el cambio de perfil.

Procesamiento N°5: se probó nuevamente el kit de PB-L y Qiagen en paralelo pero ahora fue posible hacerlo con el mismo perfil de ciclado (el cual se mantiene para el resto de los ensayos) con tres muestras y el control positivo. Además, para que ambos kits trabajaran en un mismo volumen final se sube el de Qiagen de 20 a 25 ul para lo cual multiplicamos los volúmenes de los reactivos por 1,25 manteniendo la cantidad de molde para ambos protocolos (4 ul de RNA) y compensando con agua destilada. De esta forma llegamos a un protocolo adecuado para procesar simultáneamente con ambos kits.

Protocolos y perfil de ciclado utilizado para el procesamiento N°5 y los subsiguientes ensayos

<b>Perfil OneStep VSR</b>		
Temp.	Tiempo	
50	10 min	
95	2 min	

95	5 seg	40 ciclos
58	30 seg	

Reactivo	Volumen original (ul)	Volumen modificado (ul)	Concentración final	Fluoróforo
Mix UM	5	6,25	1x	
RSV F (20 uM)	1	1,25	1 uM	
RSV R (20 uM)	1	1,25	1 uM	
RSV P (10 uM)	0,2	0,25	0,1 uM	FAM
Control endógeno del kit	1	1,25	1x	HEX
Control exógeno del kit	2	2,50	1x	Cy5
Vol. mix	10	12,75		
Molde	4 ul muestra + 6 ul AD	4 ul muestra + 8,25 ul AD		
Vol. total	20	25		

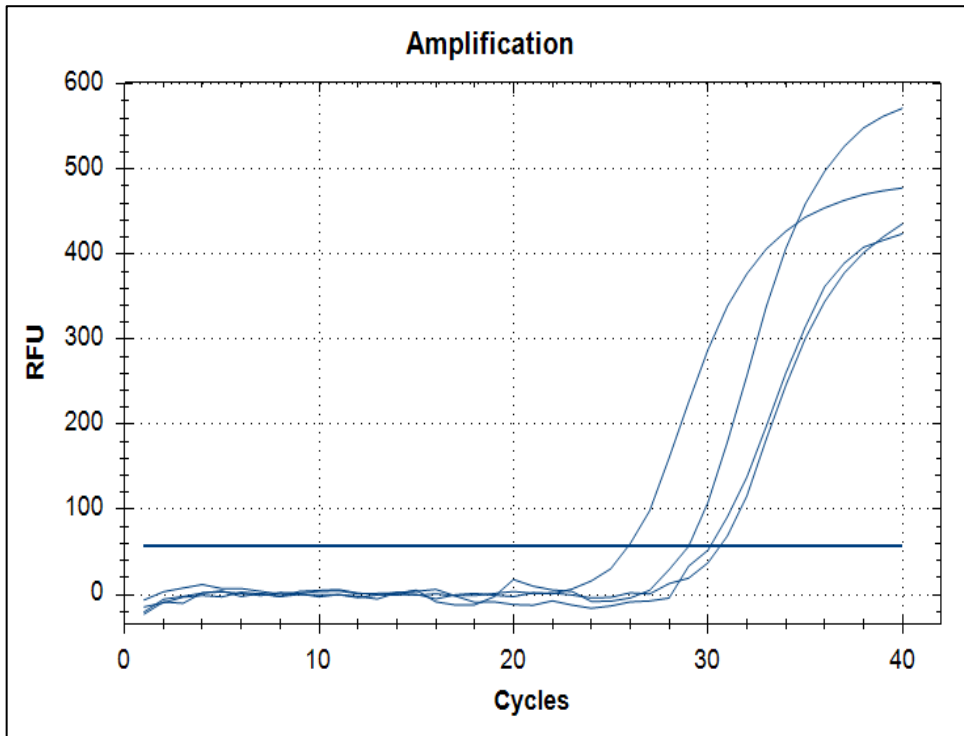
**Tabla 17.** Premix Qiagen modificado para el ensayo

Se procesaron tres muestras y un control positivo para poder comparar todo en el mismo strip, cargando el mismo molde con los reactivos del kit de PBL y Qiagen.

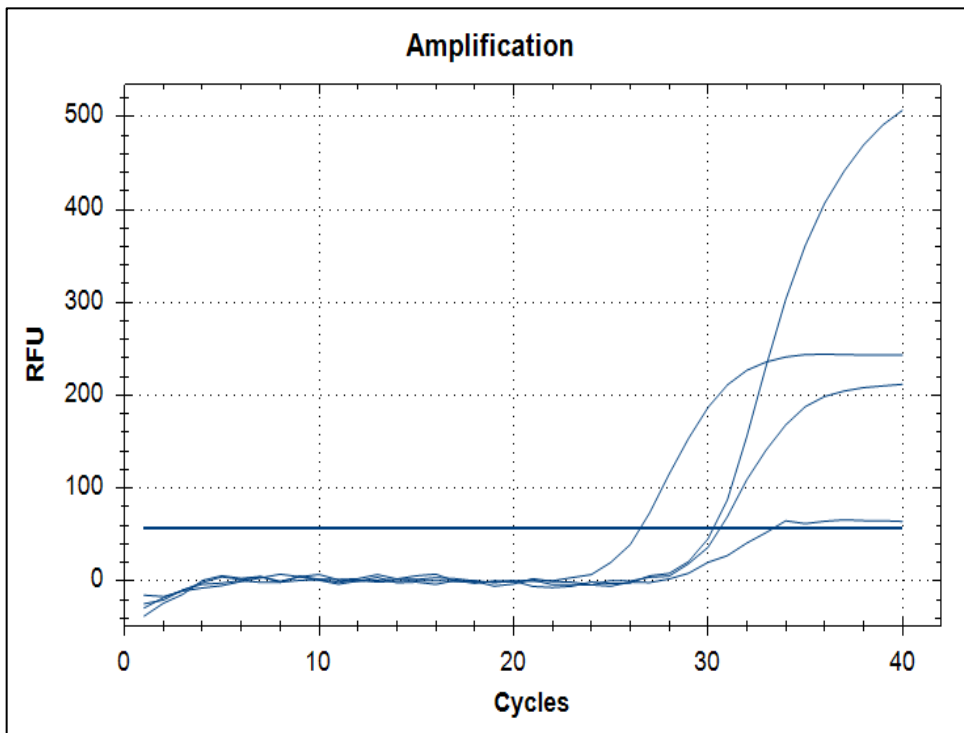
Resultados:

Well	Fluor	Content	Sample	Cq
A07	FAM	Extracto + PB-L	23	29,00
B07	FAM	Extracto + PB-L	27	30,11
C07	FAM	Extracto + PB-L	26	25,88
D07	FAM	Control Positivo + PB-L		30,61
E07	FAM	Extracto + Qiagen	23	30,61
F07	FAM	Extracto + Qiagen	27	33,32
G07	FAM	Extracto + Qiagen	26	26,50
H07	FAM	Control Positivo + Qiagen		30,26

**Tabla 18.** Resultados (FAM) PB-L celdas A, B, C y D, y Qiagen celdas E, F, G y H



**Figura 22.** Curva de fluorescencia (FAM) obtenidas por el kit de PB-L



**Figura 23.** Curva de fluorescencia (FAM) obtenidas por el kit de Qiagen

Conclusiones procesamiento 5: En este ensayo los Cts de Qiagen dieron ligeramente más altos y los máximos de fluorescencia más bajos que los de PB-L.

Procesamiento N°6: para descartar que los Cts más altos obtenidos en el ensayo anterior por parte del reactivo de Qiagen sean por utilizar un volumen final diferente al original se realizó una reacción con 20 ul final con ambos reactivos, además de concentraciones finales de primers y probe iguales (0,5 uM y 0,07 uM final) que son similares a las usadas por Fry Et. al.

Se mantiene el perfil de ciclado del procesamiento N°5.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (ul)</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Fluoróforo</b>
Mix UM	5	1x	
RSV F (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RSV R (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RSV P (6 uM)	0,23	0,07 uM	FAM
Control Endógeno del kit	1	1x	HEX
Control Exógeno del kit	2	1x	Cy5
Molde: 3 ul muestra + 7,93 ul AD	10,93		
Vol. total	20		

**Tabla 19.** Premix Qiagen

Reactivo	Volumen (ul)	Concentración final	Fluoróforo
Master Mix 2x	12,5	1x	
Mix enzimas 25x	1	1x	
DTT 1 mM	2	1x	
RSV F (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RSV R (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RSV P (6 uM)	0,23	0,07 uM	FAM
RNAsaP F 24 uM (C. endógeno)	0,2	0,19 uM	
RNAsaP R 24 uM (C. endógeno)	0,2	0,19 uM	
RNAsaP P 6 uM (C. endógeno)	0,1	0,024 uM	Cy5
AD	0		
Molde: RNA extracto	3		
Vol. Total	20		

