



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Tesinas de Grado

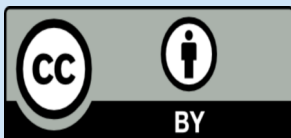
Albarracin, Leila Evelyn

Puesta a punto de un método multiplex RT-qPCR en tiempo real para la detección de virus respiratorios de importancia sanitaria

2024

Instituto de Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.

Atribución 4.0

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

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

Cita recomendada:

Albarracin, L. E. (2024). *Puesta a punto de un método multiplex RT-qPCR en tiempo real para la detección de virus respiratorios de importancia sanitaria* [Trabajo Final de Grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche].

<https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/2953>



“PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO
MULTIPLEX RT-qPCR EN TIEMPO REAL
PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS
RESPIRATORIOS DE IMPORTANCIA
SANITARIA”

Carrera: Bioquímica
Instituto de Ciencias de la Salud
Alumna: Albarracin, Leila Evelyn
Directora: Bqa. Diaz, Rosa Viviana
Co-Director: Dr. Castello, Alejandro
Fecha de entrega: 16/04/2024

Índice

Abreviaturas

1. Importancia del tema	4
2. Objetivos	6
3. Introducción general	6
4. Virus respiratorios	7
4.1 Influenza A e influenza B	7
4.1.1 Presentación clínica	7
4.1.2 Transmisión y epidemiología	7
4.1.3 Aspectos virológicos (estructura y ciclo de infección)	8
4.1.4 Prevención	11
4.2 Virus Respiratorio Sincicial	11
4.2.1 Presentación clínica	11
4.2.2 Transmisión y epidemiología	11
4.2.3 Aspectos virológicos (estructura y ciclo de infección)	12
4.2.4 Prevención	14
4.3 Rinovirus	15
4.3.1 Presentación clínica	15
4.3.2 Transmisión y epidemiología	15
4.3.3 Aspectos virológicos (estructura y ciclo de infección)	15
4.3.4 Prevención	17
4.4 SARS-CoV-2	17
4.4.1 Presentación clínica	17
4.4.2 Transmisión y epidemiología	18
4.4.3 Aspectos virológicos (estructura y ciclo de infección)	18
4.4.4 Prevención	20
5. Diagnostico	21

5.1	Diagnostico virológico	21
5.2	Métodos de detección	21
5.2.1	Inmunofluorescencia directa	21
5.2.2	RT-qPCR	22
6.	Materiales y métodos	22
7.	Desarrollo	27
7.1	Preparación de primers y probes	27
7.1.1	Diluciones de primers y probes	27
7.2	Extracción del material genético	27
7.2.1	Procedimiento TransGen	28
7.2.2	Procedimiento Zymo Research	29
7.3	Kit QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen: Reactivos	29
7.4	Kit QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen: Protocolo	30
7.5	Búsqueda y selección de material de referencia	33
7.6	Estrategia general de desarrollo de la multiplex en base a tres técnicas descriptas	33
8.	Resultados y discusión de resultados	34
8.1	Prueba de los primers para los virus de influenza	34
8.2	Prueba de combinaciones de primers y probes no descriptas	41
8.3	deteccion simultanea de los cinco virus blanco en formatos multiplex	51
9.	Conclusiones	55
10.	Fuentes de información y referencias bibliográficas	56

Abreviaturas

AD/ Agua d.: Agua destilada

ADN/DNA: Acido desoxiribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

C: Control

Ct/Cq: Cycle Threshold (Umbral del ciclo)

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

Flu A: influenza A

Flu B: influenza B

HMP: Hospital Mi Pueblo

HRV: Rinovirus

IF: inmunofluorescencia

IFD: inmunofluorescencia directa

IRA: infección respiratoria aguda

PBS: Phosphate-buffered saline/ Buffer fosfato salino

Pr: Primer

Pri-Pro: primers- probe

Rs: Reverse Short

RSV: Virus Respiratorio Sincicial

RT: Retrotranscriptasa

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

1. Importancia del tema

El brote por COVID-19 que inició en Wuhan, China, en diciembre de 2019 y se extendió rápidamente por todo el mundo, afectando a la mayoría de los países obligó a que estos tomaran medidas preventivas y de retención tales como el confinamiento estricto, el uso de barbijo o mascarilla, alcohol en gel, el constante lavado de manos y desinfección de superficies. Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), para el 26 de marzo de 2023 más de 761 millones de casos confirmados y más de 6,8 millones de muertes han sido reportados globalmente (<https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---30-march-2023>). En Argentina, el 20 de marzo de 2020, se anunció el inicio de la cuarentena obligatoria por un período de 15 días que luego se extendería a meses de confinamiento obligatorio y la necesidad de informar a los agentes de la salud ante la presencia de síntomas compatibles con la enfermedad por SARS-CoV-2. Para comienzos del 2021 empezaría la distensión del aislamiento social obligatorio dando lugar a lo que fue llamado distanciamiento social obligatorio y preventivo, permitiendo la interacción cercana entre personas durante los meses de verano, pero que poco a poco irían llevando a la relajación de las reglas de confinamiento. Según Mancini y colaboradores (Mancini et al., 2020) la circulación del virus continuó en tasas de incidencia decrecientes en varios países, hasta que, durante el verano la interacción entre individuos condujo a que en Europa se registre el resurgimiento de COVID-19. Dado que esta tendencia se sostendría en los meses fríos, seguramente no solo induciría un aumento de circulación del virus del COVID-19, sino también de otros virus respiratorios como el virus de la influenza (Flu). La presentación clínica de estos y otros virus respiratorios son muy similares, caracterizados con tos seca y fiebre principalmente lo que complica la correcta detección temprana del SARS-CoV-2 y, en general la caracterización temprana del agente. Esto a su vez complica la toma de decisiones terapéuticas y un correcto pronóstico y control de agentes.