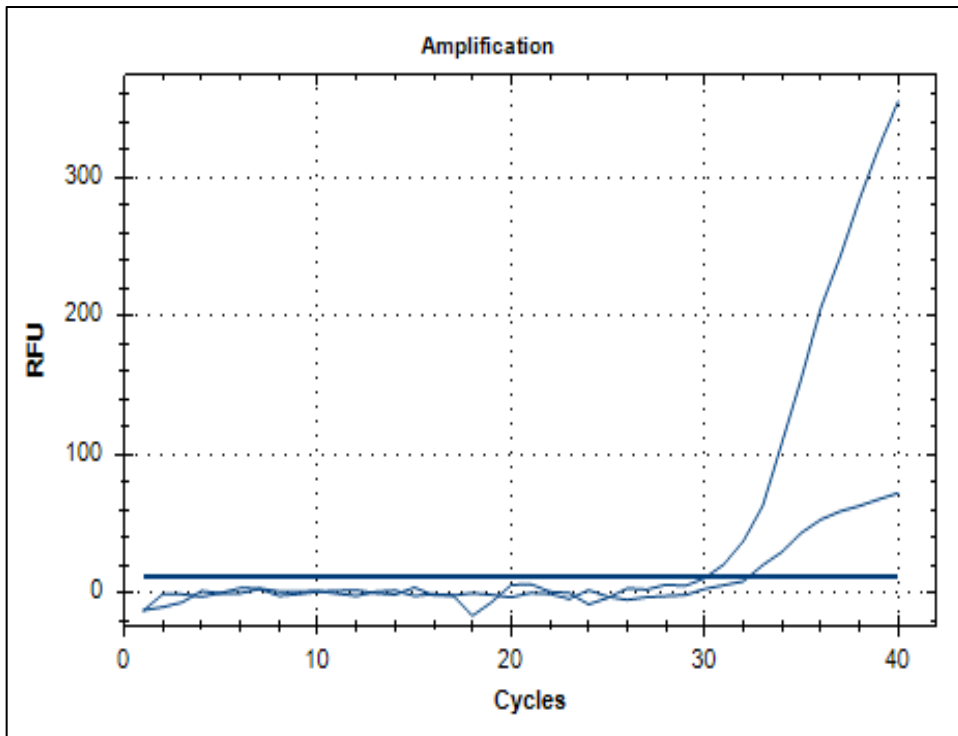
**Tabla 20.** Premix PB-L

## Resultados

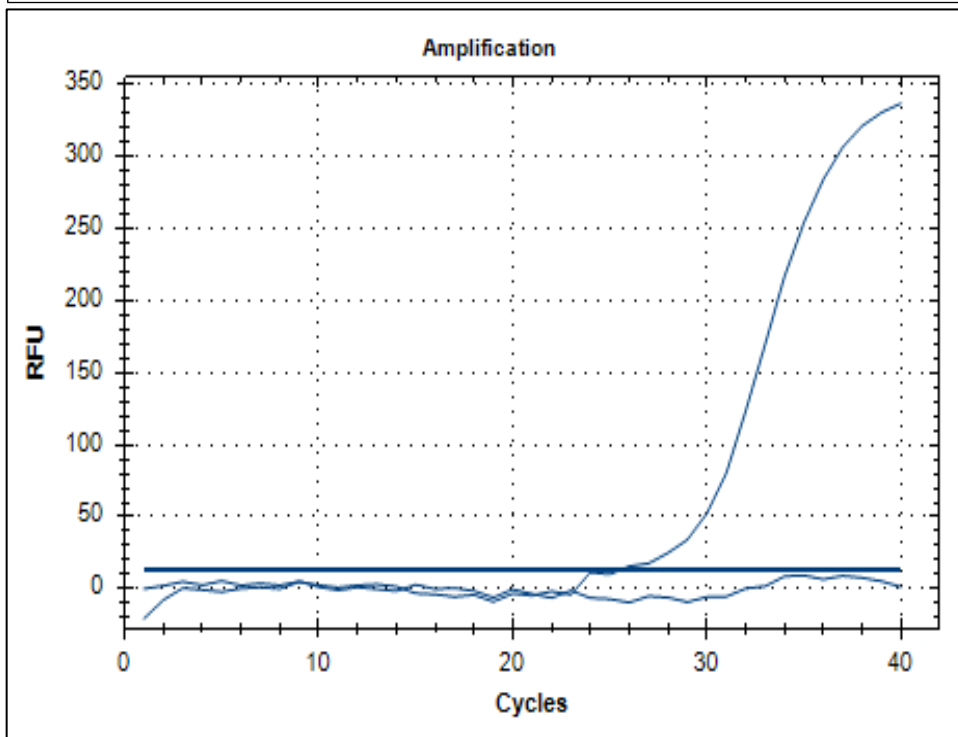
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A07	Cy5	Control endógeno	Extracto	23 PB-L	32,40
A07	FAM	RSV	Extracto	23 PB-L	30,13
B07	Cy5	Control endógeno	Extracto	27 PB-L	31,46
B07	FAM	RSV	Extracto	27 PB-L	25,41
C07	Cy5	Control endógeno	Extracto	26 PB-L	30,08
C07	FAM	RSV	Extracto	26 PB-L	24,09
D07	Cy5	Control endógeno	Control Positivo		34,51
D07	FAM	RSV	Control Positivo		28,31

E07	Cy5	Control exógeno	Extracto	23 Qiagen	32,03
E07	FAM	RSV	Extracto	23 Qiagen	32,30
E07	HEX	Control endógeno	Extracto	23 Qiagen	27,96
F07	Cy5	Control exógeno	Extracto	27 Qiagen	31,60
F07	FAM	RSV	Extracto	27 Qiagen	
F07	HEX	Control endógeno	Extracto	27 Qiagen	28,95
G07	Cy5	Control exógeno	Extracto	26 Qiagen	30,32
G07	FAM	RSV	Extracto	26 Qiagen	25,53
G07	HEX	Control endógeno	Extracto	26 Qiagen	29,74
H07	Cy5	Control exógeno	Control Positivo		31,06
H07	FAM	RSV	Control Positivo		32,19
H07	HEX	Control endógeno	Control Positivo		34,34
<b>Tabla 21.</b> Resultados PB-L celdas A, B, C y D, y Qiagen celdas E, F, G y H					

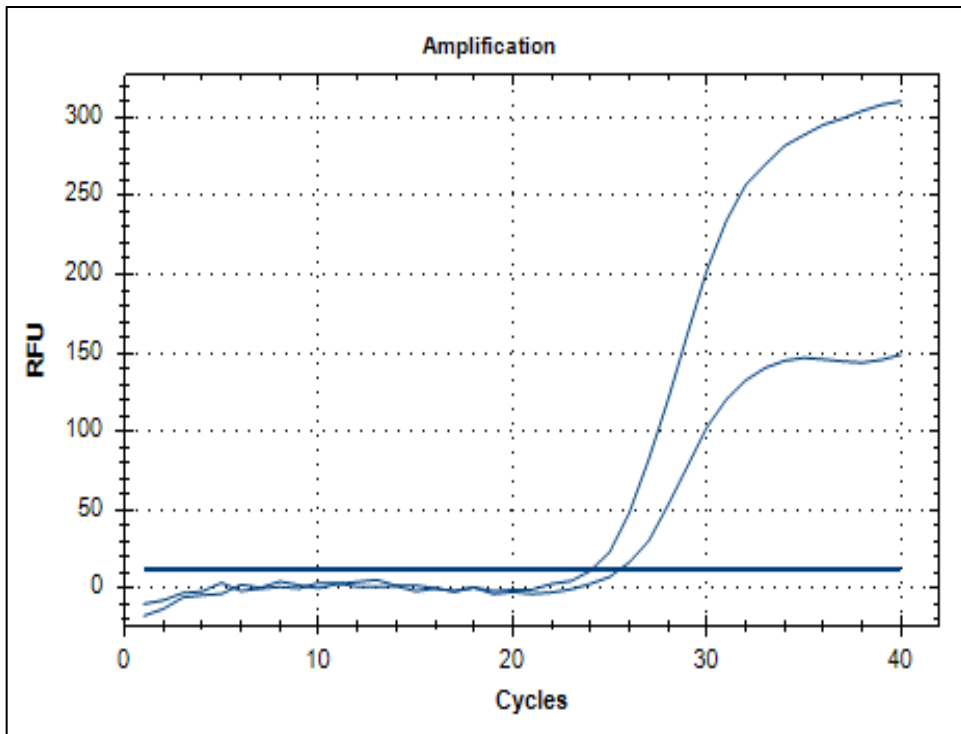
Gráficas de las sigmoideas para la misma muestra con los dos reactivos



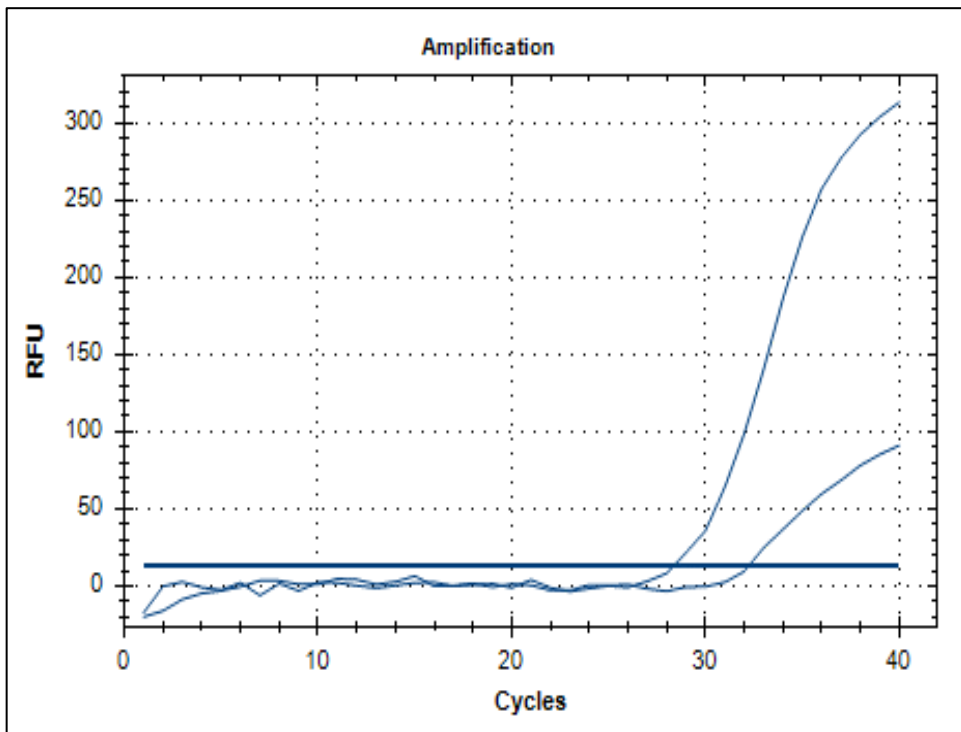
**Figura 24.** Comparación de las señales obtenidas para la muestra 23



**Figura 25.** Comparación de las señales obtenidas para la muestra 27



**Figura 26.** Comparación de las señales obtenidas para la muestra 26



**Figura 27.** Comparación de las señales obtenidas para el control positivo

Conclusiones procesamiento 6: Las señales obtenidas con Qiagen dieron peor y más bajas, por lo que se sospecha de un deterioro del reactivo de Qiagen.

Procesamiento N°7: para confirmar el deterioro del reactivo de Qiagen se largaron 6 muestras nuevas en paralelo con PB-L.

Resultados

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A06	Cy5	Control exógeno	Control Positivo		30,49
A06	FAM	RSV	Control Positivo		29,82
A06	HEX	Control endógeno	Control Positivo		
B06	Cy5	Control exógeno	Extracto	28	30,45
B06	FAM	RSV	Extracto	28	21,76
B06	HEX	Control endógeno	Extracto	28	26,98
C06	Cy5	Control exógeno	Extracto	38	32,82
C06	FAM	RSV	Extracto	38	27,80
C06	HEX	Control endógeno	Extracto	38	36,74
D06	Cy5	Control exógeno	Extracto	39	30,21
D06	FAM	RSV	Extracto	39	27,62
D06	HEX	Control endógeno	Extracto	39	30,86
E06	Cy5	Control exógeno	Extracto	40	29,45
E06	FAM	RSV	Extracto	40	28,72
E06	HEX	Control endógeno	Extracto	40	29,22

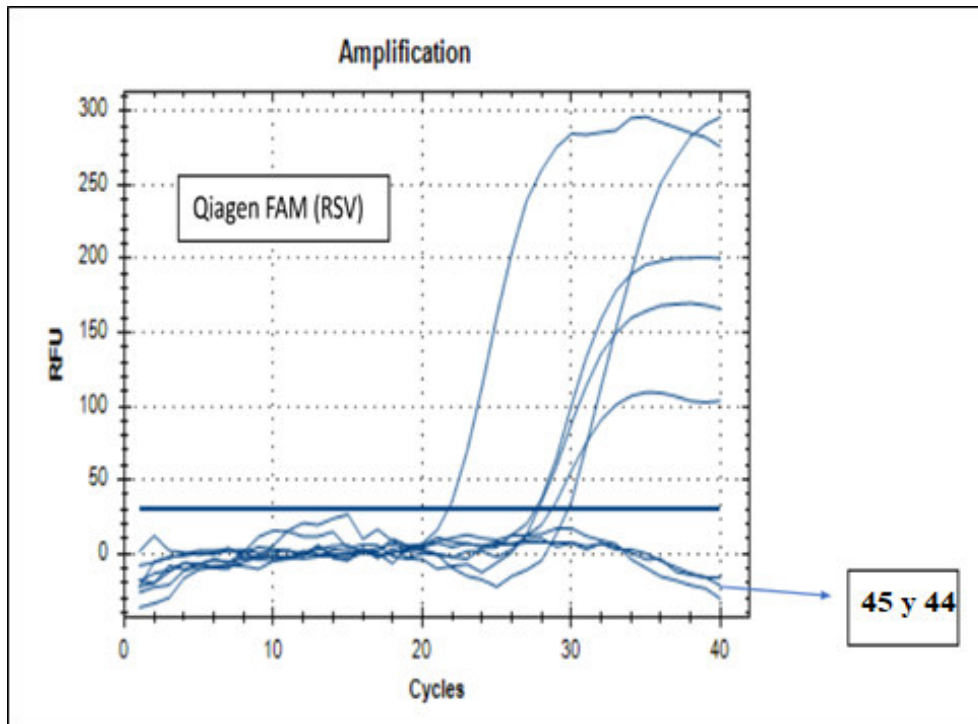
F06	Cy5	Control exógeno	Extracto	44	30,01
F06	FAM	RSV	Extracto	44	
F06	HEX	Control endógeno	Extracto	44	31,12
G06	Cy5	Control exógeno	Extracto	45	32,14
G06	FAM	RSV	Extracto	45	
G06	HEX	Control endógeno	Extracto	45	31,18
H06	Cy5	Control exógeno	Control Negativo		31,42
H06	FAM	RSV	Control Negativo		
H06	HEX	Control endógeno	Control Negativo		

**Tabla 22.** Resultados Qiagen

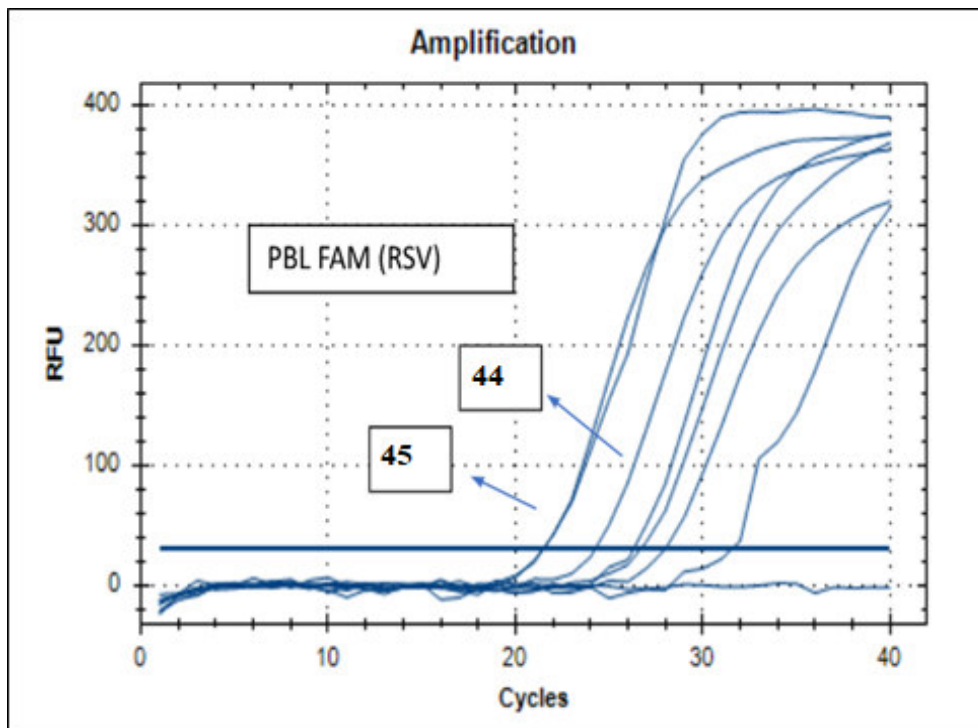
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A07	Cy5	Control endógeno	Control Positivo		
A07	FAM	RSV	Control Positivo		31,53
B07	Cy5	Control endógeno	Extracto	28	29,15
B07	FAM	RSV	Extracto	28	21,47
C07	Cy5	Control endógeno	Extracto	38	38,72
C07	FAM	RSV	Extracto	38	27,99
D07	Cy5	Control endógeno	Extracto	39	33,70
D07	FAM	RSV	Extracto	39	26,65

E07	Cy5	Control endógeno	Extracto	40	29,52
E07	FAM	RSV	Extracto	40	26,29
F07	Cy5	Control endógeno	Extracto	44	30,54
F07	FAM	RSV	Extracto	44	24,24
G07	Cy5	Control endógeno	Extracto	45	28,00
G07	FAM	RSV	Extracto	45	21,43
H07	Cy5	Control endógeno	Control Negativo		39,73
H07	FAM	RSV	Control Negativo		
<b>Tabla 23.</b> Resultados PB-L					

Conclusiones procesamiento 7: Los Cts con ambos reactivos fueron bastante parejos esta vez, aunque con mesetas más bajas para Qiagen, además dos muestras (44 y 45) no levantaron señal para el RSV con el reactivo de Qiagen pero sí con PBL como se observa en las figuras 28 y 29. Por otro lado, los controles exógenos y endógenos de esas mismas muestras dan valores normales. Se sospecha que el reactivo de Qiagen está perdiendo rendimiento lo cual es lógico ya que, aunque sigue funcionando, ya ha excedido su fecha de vencimiento.



**Figura 28.** Curvas de fluorescencia (FAM) obtenidas por el kit de Qiagen



**Figura 29.** Curvas de fluorescencia (FAM) obtenidas por el kit de PB-L

Procesamiento N°8: se procesaron 6 muestras con resultados previos negativos además del control positivo y negativo utilizando ambos kits para continuar con las comparaciones.

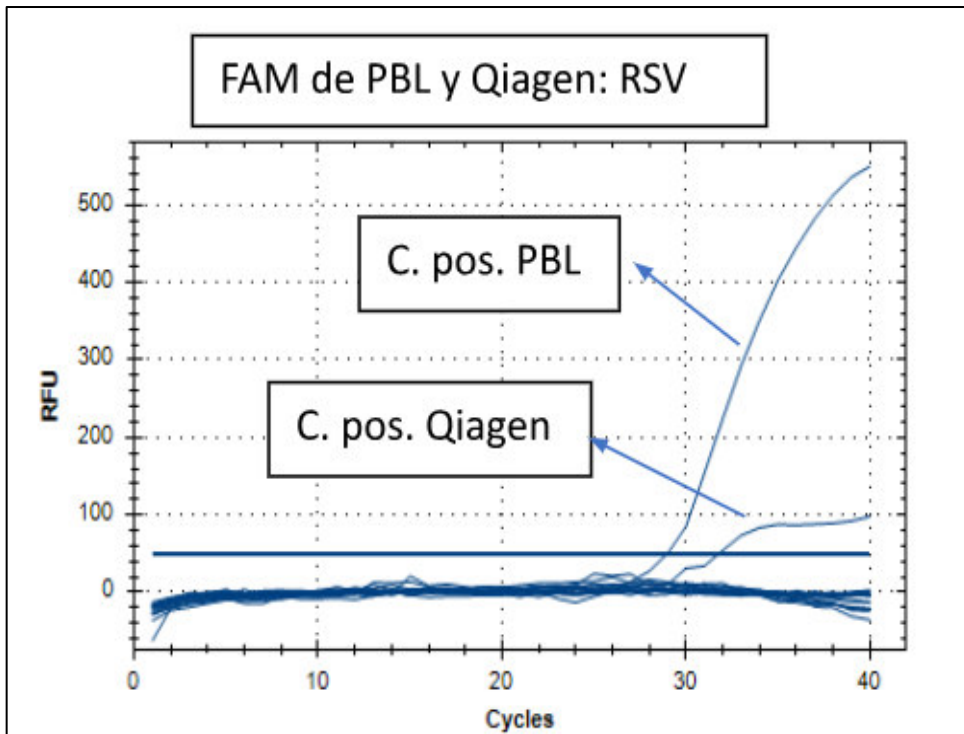
Resultados

<b>Well</b>	<b>Fluor</b>	<b>Target</b>	<b>Content</b>	<b>Sample</b>	<b>Cq</b>
A06	Cy5	Control endógeno	Control Positivo		8,98
A06	FAM	RSV	Control Positivo		28,97
B06	Cy5	Control endógeno	Extracto	90	28,52
B06	FAM	RSV	Extracto	90	
C06	Cy5	Control endógeno	Extracto	91	29,29
C06	FAM	RSV	Extracto	91	
D06	Cy5	Control endógeno	Extracto	92	25,08
D06	FAM	RSV	Extracto	92	
E06	Cy5	Control endógeno	Extracto	93	27,78
E06	FAM	RSV	Extracto	93	
F06	Cy5	Control endógeno	Extracto	94	
F06	FAM	RSV	Extracto	94	
G06	Cy5	Control endógeno	Extracto	95	26,90
G06	FAM	RSV	Extracto	95	
H06	Cy5	Control endógeno	Control Negativo		