A fin de contener la epidemia se impulsó el uso masivo de RTqPCR para la detección y cuantificación de la carga viral a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos. Esta emergencia sanitaria mundial, además, obligó al desarrollo de métodos de testeo rápido para la detección de SARS-CoV-2. A partir de fines del 2021, con el comienzo de la co-circulación de varios virus respiratorios se hizo evidente la necesidad del desarrollo de métodos que

permitieran la detección simultánea de varios de ellos simultáneamente y se iniciaron estudios en el que se impulsa a los países a registrar datos de aquellos pacientes co-infectados. En particular se diseñaron versiones multiplex de las RT-qPCR, por ejemplo, en el trabajo de Mancini, utilizado como base para el presente proyecto se utilizan dos mezclas diferentes para la detección de SARS-CoV-2 y los virus de la influenza A y B (Flu A y Flu B) humana. Se usaron 3 dianas genéticas para cada reacción de mezcla y sondas marcadas con fluoróforos compatibles con instrumentos de PCR en tiempo real (Mancini et al., 2020).

En el contexto del siguiente proyecto se va a intentar extender el rango de virus detectados combinando el desarrollo de Mancini con técnicas para la detección de otros dos patógenos respiratorios. En particular se trabajará en el estudio de la compatibilidad del desarrollo de Mancini con sus primer y probe con los correspondientes a las real time PCRs para rinovirus (HRV) de Marcone y colaboradores (Marcone et al., 2012) y la de Fry y colaboradores para virus sincicial respiratorio (Fry et al., 2010).

La PCR en tiempo real es una técnica sumamente útil para la detección de patógenos en muestras clínicas y ha encontrado gran número de aplicaciones en virología diagnóstica (Mackay et al., 2002). La PCR en tiempo real multiplex presenta la ventaja de poder detectar de manera rápida y simultánea varios virus respiratorios usando equipos que trabajen con varios canales de excitación/detección. La PCR en tiempo real es una metodología adecuada para su utilización en el laboratorio bioquímico por su rapidez y sensibilidad. Desde principios de 2020 tanto el gobierno nacional como los gobiernos provinciales y/o locales realizaron 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 COVID-19 lo que permitió un avance en capacitación de recursos humanos e incorporación de equipamiento en varios hospitales. En este contexto consideramos que la introducción de procedimientos que permitan utilizar la metodología de real time PCR para la detección simultánea de SARS-CoV-2 junto con varios otros virus causantes de infecciones respiratorias severas es muy oportuna.

2. Objetivos

1. Optimizar la extracción de RNA de virus envueltos y no envueltos a partir de las muestras de hisopados nasofaríngeos para su utilización en reacciones de RT-qPCR
2. Puesta a punto de distintas combinaciones qPCR Multiplex con transcripción reversa previa, capaz de detectar SARS-CoV-2, RVS, Flu A y B y HRV.
3. Comparación de los desempeños de la multiplex con las reacciones ,monoplex en cuanto a ciclos de umbral (Ct)

3. Introducción general

La infección respiratoria aguda (IRA), provoca una elevada morbimortalidad en niños y adultos (principalmente mayores de 65 años), y en los casos de pacientes con problemas inmunológicos o con enfermedad de base suele producir casos fatales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que un 20% de las muertes de niños menores de 5 años se debe a afecciones respiratorias agudas del tracto respiratorio inferior, como bronquiolitis, bronquitis o neumonía <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/3147>. La IRA puede ser causada por diversos agentes como virus, bacterias, hongos e incluso parásitos, de los cuales los dos primeros son los más frecuentes y dentro de los virus los más comunes son Flu A y Flu B, Parainfluenza 1, 2 y 3, Metapneumovirus, Adenovirus, RSV, HRV, Coronavirus y Bocavirus (Treanor, 2017). En la población general las infecciones respiratorias de origen viral son muy frecuentes generando altos costos en el sistema de salud, costos sociales y ausentismo escolar y laboral (Monto & Sullivan, 1993).

El diagnóstico virológico es necesario para determinar la etiología de las IRAs, ya que los cuadros clínicos producidos por los distintos virus suelen ser similares pero el pronóstico no es necesariamente igual para todos ellos. Es importante también resaltar que el diagnóstico específico del origen viral de la patología permite restringir el uso innecesario de antibióticos y ofrecer alternativas terapéuticas específicas si el caso lo amerita y la identificación es temprana (Krause et al., 2014). Finalmente, pero no menos importante es la posibilidad de clarificar la importancia epidemiológica y los grupos poblacionales afectados por cada agente viral. Esta información es clave para evaluar intervenciones sanitarias de control, por ejemplo, la vacunación y su población blanco.

4. Virus respiratorios

4.1 Influenza A y B

4.1.1 Presentación clínica

Las consecuencias clínicas de la infección por estos dos agentes pueden ir desde el resfrió común a una neumonía, por lo que las necesidades terapéuticas pueden ser desde nulas hasta el requerimiento de asistencia respiratoria mecánica. En casos intermedios en los que se manifiesta hipoxia, también se requiere internación para la administración de aire enriquecido en oxígeno. Existe la posibilidad, en casos específicos de tratamiento con antivirales como el Oseltamivir (Tamiflu), que es un inhibidor de la neuraminidasa y requiere instauración del tratamiento precozmente (dentro de las 12 horas del inicio de los síntomas) para que sea de utilidad. Está indicado en caso de adultos, niños y bebés (mayores de 2 semanas de edad) que han tenido síntomas de gripe. También se indica en adultos y niños (mayores de 1 año de edad), si han entrado en contacto estrecho con alguien que tiene gripe o cuando hay un brote de gripe. (Hayden, 2017)

4.1.2 Transmisión y epidemiología

La transmisión ocurre de persona a persona por vía aérea, mediante aerosoles expulsados al toser, estornudar o hablar. También por autoinoculación en mucosa ocular o respiratoria con las propias manos contaminadas luego de contacto de las mismas con superficies y objetos portando virus (fómites). Este virus contaminante de superficies es generalmente originado en microgotas respiratorias expelidas por un individuo infectado al toser, estornudar o simplemente hablar en casos de picos de excreción viral.