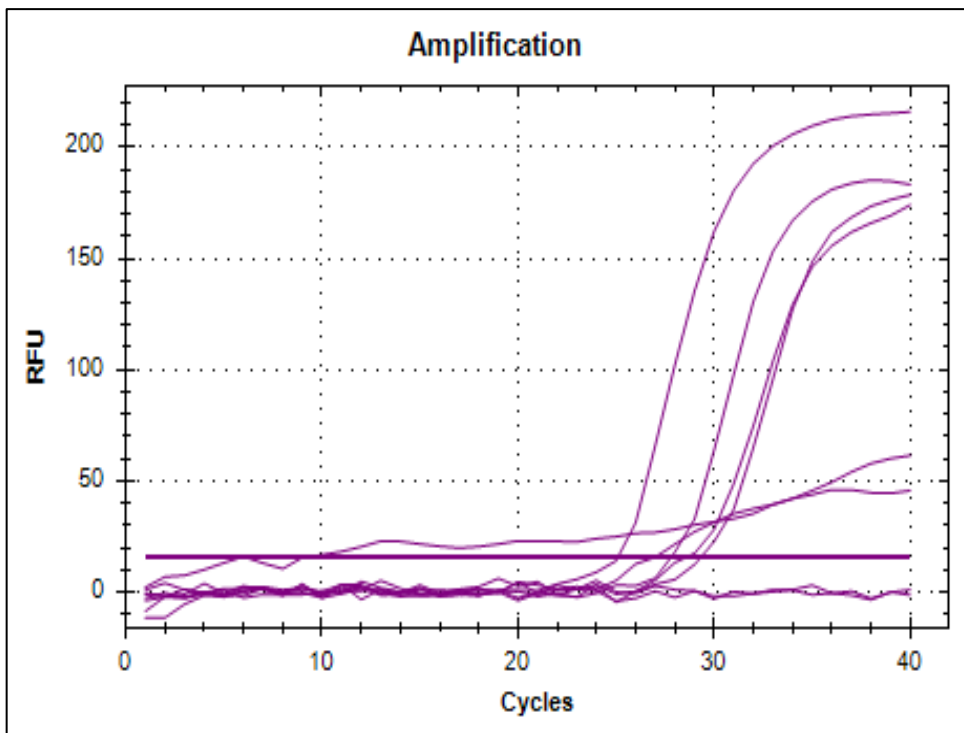
H06	FAM	RSV	Control Negativo		
<b>Tabla 24.</b> Resultados PB-L					

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A07	Cy5	Control exógeno	Control Positivo		26,89
A07	FAM	RSV	Control Positivo		31,78
A07	HEX	Control endógeno	Control Positivo		
B07	Cy5	Control exógeno	Extracto	90	29,65
B07	FAM	RSV	Extracto	90	
B07	HEX	Control endógeno	Extracto	90	29,30
C07	Cy5	Control exógeno	Extracto	91	29,41
C07	FAM	RSV	Extracto	91	
C07	HEX	Control endógeno	Extracto	91	31,58
D07	Cy5	Control exógeno	Extracto	92	28,90
D07	FAM	RSV	Extracto	92	
D07	HEX	Control endógeno	Extracto	92	25,80
E07	Cy5	Control exógeno	Extracto	93	29,91
E07	FAM	RSV	Extracto	93	
E07	HEX	Control endógeno	Extracto	93	29,12
F07	Cy5	Control exógeno	Extracto	94	30,14

F07	FAM	RSV	Extracto	94	
F07	HEX	Control endógeno	Extracto	94	36,05
G07	Cy5	Control exógeno	Extracto	95	30,84
G07	FAM	RSV	Extracto	95	
G07	HEX	Control endógeno	Extracto	95	27,01
H07	Cy5	Control exógeno	Control Negativo		30,64
H07	FAM	RSV	Control Negativo		
H07	HEX	Control endógeno	Control Negativo		
<b>Tabla 25.</b> Resultados Qiagen					



**Figura 30.** Comparación de la señal FAM obtenida del control positivo



**Figura 31.** Curvas de fluorescencia (Cy5) obtenidas del control endógeno de PB-L

Conclusiones procesamiento 8: Como se observa en la figura 30, en este ensayo la señal del control positivo obtenida por el kit de Qiagen es mucho más baja que la obtenida con el kit de PBL y, a esta altura asumimos que ha dejado de funcionar adecuadamente por haber excedido la fecha de vencimiento. El resto de las muestras dan todas negativas validadas por sus respectivos controles.

Procesamiento N°9: Se corrige un error de cálculo cometido al pasar a 20 ul con el reactivo de PB-L y se modifican algunos volúmenes de la mix. En este proceso se evalúan seis muestras positivas por IFD (muestras 41, 42, 43, 49, 46 y 48) y 16 muestras negativas por IFD (muestras 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106,107,108, 109, 62 y 63).

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (ul)</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Fluoróforo</b>
Master mix 2x	10	1x	
Mix enzimas 25x	0,8	1x	
DTT 1 mM	1,6	1x	
RSV F (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RSV R (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RSV P (6 uM)	0,23	0,07 uM	FAM
RNAsaP F (24 uM)	0,2	0,19 uM	
RNAsaP R (24 uM)	0,2	0,19 uM	
RNAsaP P (6 uM)	0,1	0,024 uM	Cy5
AD	3		
Molde	3		
Vol. Total	20		
<b>Tabla 26.</b> Premix PB-L			

Resultados:

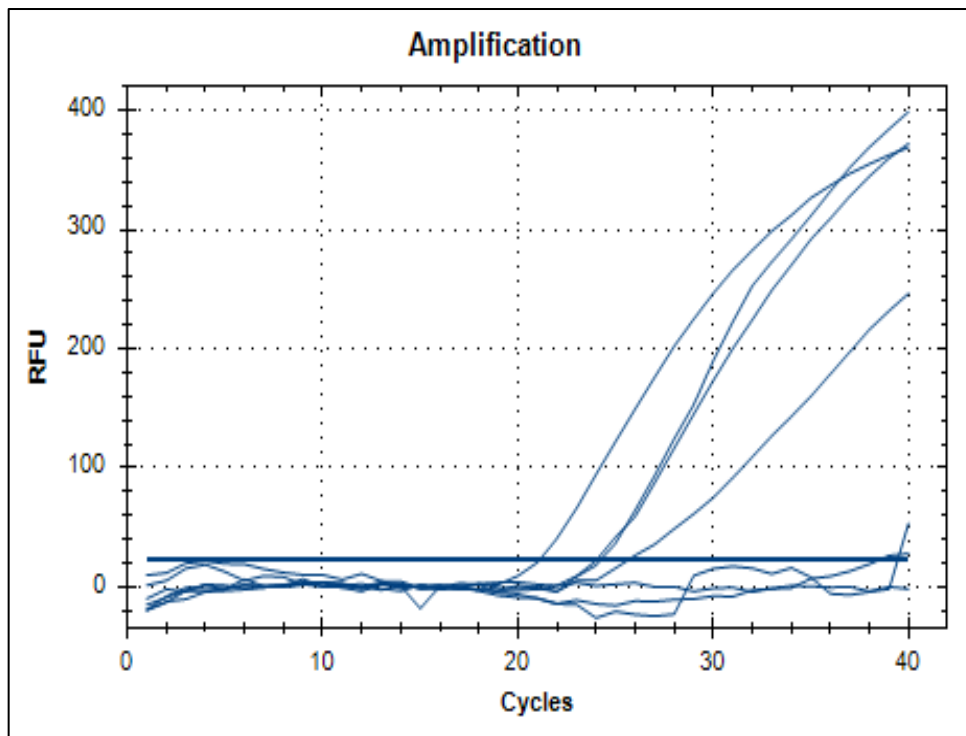
Well	Fluor	Content	Sample	Cq
A05	FAM	Control Positivo		39,45
B05	FAM	Extracto	41	24,26
C05	FAM	Extracto	42	24,05
D05	FAM	Extracto	43	25,68
E05	FAM	Extracto	49	21,12
F05	FAM	Extracto	46	38,54
G05	FAM	Extracto	48	N/A
A05	Cy5	Control Positivo		N/A
B05	Cy5	Extracto	41	N/A
C05	Cy5	Extracto	42	N/A
D05	Cy5	Extracto	43	N/A
E05	Cy5	Extracto	49	N/A
F05	Cy5	Extracto	46	N/A
G05	Cy5	Extracto	48	N/A

**Tabla 27.** Resultados PB-L (Muestras IF positivas)

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A06	Cy5	Control endógeno	Extracto	96	27,83
A06	FAM	RSV	Extracto	96	
B06	Cy5	Control endógeno	Extracto	97	35,32
B06	FAM	RSV	Extracto	97	
C06	Cy5	Control endógeno	Extracto	98	23,53
C06	FAM	RSV	Extracto	98	
D06	Cy5	Control endógeno	Extracto	99	

D06	FAM	RSV	Extracto	99	
E06	Cy5	Control endógeno	Extracto	100	
E06	FAM	RSV	Extracto	100	
F06	Cy5	Control endógeno	Extracto	101	
F06	FAM	RSV	Extracto	101	
G06	Cy5	Control endógeno	Extracto	102	24,36
G06	FAM	RSV	Extracto	102	
H06	Cy5	Control endógeno	Extracto	103	
H06	FAM	RSV	Extracto	103	
A07	Cy5	Control endógeno	Extracto	104	
A07	FAM	RSV	Extracto	104	
B07	Cy5	Control endógeno	Extracto	105	38,54
B07	FAM	RSV	Extracto	105	38,55
C07	Cy5	Control endógeno	Extracto	106	
C07	FAM	RSV	Extracto	106	
D07	Cy5	Control endógeno	Extracto	107	
D07	FAM	RSV	Extracto	107	
E07	Cy5	Control endógeno	Extracto	108	27,51
E07	FAM	RSV	Extracto	108	
F07	Cy5	Control endógeno	Extracto	109	23,29
F07	FAM	RSV	Extracto	109	
G07	Cy5	Control endógeno	Extracto	62	
G07	FAM	RSV	Extracto	62	
H07	Cy5	Control endógeno	Extracto	63	
H07	FAM	RSV	Extracto	63	25,12

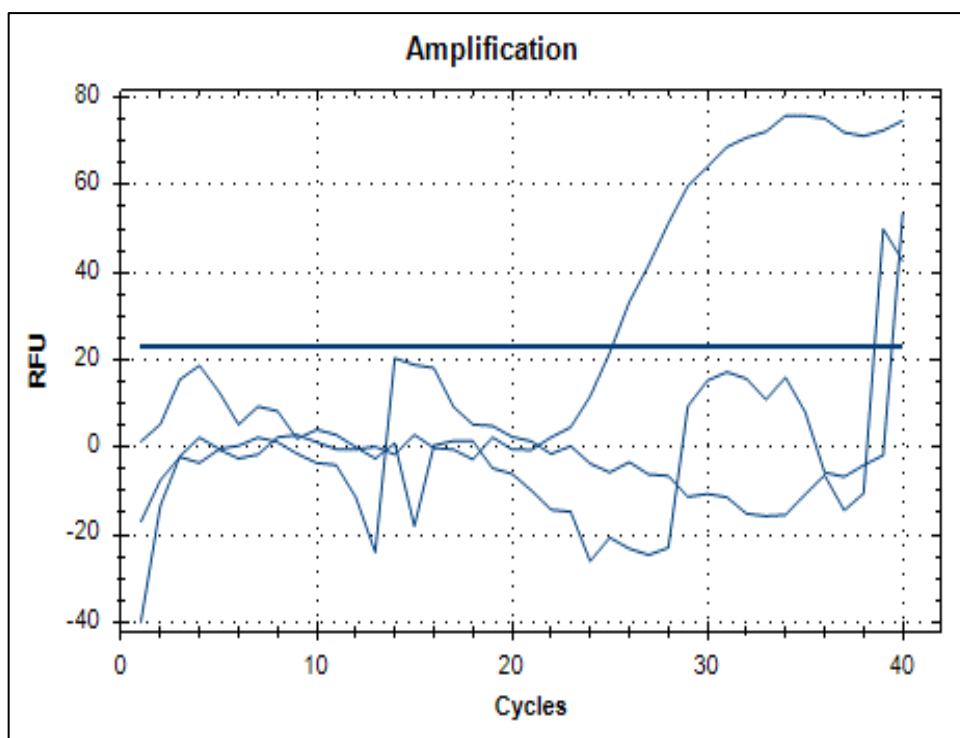
**Tabla 28.** Resultados PB-L (Muestras IF negativas)