Flu suele causar epidemias anuales de enfermedad respiratoria febril en regiones templadas, suele presentarse en meses fríos (mayo a septiembre). El inicio rápido y la diseminación de la infección son característicos de la Flu epidémica. Esto se refiere a un corto periodo de incubación promedio de 2 días y varía de 1 a 5 días, con alta carga viral en las secreciones respiratorias. Sus reservorios son distintos tipos de aves migratorias y algunos mamíferos acuáticos, es un virus que puede producir, con ciertas limitaciones, infecciones inter-especie. Algunas de estas transmisiones interespecie, tanto en animales como humanos tienen alta

probabilidad de mortalidad. Flu produce mayores consecuencias patológicas en los grupos etarios extremos, en personas con enfermedad cardio-pulmonar previa y en embarazadas. La mortalidad general es baja (~0,01%) para los virus de Flu humanos de circulación endemo-epidémica, pero la probabilidad de mortalidad aumenta en mayores de 85 años y en enfermedad cardiopulmonar.

Las infecciones con la cepa epidémica son más comunes en edad escolar, las hospitalizaciones son comunes en niños pequeños y adultos mayores (virus estacional). (Hayden, 2017)

4.1.3 Aspectos virológicos (estructura y ciclo de infección)

Los virus de Flu pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, género *Alphainfluenzavirus*, especies *Alphainfluenzavirus influenzae* y *Betainfluenzavirus influenzae* (denominación formal de los clásicamente llamados virus de influenza A y B, https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202203955&taxon_name=Alphainfluenzavirus). Son virus de la clase V de Baltimore que se caracterizan por un genoma de ARN segmentado (8 segmentos), lineal y monocatenario de sentido negativo. Estos virus replican en el núcleo celular, a diferencia de otros virus con genoma ARN que replican en citoplasma. Estructuralmente, son virus con envoltura lipídica que contiene dos proteínas de transmembrana, las glicoproteínas HA (hemaglutinina) y NA (neuraminidasa), y un pequeño número de proteína M2 o proteína de poro presentes en Flu A, (acidifica el interior en el momento de la entrada viral). Hacia el interior de la membrana se encuentra la proteína de matriz M1 y los ocho segmentos de RNA en complejo helicoidal con la proteína NP formando las ocho nucleocápsides cada una de las cuales incluye un conjunto de tres proteínas: PA, PB1 y PB2 que constituyen el aparato de replicación. La HA se halla como trímero con una porción globular hidrófila expuesta hacia el exterior del virus con sitios de unión para residuos de ácido siálico, el receptor sobre las células huésped. Esta proteína HA tiene función de adherencia, permite la fusión de membranas y la entrada. La NA tiene una función enzimática, es un tetrámero que está anclado en la envoltura lipídica y tiene como finalidad ayudar al virus a liberarse de las células infectadas para propagarse a otras células. Los virus de la Flu A y B, tienen, como se mencionó ocho segmentos de RNA que pueden codificar al menos 11 proteínas distintas.

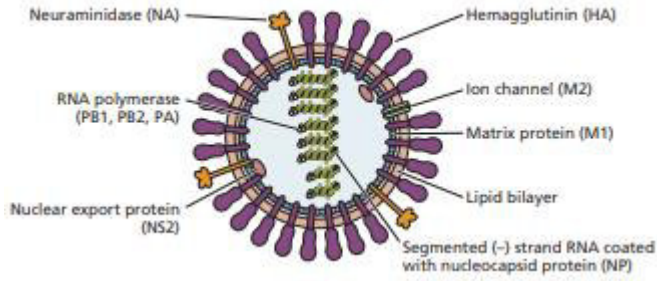


Figura 1. Esquema de la estructura del virus de influenza (imagen tomada de Flint, 2020).

En el ciclo de infección, el virus de Flu ingresa a la célula mediante la interacción de la proteína HA viral con los receptores de ácido siálico en la superficie celular (Fig. 2).

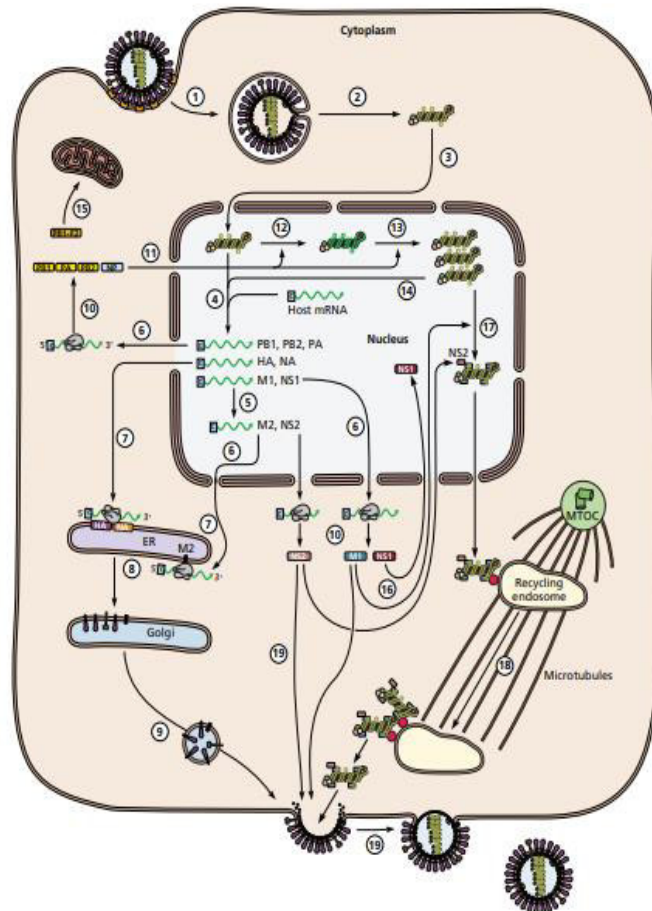


Figura 2. Replicación general del virus de influenza (imagen tomada de Flint, 2020).

Una vez que la HA se unió a los receptores de la superficie celular, se produce la adhesión y el disparo de la endocitosis mediada por receptor en una vesícula endocítica que se fusiona con endosomas. La acidificación posterior de la vesícula dispara un cambio conformacional de la proteína HA reorientando un péptido desde una posición en el interior de proteína hacia la membrana insertándose en la misma. Estos cambios se producen por un primer reordenamiento de repeticiones de héptadas aminoacídicas que es seguido por otro cambio conformacional similar que achica la distancia entre las membranas (2 cambios conformacionales sucesivos) y se produce la fusión de membranas viral y endosomal. Producto de la bajada del pH en los endosomas el canal iónico de la membrana viral, compuesto por polipéptidos M2 o también denominada proteína de poro, también se activa permitiendo la acidificación del interior del virión. Este proceso da como resultado un influjo de protones hacia el virión, que induce el cese de la interacción entre la proteína de matriz M1 y las NP facilitando la liberación de las nucleocápsides al citoplasma (desnudamiento). Los segmentos de RNA de la partícula viral entrante, permanecen asociados con la proteína viral durante todo el proceso de desnudamiento e ingresan al núcleo como complejo ribonucleoprotéico (RNP) a través del complejo de poros nucleares.

Después de que el genoma viral se desnuda y se transporta la RNP al núcleo, tiene lugar la transcripción y replicación en el núcleo, donde se sintetiza el ARNm viral que se exporta al citoplasma para su traducción, luego algunas de las proteínas recién sintetizadas migran desde su sitio de síntesis en el citoplasma al núcleo (ver figura 2).

Para la formación de viriones infecciosos, entran en juego varios compartimentos celulares. Las proteínas P y NP tienen señales de localización nuclear, donde se asocian con los RNA virales para formar RNP. La exportación nuclear de estas RNP depende críticamente de la presencia de la proteína M1 y la proteína de exportación nuclear (NEP). Una vez dada la exportación de las RNP al citoplasma, se ensamblan en la membrana citoplasmática, donde M1 juega un papel fundamental en el ensamblaje y gemación de virus infecciosos. Las partículas de virus brotan de la membrana citoplasmática gracias a la NA, que cliva ácidos siálicos en la membrana que está brotando y esto libera partículas maduras (Dimmock et al., 2007)

4.1.4 Prevención

El Calendario Nacional de Vacunación incluye la vacuna antigripal para los siguientes grupos: Personal de salud, mayores de 65 años, personal estratégico y personas de entre 2 a 64 años con factores de riesgo (dosis anual), personas menores de entre 6 a 24 meses (2 dosis), gestantes (en cualquier momento del embarazo), puérperas (antes del egreso de la maternidad, máximo 10 días después del parto si no la recibieron durante la gestación).

<https://www.argentina.gob.ar/salud/vacunas/antigripal>

4.2 Virus Respiratorio Sincicial

4.2.1 Presentación Clínica

Puede ir desde infecciones leves del tracto respiratorio superior donde el tratamiento es sintomático, hasta presentaciones graves, con afectación del tracto respiratorio inferior, que requieren hospitalizaciones y asistencia respiratoria mecánica pudiendo generar casos fatales (Borchers et al., 2013). La infección por RSV es la causa más común de hospitalización en el primer año de vida, generalmente por bronquiolitis y, en ocasiones, neumonías (Borchers et al., 2013). En niños mayores y adultos la infección causa frecuentemente resfrío común suave. En adultos mayores e inmunocomprometidos la infección por RSV da lugar a infecciones bajas y casos severos de una elevada morbilidad y mortalidad (Ali et al., 2020).

4.2.2 Transmisión y epidemiología

Se transmiten a través de secreciones respiratorias por contacto directo mediante la propagación de grandes gotas o mediante fómites. La entrada probablemente se produce a través del contacto con la mucosa nasal o los ojos, a diferencia de la vía oral, menos permisiva. La transmisión por aerosoles de pequeñas partículas del RSV no ha sido demostrada y, si se produce, es una vía poco frecuente. Un hermano en edad preescolar o escolar es la fuente más probable de RSV. Puede producir infecciones nosocomiales que contribuyen a una morbilidad y mortalidad significativas en las salas de pediatría, e involucrar a los trabajadores de salud y a los pacientes como fuentes y transmisores de enfermedades. (Williams, 2017)

Causa epidemias anualmente desde otoño tardío a primavera. Afecta a todos los grupos etarios pero la primoinfección que ocurre en los primeros dos años de vida está asociada a enfermedad severa (bronquiolitis y neumonía). Solo en pediatría se estima un costo médico de 5.400 millones de dólares (Zhang et al., 2020), y se calcula una tasa de mortalidad anual de infantes mayor de 118.000, ocurriendo el 99% de las muertes en países en vías de desarrollo (Shi et al., 2017).