**Figura 32.** Curvas de fluorescencia (FAM) para las muestras IF positivas obtenidas por el kit de PB-L

Conclusiones procesamiento 9: De entre las seis muestras positivas por IF se encontró una que da negativo, la muestra 48, y de entre las 16 muestras negativas por IFD al menos una es positiva para VSR. Sin embargo, es notable el hecho de que solo seis controles endógenos de las 16 negativas y ninguno de las muestras negativas dieron positivo, lo cual indica o baja celularidad o degradación del RNA durante el almacenamiento y transporte. El criterio que se utiliza en estas circunstancias (c. endógeno negativo) es considerar de cualquier forma positivos validados a los que den señal positiva para el virus, en este caso las cinco IFD positivas y la IFD negativa dejando como indeterminadas a las que dan doble negativo. Por otra parte, para las muestras negativas por IF se encontró bastante señal espuria por lo que se levantó el umbral de manera que siga positivo y eliminar a la mayoría de los resultados dudosos. Luego de estas correcciones se verifica que dos muestras negativas por IFD dan positivo por RTqPCR: la 105 (Ct = 38,55) que posiblemente (porque tiende a bajar) sea un falso positivo y la 63 (Ct = 25,12) que seguramente es un verdadero positivo no detectado por IFD. En este procesamiento observamos que el control positivo quedó con un Ct muy elevado (39,45) lo que muy probablemente se deba a degradación ya que se estaba

trabajando con alícuotas de RNA guardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  como control positivo. Debido a esta observación cambiamos a utilizar una dilución de una muestra positiva alicuotada y preservada a  $-20^{\circ}\text{C}$  como control positivo lo que le da mucha más estabilidad a este control.



**Figura 33.** Curvas de fluorescencia (FAM) obtenidas para el control positivo y las muestras 105 y 63, luego de corregir el umbral.

Procesamiento N°10: En esta etapa se deja de utilizar el kit de Qiagen dado que evidenció deterioro por haber expirado su fecha de vencimiento. Por esto, como ya no hace falta utilizar las mismas concentraciones para armonizar el uso de ambos kits se modificó el protocolo de PB-L aumentando la concentración de probe de RSV y las concentraciones de primers y probe del control endógeno para intentar mejorar el desempeño (tabla 29). El nuevo protocolo eleva de  $0,07\ \mu\text{M}$  a  $0,12\ \mu\text{M}$  la concentración de ambos probes para intentar obtener sigmoideas más netas, con menos señal espuria y una meseta final más alta. Se procesaron 7 muestras no testeadas previamente por RTqPCR, 3 positivas para IFD (47, 60 y 61) y 4 negativas para IFD (64, 65, 66 y 67) y se repite la 48 (positiva para IFD) para verificar si es un falso positivo.

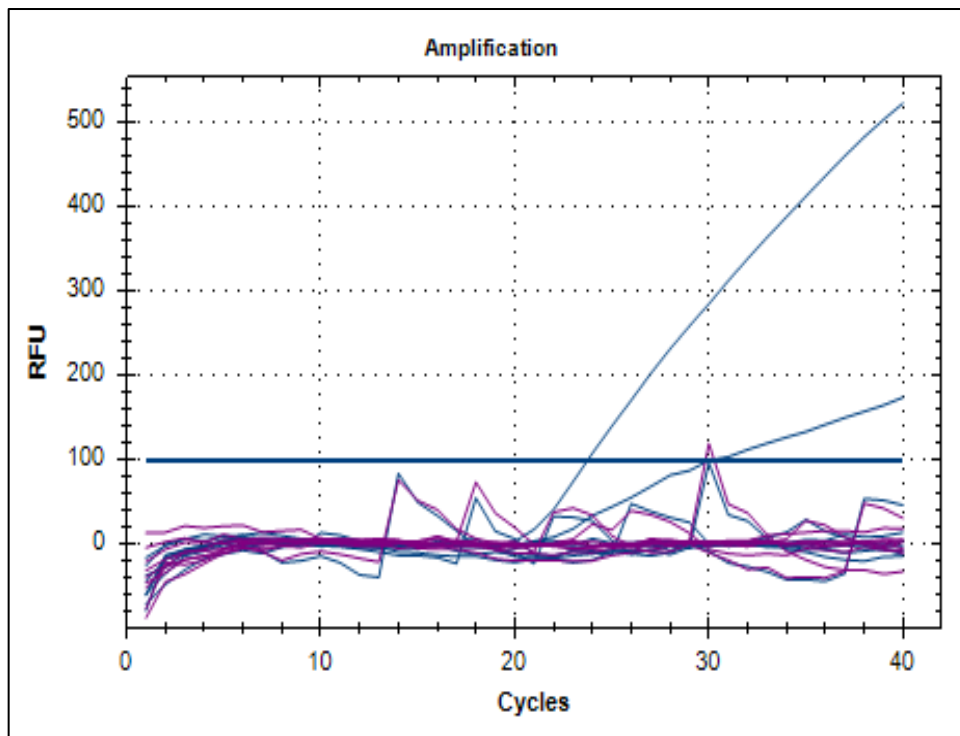
Reactivo	Volumen (ul)	Concentración final	Fluoróforo
Master mix 2x	10	1x	
Mix enzimas 25x	0,8	1x	
DTT 1 mM	1,6	1x	
RSV F (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RSV R (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RSV P (6 uM)	0,23	0,12 uM	FAM
RNAsaP F (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RNAsaP R (24 uM)	0,42	0,5 uM	
RNAsaP P (6 uM)	0,4	0,12 uM	Cy5
AD	2,12		
Molde	3		
Vol. Total	~20		

**Tabla 29.** Premix PB-L

### Resultados

Well	Fluor	Content	Sample	Cq
A06	FAM	Control Positivo		N/A
B06	FAM	Extracto	48	N/A
C06	FAM	Extracto	47	23,70
D06	FAM	Extracto	60	29,88
E06	FAM	Extracto	61	N/A
F06	FAM	Extracto	64	N/A
G06	FAM	Extracto	65	N/A
A07	FAM	Extracto	66	N/A
B07	FAM	Extracto	67	N/A

**Tabla 30.** Resultados (FAM) PB-L



**Figura 34.** Curvas de fluorescencia para las muestras (FAM) y el control endógeno (Cy5) obtenidas por el kit de PB-L

Conclusiones procesamiento 10: Los controles endógenos dieron negativo en todas las muestras y controles. A su vez las señales de FAM también son extrañas con picos inexplicables (señales que suben y bajan durante cierta cantidad de ciclos).

De las 4 muestras positivas (47, 48, 60 y 61) solo dos (47 y 60) dieron una señal positiva aceptable.

Procesamiento N°11: se continuó procesando muestras negativas por IFD para comparar con RTqPCR, pero esta vez usando una reacción dúplex para obtener resultados combinados de RSV y Rinovirus (ambos con el fluoróforo FAM). Esto se hizo para aprovechar los reactivos en la detección de un virus que no se incluye en el panel de IFD y sabiendo por observaciones previas que los resultados individuales de cada detección no varían entre los formatos monoplex o dúplex (Trabajo Final de Bioquímica de Leila Albarracín, UNAJ 2024). En este protocolo se bajaron las concentraciones de las probe porque no hubo mejora con respecto al utilizado en el procesamiento anterior

Se procesaron 5 muestras en total, un control positivo para RSV y otro para Rinovirus, además del control negativo (AD).

Reactivos Mix Rino/RSV	Volumen (ul)	Concentración final	Fluoróforo
Master Mix 2x	10	1x	
Enzimas	0,8	1x	
DTT (1 uM)	1,6	0,08 uM	
Primer F Rino (24 uM)	0.4	0,48 uM	
Primer R Rino (24 uM)	0,4	0,48 uM	
Probe Rino (6 uM)	0,2	0,06 uM	FAM
Primer F RSV (24 uM)	0,4	0,48 uM	
Primer R RSV (24 uM)	0,4	0,48 uM	
Probe RSV (6 uM)	0,2	0,06 uM	FAM
Primer F RNAsaP (24 uM)	0,2	0,24 uM	
Primer R RNAsaP (24 uM)	0,2	0,24 uM	
Probe RNAsaP (6 uM)	0,1	0,03 uM	Cy5
AD	2,1		
Molde	3		
Vol. Total	20		

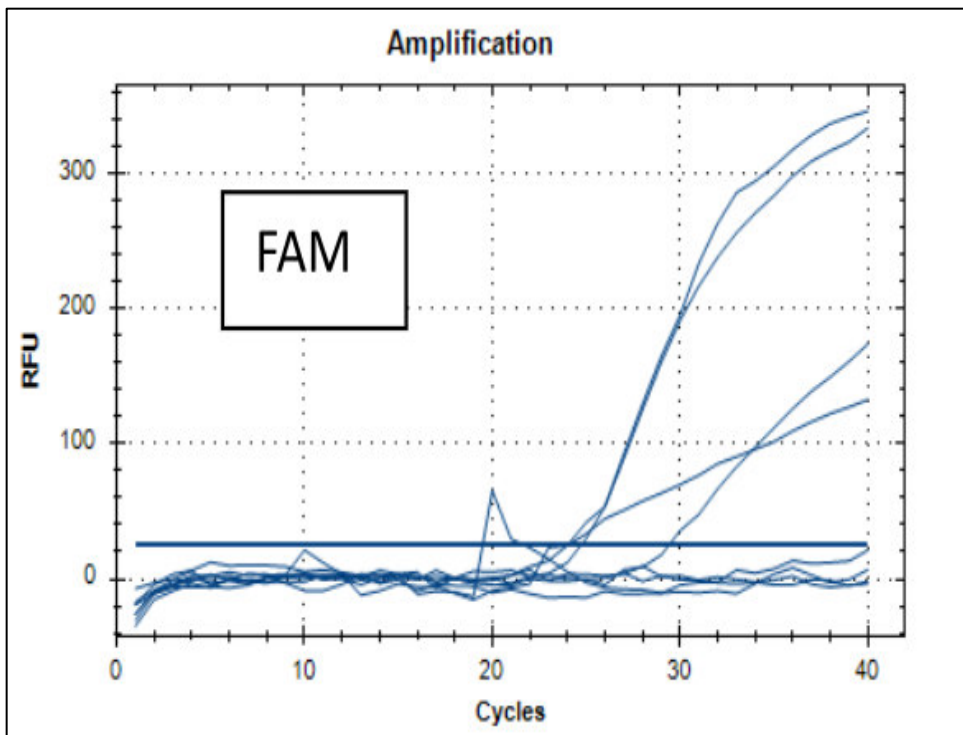
**Tabla 31.** Premix PB-L (dúplex RSV/Rinovirus)

#### Resultados

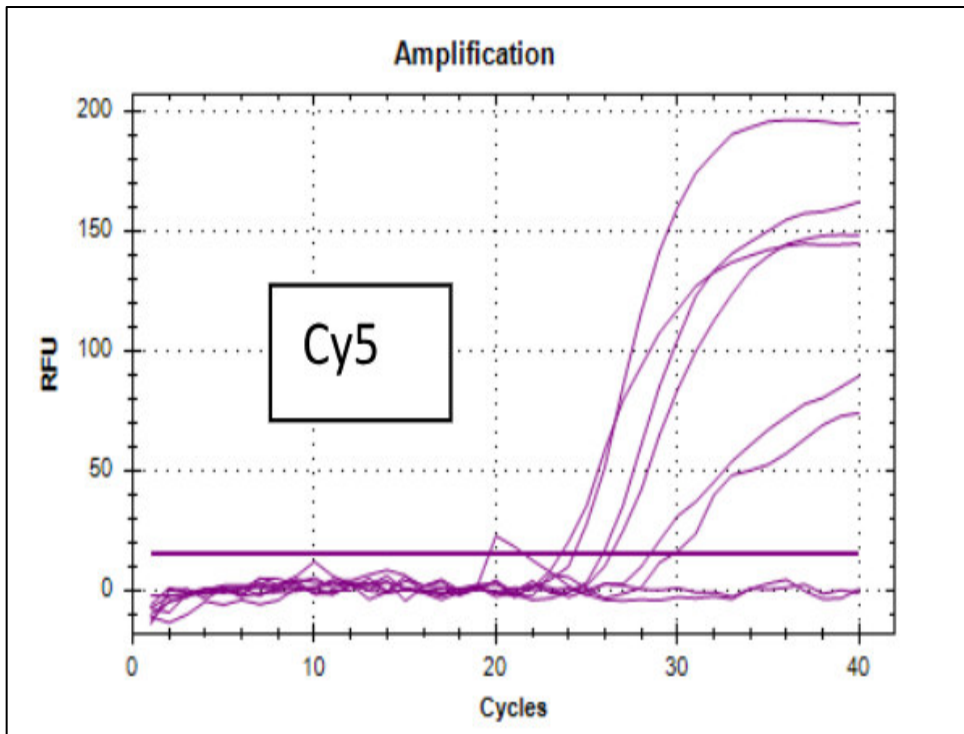
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A06	Cy5	C. endógeno	Neg Ctrl	Neg Ctrl	19,61
A06	FAM	RSV/Rino	Neg Ctrl	Neg Ctrl	19,49
B06	Cy5	C. endógeno	Extracto	110	29,68
B06	FAM	RSV/Rino	Extracto	110	24,01
C06	Cy5	C. endógeno	Extracto	111	26,31
C06	FAM	RSV/Rino	Extracto	111	
D06	Cy5	C. endógeno	Extracto	112	28,45

D06	FAM	RSV/Rino	Extracto	112	24,72
E06	Cy5	C. endógeno	Extracto	113	23,54
E06	FAM	RSV/Rino	Extracto	113	24,01
F06	Cy5	C. endógeno	Extracto	121	24,27
F06	FAM	RSV/Rino	Extracto	121	
G06	Cy5	C. endógeno	Pos Ctrl	Pos RSV	
G06	FAM	RSV/Rino	Pos Ctrl	Pos RSV	29,4
H06	Cy5	C. endógeno	Pos Ctrl	Pos Rino	25,83
H06	FAM	RSV/Rino	Pos Ctrl	Pos Rino	

**Tabla 32.** Resultados PB-L (dúplex RSV/Rino)



**Figura 35.** Curvas de fluorescencia (FAM) obtenidas por el kit de PB-L



**Figura 36.** Curvas de fluorescencia (Cy5) del control endógeno obtenidas por el kit de PB-L

Conclusiones procesamiento 11: De las 5 muestras negativas por IF, 3 de ellas dieron positivo para Rinovirus o VSR (ambos blancos se detectan en el canal de FAM). En procesos posteriores se discriminará en wells separados. El control negativo dio un Ct de aproximadamente 19 en Cy5 y FAM por un salto de fluorescencia sin sentido (resaltado en amarillo en la tabla), el cual no sucede con el resto de las muestras, por ello no se le atribuye importancia. El control positivo de rinovirus no anduvo posiblemente por haber sido conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un período prolongado (corresponde a un TFB anterior) por lo que se va a cambiar.

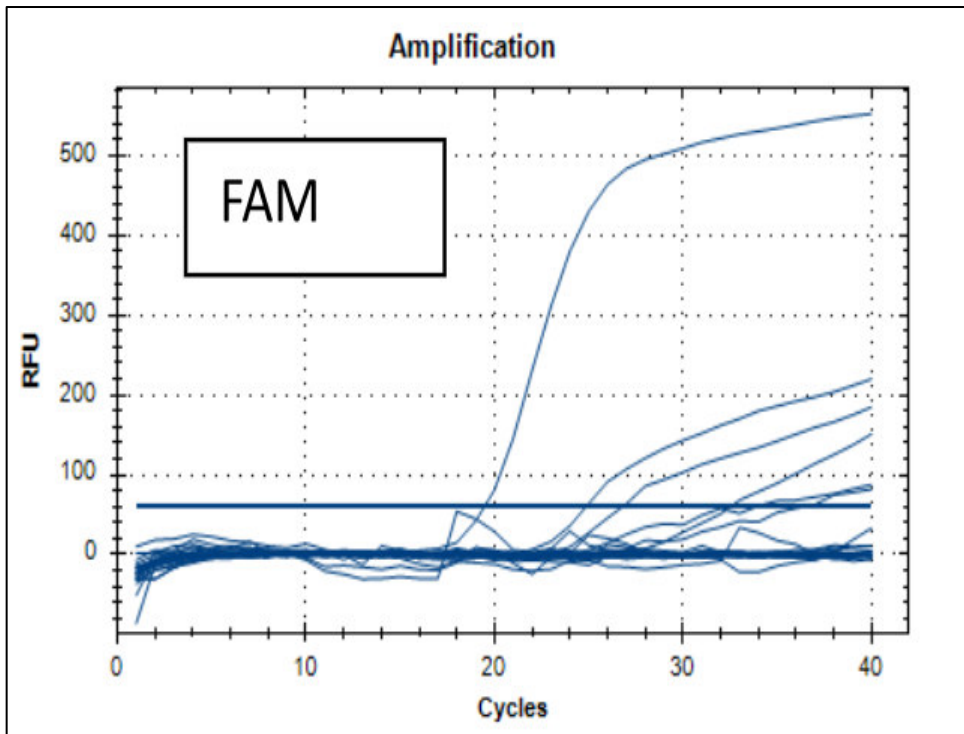
Procesamiento N°12: se procesaron el resto de las muestras negativas necesarias para finalizar el trabajo.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A06	Cy5	Control endógeno	Control Negativo		

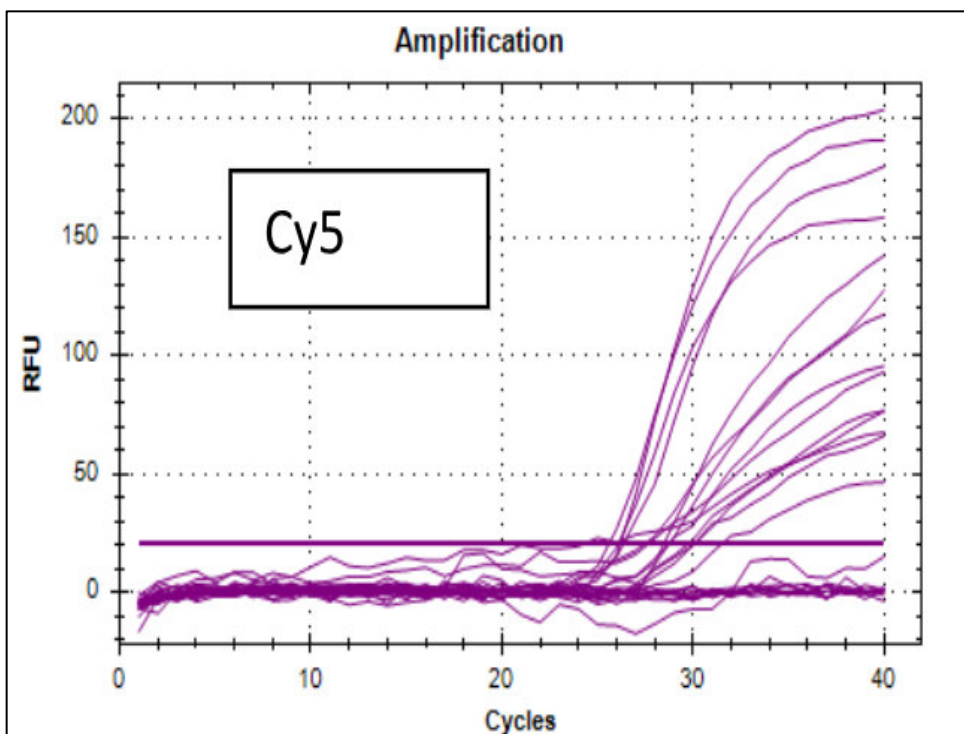
A06	FAM	RSV/Rino	Control Negativo		
A07	Cy5	Control endógeno	Extracto	119	
A07	FAM	RSV/Rino	Extracto	119	
A08	Cy5	Control endógeno	Extracto	65	27,54
A08	FAM	RSV/Rino	Extracto	65	
B06	Cy5	Control endógeno	Extracto	114	30,11
B06	FAM	RSV/Rino	Extracto	114	
B07	Cy5	Control endógeno	Extracto	120	30,13
B07	FAM	RSV/Rino	Extracto	120	
B08	Cy5	Control endógeno	Extracto	66	
B08	FAM	RSV/Rino	Extracto	66	
C06	Cy5	Control endógeno	Extracto	115	25,63
C06	FAM	RSV/Rino	Extracto	115	19,45
C07	Cy5	Control endógeno	Extracto	122	
C07	FAM	RSV/Rino	Extracto	122	
C08	Cy5	Control endógeno	Extracto	67	28,75
C08	FAM	RSV/Rino	Extracto	67	
D06	Cy5	Control endógeno	Extracto	116	27,72
D06	FAM	RSV/Rino	Extracto	116	
D07	Cy5	Control endógeno	Extracto	123	
D07	FAM	RSV/Rino	Extracto	123	
D08	Cy5	Control endógeno	Extracto	68	24,42
D08	FAM	RSV/Rino	Extracto	68	
E06	Cy5	Control endógeno	Extracto	117	26,39
E06	FAM	RSV/Rino	Extracto	117	
E07	Cy5	Control endógeno	Extracto	124	
E07	FAM	RSV/Rino	Extracto	124	
E08	Cy5	Control endógeno	Extracto	69	
E08	FAM	RSV/Rino	Extracto	69	