4.2.3 Aspectos virológicos (estructura y ciclo de infección)

El virus respiratorio humano (nombre clásico), según clasificación ICTV pertenece a la familia *Pneumoviridae*, género *Orthopneumovirus*, especie *Orthopneumovirus hominis*. Pertenece a la clase V de Baltimore siendo su genoma de RNA monocatenario unimolecular de sentido negativo.

Como puede observarse en la figura 3, el RSV es un virus envuelto por una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática del huésped con una proteína de matriz (M) ubicada en la cara interna de la envoltura. La proteína NP rodea al RNA en una estructura helicoidal a la cual se agrega un complejo polimerasa formado por las proteínas L y P. En la envoltura lipídica se encuentran las glicoproteínas de superficie G (ligando del receptor celular), F (proteína de fusión).

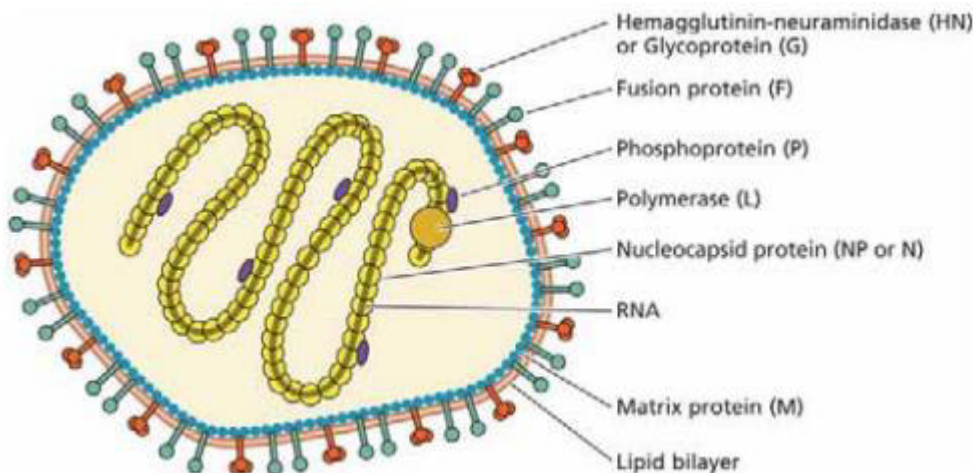


Figura 3. Estructura del RSV (imagen tomada de Richman, 2017).

La entrada del virus a la célula huésped puede desarrollarse por dos mecanismos: por fusión a nivel de membrana plasmática, o por endocitosis mediada por clatrina y posterior fusión a nivel endosomal (Srinivasakumar et al., 1991). En la fusión de las membranas participan las

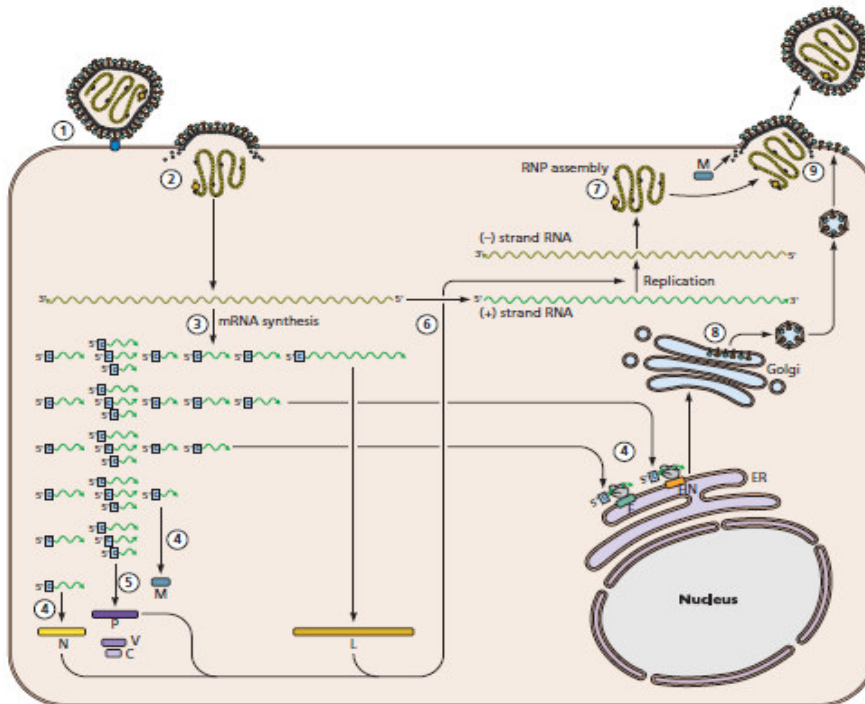


Figura 4. Ciclo replicativo del RSV (imagen tomada de Flint, 2020).

proteínas F y G, la glicoproteína G interacciona con glicosaminoglucanos de las superficies celulares que contengan proteoglicanos de heparán sulfato. Los cambios conformacionales que ocasiona esta interacción conllevan a que la proteína F reoriente un péptido de fusión que se inserta en la membrana de la célula huésped para posteriormente inducir la fusión de membranas. En un estadio posterior de la infección las proteínas G y P expresadas en membrana plasmática dan lugar a la formación de sincitios por fusión de células colindantes.

En la entrada por endocitosis mediada por clatrina, cuando la partícula viral es endocitada, ocurre también la fusión de membranas mediada por G y F pero en este caso, la fusión de la membrana viral ocurre con la membrana endosomal (Borchers et al., 2013), (Williams, 2017). Estos procesos conducen al desnudamiento del material genético rodeado de su nucleocápside y complejo polimerasa en el citoplasma, donde, a continuación, se produce la transcripción de mRNAs y la replicación del genoma. La cadena de sentido negativo actúa

como molde para la síntesis de RNA de polaridad positiva, que actúa como RNA mensajero para la producción de proteínas, y como molde para la síntesis de RNA de polaridad negativa. Las proteínas G y F se sintetizan en RE y se ubican en membrana plasmática junto con la proteína M, las proteínas N, P y L se ensamblan con el RNA negativo en citoplasma y las nucleocápsides migran a la misma zona de la membrana plasmática liberándose partículas virales por gemación (Williams, 2017) (Fig. 4).