F06	Cy5	Control endógeno	Extracto	118	29,82
F06	FAM	RSV/Rino	Extracto	118	
F07	Cy5	Control endógeno	Extracto	125	28,50
F07	FAM	RSV/Rino	Extracto	125	26,75
F08	Cy5	Control endógeno	Extracto	70	26,20
F08	FAM	RSV/Rino	Extracto	70	
G06	Cy5	Control endógeno	Positivo RSV		
G06	FAM	RSV/Rino	Positivo RSV		32,48
G07	Cy5	Control endógeno	Extracto	126	
G07	FAM	RSV/Rino	Extracto	126	
G08	Cy5	Control endógeno	Extracto	71	28,80
G08	FAM	RSV/Rino	Extracto	71	33,81
H06	Cy5	Control endógeno	Positivo Rino		26,12
H06	FAM	RSV/Rino	Positivo Rino		24,84
H07	Cy5	Control endógeno	Extracto	64	31,57
H07	FAM	RSV/Rino	Extracto	64	36,26
H08	Cy5	Control endógeno	Extracto		
H08	FAM	RSV/Rino	Extracto		

**Tabla 33.** Resultados PB-L (dúplex RSV/Rino)



**Figura 37.** Curvas de fluorescencia (FAM) obtenidas por el kit de PB-L



**Figura 38.** Curvas de fluorescencia (Cy5) del control endógeno obtenidas por el kit de PB-L

Las muestras 115, 125, 71 y 64 dieron positivas y se retestearon en una reacción multiplex para discriminar entre RSV y Rinovirus. Hubo 7 muestras que no levantaron señal de FAM ni del control endógeno (Cy5) por lo que quedaron invalidadas.

## **8. Análisis de los resultados**

Inicialmente nos propusimos hacer una comparación directa del desempeño de un kit nacional contra un kit importado de alta calidad de una marca muy prestigiosa. Si bien se pudo avanzar algo en este sentido, el hecho de que comenzara a notarse un deterioro en el rendimiento del kit importado hizo que se redirigiera el trabajo a una comparación con la técnica de rutina de IFD. De las muestras procesadas se obtuvieron datos suficientes como para satisfacer el propósito general del trabajo ya que se alcanzó a tener una idea comparativa con el kit de Qiagen al procesar varias muestras en paralelo y con el método actual de detección en los hospitales (IFD) al procesar bastantes muestras negativas por esta técnica.

En los procesamientos 9 y 10 se encontraron fallos al momento de detectar las señales correspondientes al control endógeno.

De las muestras que estaban pendientes para discriminar entre RSV y Rinovirus (muestras 110, 112, 113 y 115) se procesaron posteriormente e indicaron que las muestras 110 y 112 correspondían a RSV (anteriormente eran negativos por IF), mientras que las muestras 113 y 115 correspondían a Rinovirus.

En las tablas 34 y 35 se pueden apreciar los resultados generales que se fueron obteniendo. Inicialmente, de las 20 muestras con resultados positivos por IFD (tabla 34) nueve pudieron ser procesadas en paralelo con los dos kits dando resultados muy similares, 18 de las 20 fueron positivas con los reactivos de PB-L pero las dos negativas fueron también negativas para el control endógeno lo que indica probable deterioro del RNA en la conservación de las muestras. Dos muestras fueron positivas por PBL y negativas por Qiagen, aunque esto es atribuible al deterioro del kit que a partir de ese procesamiento ya no se usó y nos concentramos en evaluar muestras negativas por IFD en comparación con PBL para explorar la mayor sensibilidad reportada de la RTqPCR con respecto a la IF.

Muestras con resultados positivos por IFD para RSV			
N° de Muestra	N° de Extracto	Cq PB-L	Cq Qiagen
R00148	23	28,84	27,94
R00149	27	30,49	30,37
R00150	24	33,84	33,16
R00151	25	23,19	22,91
R00152	26	25,30	24,07
R00157	28	23,72	21,49
R00273	44	24,24	N/A
R00272	45	21,43	N/A
R00269	47	23,70	No se uso
R00266	46	38,54	No se uso
R00264	48	N/A	No se uso
R00261	49	21,12	No se uso
R00155	38	27,99	27,80
R00154	39	26,65	27,62
R00156	40	26,29	28,72
R00194	41	24,26	No se uso
R00195	42	24,05	No se uso
R00196	43	25,68	No se uso
R00257	60	29,88	No se uso
R00254	61	N/A	No se uso

**Tabla 34.** Resultados para las muestras positivas por IFD

De las 47 muestras previamente descritas como negativas por IFD puede observarse en la tabla 35 que nueve fueron positivas para VSR o Rinovirus por RTqPCR procesadas con PBL, lo cual ejemplifica el mayor poder de detección en general de la técnica molecular. Este mejor desempeño con una dúplex RTqPCR se manifiesta ya sea por extender el rango a virus que no pueden detectarse por IF (Rinovirus) o por la mayor sensibilidad de la primera (VSR). El procesamiento posterior para discriminar el agente nos mostró que siete de las nueve eran Rinovirus y dos eran VSR.

<b>Muestras con resultados negativos por IFD para RSV</b>			
N° de Muestra	N° de Extracto	Cq PB-L	Cq Qiagen
R00295	62	N/A	No se uso
R00296	63	25,12	No se uso
R00297	64	36,26	No se uso
R00298	65	N/A	No se uso
R00299	66	N/A	No se uso
R00300	67	N/A	No se uso
R00290	68	N/A	No se uso
R00292	69	N/A	No se uso
R00293	70	N/A	No se uso
R00294	71	33,81	No se uso
R00336	99	N/A	No se uso
R00329	98	N/A	No se uso
R00328	97	N/A	No se uso
R00327	96	N/A	No se uso
R00325	95	N/A	N/A
R00324	94	N/A	N/A
R00320	93	N/A	N/A
R00318	92	N/A	N/A
R00314	91	N/A	N/A
R00262	90	N/A	N/A
R00288	100	N/A	No se uso
R00287	101	N/A	No se uso
R00284	102	N/A	No se uso
R00259	109	N/A	No se uso
R00276	103	N/A	No se uso
R00275	104	N/A	No se uso
R00274	105	38,55	No se uso
R00271	106	N/A	No se uso
R00270	107	N/A	No se uso
R00265	108	N/A	No se uso
R00228	111	N/A	No se uso
R00246	110	24,01	No se uso
R00263	115	19,45	No se uso

R00302	112	24,72	No se uso
R00360	113	24,01	No se uso
R00364	114	N/A	No se uso
R00371	116	N/A	No se uso
R00377	117	N/A	No se uso
R00380	118	N/A	No se uso
R00381	119	N/A	No se uso
R00389	120	N/A	No se uso
R00402	121	N/A	No se uso
R00658	122	N/A	No se uso
R00659	123	N/A	No se uso
R00660	124	N/A	No se uso
R00661	125	26,75	No se uso
R00662	126	N/A	No se uso

**Tabla 35.** Resultados para las muestras negativas por IFD

## 9. Conclusiones

En este trabajo se logró poner a punto una técnica de RT-qPCR tanto en formato de monoplex (tabla 20) como en dúplex (tabla 31), utilizando el Kit One-Step qRT-PCR Plex de Productos Bio-Lógicos (PB-L), primers y sondas específicas para el virus sincitial respiratorio. Para ello se exploraron varias concentraciones de primers y probes y se unificaron las temperaturas de annealing y extensión reduciendo el tiempo total del proceso.

Si bien sería ideal trabajar con muchas más muestras, los datos recolectados en el trabajo dejan claro la mayor sensibilidad de la RT-qPCR con respecto al método actualmente utilizado en el Hospital Mi Pueblo de Florencio Varela (IF) debido a que nos permitió detectar dos muestras adicionales positivas para VSR halladas sobre 47 negativas por IFD. Por otro lado, aunque hay dos muestras sobre 20 que fueron positivas por IFD y negativas por RT-qPCR, el hecho de que no hayan sido procesadas simultáneamente por ambas técnicas, sino que la muestra fue sometida a más de un congelamiento y descongelamiento, transporte y almacenamientos de varias semanas implica que no se puede discriminar entre un deterioro del RNA y una detección falsa por IFD. Dado que el personal a cargo de ejecutar la IFD en el Hospital Mi Pueblo está

altamente capacitado y el hecho de que los controles endógenos sean negativos en ambos casos avalaría la hipótesis de un deterioro de la muestra más que un falso positivo.

Otro punto para destacar es que los tiempos que se requieren para obtener resultados confiables entre ambos métodos es diferente, ya que con la RT-qPCR pueden procesarse muchas muestras simultáneamente en formato strips con 6 muestras más controles como mínimo y en múltiplos de 8 por cada strip hasta una matriz completa de 96 pocillos (94 muestras máximo más dos controles). En contraste la IFD requiere de un procesamiento y observación microscópica individual de cada preparado por personal entrenado lo cual requiere de mucho tiempo de personal ocupado (“hands on”) en laboratorios con elevado volumen de muestras. En base a los resultados compilados en la tabla 34 se puede visualizar comparativamente el funcionamiento de dos kits de qRT-PCR, uno importado (Qiagen) y el otro de producción local (PB-L). Estos resultados dejan en claro que PB-L rinde valores de Ct semejantes a los de Qiagen lo que conlleva a un rendimiento similar al mismo por un costo mucho menor.

Por lo antedicho la RT-qPCR resulta ser un método que combina una mayor sensibilidad, rapidez, practicidad y economía con respecto al método de rutina de IFD. Por lo tanto, en el caso de que los hospitales dispongan del equipamiento necesario la técnica de qRT-PCR es la mejor opción al momento de obtener resultados de manera rápida y eficaz. En particular, el Kit One-Step qRT-PCR Plex de Productos Bio-Lógicos (PB-L) demostró ser equiparable con el kit de Qiagen en cuanto a desempeño y más conveniente en cuanto a costo al ser de producción local. La disponibilidad y fácil adquisición de este kit es también una ventaja ya que la empresa es de la localidad de Quilmes, lo cual lo hace ideal para su uso en hospitales locales y aledaños.