4.2.4 Prevención

Para los niños con alto riesgo de enfermedad severa por RSV, existe una terapia preventiva basada en un 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 RSV y va dirigido a niños con alto riesgo debido a comorbilidades como displasia broncopulmonar, cardiopatía congénita o prematuros. Se administra una dosis de 15 mg/kg una vez al mes (máximo cinco dosis) en niños de 0 a 24 meses (Garegnani et al., 2021),(Russell, 1999)

En el año 2023 para la prevención de la enfermedad del tracto respiratorio inferior en adultos mayores de 60 años, la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) aprobó vacunas para el RSV para mayores de 60 años, estas son Arexvy (GSK) y Abrysvo (Pfizer), donde Abrysvo fue autorizada por ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica). (Aguilera-Alonso et al., 2020), (Soni et al., 2023), (<https://www.argentina.gob.ar/noticias/la-anmat-autorizo-la-inscripcion-de-la-vacuna-contra-el-virus-sincicial-respiratorio>).

Para embarazadas, entre la 32 y 36 semana de gestación se aprobó en 2023 por la FDA y ANMAT una vacuna de una única dosis, Abrysvo de Pfizer, que se administra en la temporada del VRS, tiene una gran ventaja, ya que protege mediante el pasaje de anticuerpos por placenta al bebe 6 meses post nacimiento.(Kampmann et al., 2023), (<https://www.argentina.gob.ar/noticias/anmat-autorizo-la-vacuna-para-personas-gestantes-contra-el-virus-sincicial-respiratorio>), (<https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/us-fda-approves-abrysvotm-pfizers-vaccine-prevention-0>).

4.3 Rinovirus

4.3.1 Presentación Clínica

La mayoría de las infecciones son asintomáticas y limitadas al tracto superior, pero puede afectar al tracto respiratorio inferior bajo que incluye exacerbación del asma y enfermedad obstructiva crónica y bronquiolitis y neumonía en ancianos e inmunocomprometidos (Esneau et al., 2022). El tratamiento suele ser sintomático para los casos leves, y en los casos graves se requiere administración de aire enriquecido en oxígeno y asistencia respiratoria mecánica. (Lee, 2017)

4.3.2 Transmisión y Epidemiología

HRV se transmite por inoculación del virus en la mucosa nasal o la conjuntiva. En este último caso el transporte por el conducto lagrimal conduce a su depósito en la nasofaringe. La entrada a la mucosa nasal puede ocurrir mediante aerosoles producidos por tos o estornudos o por contacto directo mediante partículas grandes. El contacto con los dedos contaminados transfiere el virus a la piel del individuo receptor donde puede permanecer viable por horas. Una vez contaminadas las yemas de los dedos del receptor, la infección se induce fácilmente mediante la autoinoculación de la mucosa nasal al frotarse la nariz o los ojos.

El papel de los fómites en la transmisión de virus es menor, pero es posible, ya que el virus es viable algunas horas en superficies (Lee, 2017).

4.3.3 Aspectos Viroológicos (estructura y ciclo de infección)

Pertenece al orden de los *picornavirales*, familia *picornaviridae* género *enterovirus*. Es un virus que se encuentra dentro de la clasificación IV de Baltimore, el genoma del picornavirus es RNA monocatenario de sentido positivo (ssRNA (+)), y son virus no envueltos. (Lee, 2017)

El virión se conforma de una capa de proteínas, y el genoma se encuentra en una posición central de una cubierta proteica conocida como cápside.

Esta cápside está compuesta por cuatro proteínas virales: VP1, VP2, VP3, VP4 organizadas en protómeros que consisten en 12 pentámeros que, a su vez, se arman como icosaedro. Alrededor de cada uno de los vértices de simetría quintuple de este icosaedro hay una

depresión o “cañón” prominente en VP1, estos cañones son los sitios de unión de los receptores ICAM-1. (Lee, 2017) (Richman et al., 2017)

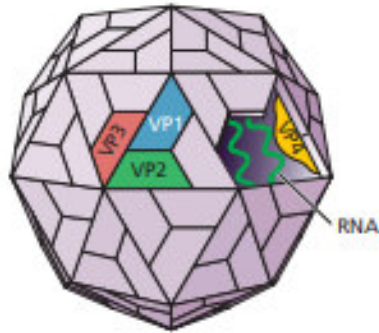


Figura 5. Estructura de un HRV humano (imagen tomada de Flint, 2020).

Las moléculas ICAM-1 presente en los endotelios funciona como receptor para el HRV. Cuando el cañón interacciona con estos receptores se producen cambios conformacionales en las proteínas de la cápside, en particular, la VP1 se reorganiza extendiéndose hacia la membrana y formando un poro por donde el RNA pasa hacia la célula. Estos procesos se dan en endosomas tempranos producidos por endocitosis mediada por clatrina, una vez dentro del endosoma y gracias a la disminución de pH ocurren los cambios conformacionales y el desnudamiento del genomas. Una vez en citoplasma, este genoma RNA de cadena simple polaridad positiva es traducido directamente por ribosomas celulares para formar proteínas virales. (Dimmock et al., 2007)

Durante la replicación, el RNA viral se copia inicialmente a cadenas complementarias negativas, que sirven como molde para la síntesis de nuevas cadenas positivas (replicación) y el RNA mensajero, proceso mediado por la polimerasa viral. Estos RNAm son simultáneamente traducidos para formar una gran poliproteína que es clivada generando las proteínas estructurales y no estructurales por actividad proteolítica contenida en estas mismas secuencias proteicas. Luego ocurre el ensamblaje y finalmente, las partículas virales se liberan mediante la desintegración de la célula huésped (proceso lítico).