## **10. Fuente de información y referencias bibliográficas**

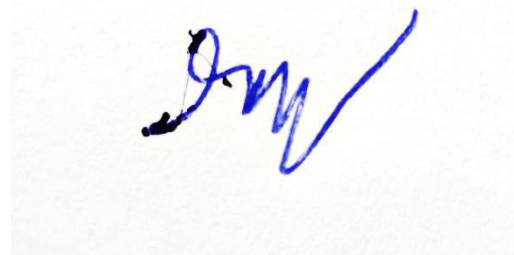
- 1- Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory syncytial virus--a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013 Dec;45(3):331-79. doi: 10.1007/s12016-013-8368-9. PMID: 23575961; PMCID: PMC7090643.
- 2- Ali A, Lopardo G, Scarpellini B, Stein RT, Ribeiro D. Systematic review on respiratory syncytial virus epidemiology in adults and the elderly in Latin America. *Int J Infect Dis.* 2020 Jan;90:170-180. doi:

- 10.1016/j.ijid.2019.10.025. Epub 2019 Oct 25. PMID: 31669592; PMCID: PMC7110494.
- 3- Barenfanger J, Drake C, Leon N, Mueller T, Troutt T. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *J Clin Microbiol.* 2000 Aug;38(8):2824-8. doi: 10.1128/JCM.38.8.2824-2828.2000. PMID: 10921934; PMCID: PMC87120.
  - 4- Prendergast C, Papenburg J. Rapid antigen-based testing for respiratory syncytial virus: moving diagnostics from bench to bedside? *Future Microbiol.* 2013 Apr;8(4):435-44. doi: 10.2217/fmb.13.9. PMID: 23534357.
  - 5- Rojo GL, Goya S, Orellana M, Sancilio A, Rodriguez Perez A, Montali C, García C, Sosa L, Musto A, Alvarez D, Castello A, Viegas M. Unravelling respiratory syncytial virus outbreaks in Buenos Aires, Argentina: Molecular basis of the spatio-temporal transmission. *Virology.* 2017 Aug;508:118-126. doi: 10.1016/j.virol.2017.04.030. Epub 2017 May 17. PMID: 28527341.
  - 6- Gharabaghi F, Hawan A, Drews SJ, Richardson SE. Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Dec;17(12):1900-6. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03529.x. Epub 2011 Jun 24. PMID: 21707834; PMCID: PMC7128441.
  - 7- Zhang S, Akmar LZ, Bailey F, et al. 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.* 2020 Oct;222(Suppl 7):S680-S687. DOI: 10.1093/infdis/jiz683. PMID: 32227101.
  - 8- Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, Polack FP, Balsells E, Acacio S, Aguayo C, Alassani I, Ali A, Antonio M, Awasthi S, Awori JO, Azziz-Baumgartner E, Baggett HC, Baillie VL, Balmaseda A, Barahona A, Basnet S, Bassat Q, Basualdo W, Bigogo G, Bont L, Breiman RF, Brooks WA, Broor S, Bruce N, Bruden D, Buchy P, Campbell S, Carosone-Link P, Chadha M, Chipeta J, Chou M, Clara W, Cohen C, de Cuellar E, Dang DA, Dash-Yandag B, Deloria-Knoll M, Dherani M, Eap T, Ebruke BE, Echavarria M, de Freitas Lázaro Emediato CC, Fasce RA, Feikin DR, Feng L, Gentile A, Gordon A, Goswami D, Goyet S, Groome M, Halasa N, Hirve S, Homaira N, Howie SRC, Jara J, Jroundi I, Kartasasmita CB, Khuri-Bulos N, Kotloff KL, Krishnan A, Libster R, Lopez O, Lucero MG, Lucion F, Lupisan SP, Marcone DN, McCracken JP, Mejia M, Moisi JC, Montgomery JM, Moore DP, Moraleta C, Moyes J, Munywoki P, Mutyara K, Nicol MP, Nokes DJ, Nymadawa P, da Costa Oliveira MT, Oshitani H, Pandey N, Paranhos-Baccalà G, Phillips LN, Picot VS,

- Rahman M, Rakoto-Andrianarivelo M, Rasmussen ZA, Rath BA, Robinson A, Romero C, Russomando G, Salimi V, Sawatwong P, Scheltema N, Schweiger B, Scott JAG, Seidenberg P, Shen K, Singleton R, Sotomayor V, Strand TA, Sutanto A, Sylla M, Tapia MD, Thamthitawat S, Thomas ED, Tokarz R, Turner C, Venter M, Waicharoen S, Wang J, Watthanaworawit W, Yoshida LM, Yu H, Zar HJ, Campbell H, Nair H; RSV Global Epidemiology Network. 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*. 2017 Sep 2;390(10098):946-958. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30938-8. Epub 2017 Jul 7. PMID: 28689664; PMCID: PMC5592248.
- 9- Acosta PL, Caballero MT, Polack FP. Brief History and Characterization of Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease. *Clin Vaccine Immunol*. 2015 Dec 16;23(3):189-95. doi: 10.1128/CVI.00609-15. PMID: 26677198; PMCID: PMC4783420.
- 10- Biagi C, Dondi A, Scarpini S, Rocca A, Vandini S, Poletti G, Lanari M. Current State and Challenges in Developing Respiratory Syncytial Virus Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2020 Nov 11;8(4):672. doi: 10.3390/vaccines8040672. PMID: 33187337; PMCID: PMC7711987.
- 11- Geoghegan S, Erviti A, Caballero MT, Vallone F, Zanone SM, Losada JV, Bianchi A, Acosta PL, Talarico LB, Ferretti A, Grimaldi LA, Sancilio A, Dueñas K, Sastre G, Rodriguez A, Ferrero F, Barboza E, Gago GF, Nocito C, Flamenco E, Perez AR, Rebec B, Ferolla FM, Libster R, Karron RA, Bergel E, Polack FP. Mortality due to Respiratory Syncytial Virus. Burden and Risk Factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Jan 1;195(1):96-103. doi: 10.1164/rccm.201603-0658OC. PMID: 27331632.
- 12- Collins PL, Fearn R, Graham BS. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;372:3-38. doi: 10.1007/978-3-642-38919-1\_1. PMID: 24362682; PMCID: PMC4794264.
- 13- Knipe, David M. (2013). *Paramyxoviridae*. En Collins, Peter L. y Karron, Ruth A., *Fields Virology* (6ta ed., Vol. 1, pp. 1098-1103). Lippincott Williams & Wilkins.
- 14- Aranda SS, Polack FP. Prevention of Pediatric Respiratory Syncytial Virus Lower Respiratory Tract Illness: Perspectives for the Next Decade. *Front Immunol*. 2019 May 7;10:1006. doi: 10.3389/fimmu.2019.01006. PMID: 31134078; PMCID: PMC6524688.
- 15- Garegnani L, Styrnisdóttir L, Roson Rodriguez P, Escobar Liquitay CM, Esteban I, Franco JV. Palivizumab for preventing severe respiratory syncytial virus (RSV) infection in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021 Nov 16;11(11):CD013757. doi:

- 10.1002/14651858.CD013757.pub2. PMID: 34783356; PMCID: PMC8594174.
- 16- Kempker-Russell, Mary Kay BSN, RN, MM, CRNA. FOCUS ON PREPARATION FOR RSV SEASON. *MCN, The American Journal of Maternal/Child Nursing* 24(5):p 226-229, September 1999.
- 17- Aguilera-Alonso D, Illán-Ramos M, Daoud Z, Guinea V, Culebras E, Ramos JT. Analysis of the impact of diagnostic virology tests on the use of antibiotics in paediatric inpatients with community-acquired pneumonia. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2020 May;38(5):230-233. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2019.08.008. Epub 2019 Oct 24. PMID: 31668863; PMCID: PMC7102621.
- 18- Soni A, Kabra SK, Lodha R. Respiratory Syncytial Virus Infection: An Update. *Indian J Pediatr*. 2023 Dec;90(12):1245-1253. doi: 10.1007/s12098-023-04613-w. Epub 2023 Jun 16. PMID: 37326948.
- 19- <https://www.argentina.gob.ar/noticias/la-anmat-autorizo-la-inscripcion-de-la-vacuna-contr-el-virus-sincicial-respiratorio>
- 20- Kampmann B, Madhi SA, Munjal I, Simões EAF, Pahud BA, Llapur C, Baker J, Pérez Marc G, Radley D, Shittu E, Glanternik J, Snaggs H, Baber J, Zachariah P, Barnabas SL, Fausett M, Adam T, Perreras N, Van Houten MA, Kantele A, Huang LM, Bont LJ, Otsuki T, Vargas SL, Gullam J, Tapiero B, Stein RT, Polack FP, Zar HJ, Staerke NB, Duron Padilla M, Richmond PC, Koury K, Schneider K, Kalinina EV, Cooper D, Jansen KU, Anderson AS, Swanson KA, Gruber WC, Gurtman A; MATISSE Study Group. Bivalent Prefusion F Vaccine in Pregnancy to Prevent RSV Illness in Infants. *N Engl J Med*. 2023 Apr 20;388(16):1451-1464. doi: 10.1056/NEJMoa2216480. Epub 2023 Apr 5. PMID: 37018474.
- 21- <https://www.argentina.gob.ar/noticias/anmat-autorizo-la-vacuna-para-personas-gestantes-contr-el-virus-sincicial-respiratorio>
- 22- <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/us-fda-approves-abrysvo-tm-pfizers-vaccine-prevention-0>
- 23- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 1990 Mar;28(3):495-503. doi: 10.1128/jcm.28.3.495-503.1990. PMID: 1691208; PMCID: PMC269651.
- 24- Fry AM, Chittaganpitch M, Baggett HC, Peret TC, Dare RK, Sawatwong P, Thamthitawat S, Areerat P, Sanasuttipun W, Fischer J, Maloney SA, Erdman DD, Olsen SJ. The burden of hospitalized lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in rural Thailand. *PLoS One*. 2010 Nov 30;5(11):e15098. doi: 10.1371/journal.pone.0015098. PMID: 21152047; PMCID: PMC2994907.

- 25- Mancini M, Karakuzu A, Cohen-Adad J, Cercignani M, Nichols TE, Stikov N. An interactive meta-analysis of MRI biomarkers of myelin. *Elife*. 2020 Oct 21;9:e61523. doi: 10.7554/eLife.61523. PMID: 33084576; PMCID: PMC7647401.
- 26- Papi A, Ison MG, Langley JM, Lee DG, Leroux-Roels I, Martinon-Torres F, Schwarz TF, van Zyl-Smit RN, Campora L, Dezutter N, de Schrevel N, Fissette L, David MP, Van der Wielen M, Kostanyan L, Hulstrøm V; AReSVi-006 Study Group. Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Protein Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med*. 2023 Feb 16;388(7):595-608. doi: 10.1056/NEJMoa2209604. PMID: 36791160.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Jm', is centered on a white background.