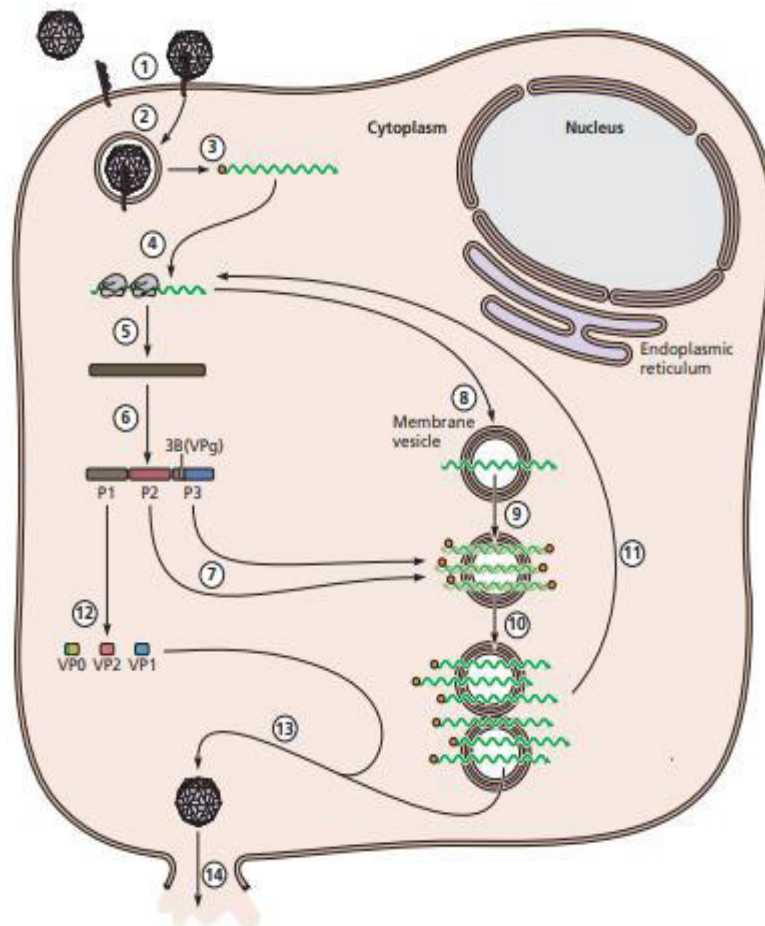


Figura 6. Ciclo de infección HRV (imagen tomada de Flint, 2020).

4.3.4 Prevención

No existe vacuna para HRV, debido a que al tener más de cien serotipos es difícil desarrollar estos métodos de prevención.

4.4 SARS-CoV-2

4.4.1 Presentación Clínica

El SARS-CoV-2 es actualmente causa de enfermedad respiratoria leve en la mayoría de los casos, afectando mayormente tracto superior pero ocasionalmente se lo encuentra en neumonías y enfermedad severa multiórgano, afecta a todas las edades y puede ser grave en

ancianos y personas con enfermedades debilitantes o susceptibilidad especial. La enfermedad grave se desarrolla lentamente con síntomas iniciales inespecíficos y agravamiento en la segunda semana de la infección. Aunque existen infecciones asintomáticas, la mayoría de los pacientes presentan enfermedad respiratoria de leve a moderada, experimentando tos, fiebre, cefalea, mialgias y diarrea (Lamers & Haagmans, 2022). La enfermedad grave generalmente comienza aproximadamente 1 semana después de la aparición de síntomas. El síntoma más común de la enfermedad grave es la disnea (dificultad para respirar), que es una consecuencia de la hipoxemia. Poco después del inicio de la disnea e hipoxemia, se desarrolla insuficiencia respiratoria progresiva en pacientes con COVID-19 grave (Lamers & Haagmans, 2022). El tratamiento suele ser sintomático en casos leves como de resfrió común, o requiere administración de oxígeno suplementario y/o asistencia respiratoria mecánica en el peor de los casos donde hay un compromiso respiratorio severo. Cuando el paciente está internado y dependiendo de la severidad y progreso pueden estar indicados los corticoides como la dexametasona o incluso antivirales específicos (<https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>).

4.4.2 Transmisión y Epidemiología

SARS-CoV-2 se transmite a través de gotitas respiratorias y aerosoles generados al hablar, gritar, toser o estornudar, siendo el período medio de incubación de 4-5 días antes del inicio de los síntomas (Lauer et al., 2020). También es posible la transmisión al entrar en contacto con fómites contaminadas con gotas de secreción respiratoria, o entrar en contacto directo persona-persona. Es un virus que suele causar brotes a nivel nosocomial. La propagación pandémica del SARS-CoV-2 se vio favorecida por la alta transmisibilidad y la transmisión eficiente a partir de asintomáticos, lo cual justifica el uso de barbijo y el aislamiento social y preventivo de ser necesario (https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/333390/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-Transmission_modes-2020.3-spa.pdf).

4.4.3 Aspectos Viroológicos (estructura y ciclo de infección)

El SARS-Cov-2 es una especie que pertenece al orden *nidovirales*, familia *coronaviridae*, género betacoronavirus, es un virus clase IV de Baltimore, su genoma es RNA monocatenario

de polaridad positiva. Los viriones son partículas redondas, envueltas con la glicoproteína S en superficie que es una proteína que media la unión a receptor y fusión de membranas con la célula huésped. La proteína S se agrega en trímeros para formar los peplómeros característicos del virus. Algunos miembros de los betacoronavirus, contienen una proteína de envoltura más corta, llamada hemaglutinina esterasa (HE), que tiene un rol importante en la liberación de virus de células infectadas.

En la membrana de la partícula viral se encuentra también la proteína M y la proteína E, la proteína M que juega un rol importante en el ensamblaje del virus interactuando con el complejo RNA-nucleoproteína en la maduración de la partícula. El RNA se encuentra rodeado y estabilizado por la nucleoproteína N.

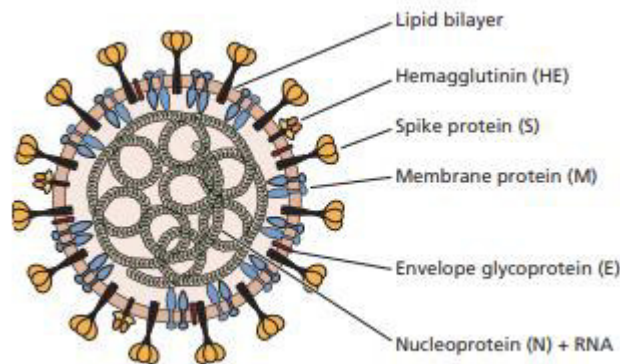


Figura 7. Estructura del SARS-CoV-2 (imagen tomada de Flint,2020)

En la infección la proteína S viral se une a las células a través de su receptor, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), para posteriormente mediar la entrada de la ribonucleoproteína viral mediante la fusión de las membranas virales en la superficie celular o en endosomas generados mediante endocitosis mediada por clatrina. Una vez en el citoplasma, el RNA viral se encuentra con los ribosomas del huésped, y es traducido para producir proteínas virales, entre ellas la RNA polimerasa. Esta enzima ayuda a crear una copia en sentido negativo del genoma completo y también un conjunto de RNAs de cadena negativa anidados a partir del RNA genómico. Estos RNA de polaridad negativa sirven como molde para la síntesis de los RNA mensajeros.

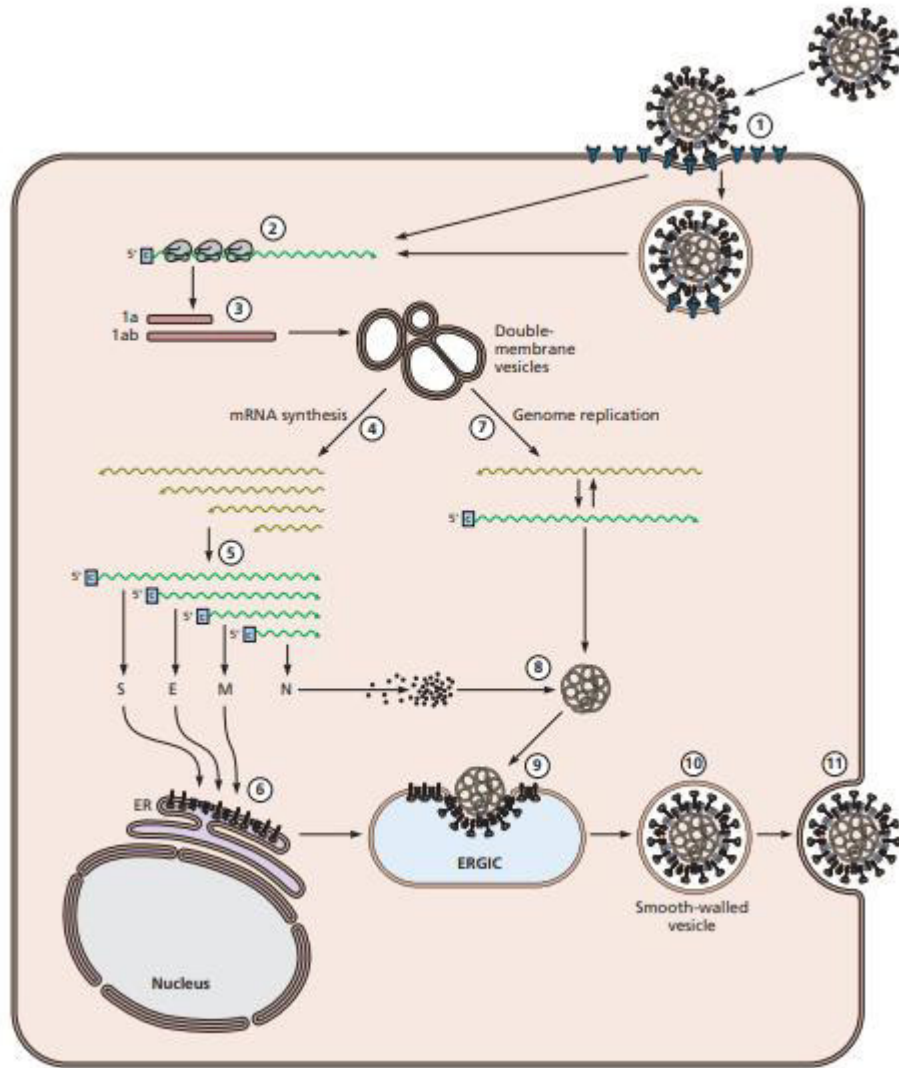


Figura 8. Ciclo de infección SARS-CoV-2 (imagen tomada de Flint, 2020).

Los RNA genómicos y proteínas estructurales serán empaquetados en los nuevos viriones que se acumulan en grandes cantidades en vesículas citoplasmáticas. La fusión de estas vesículas con la membrana plasmática libera finalmente los virus al exterior (Peiris, 2017)

4.4.4 Prevención

Al momento hay 3 tipos principales de vacunas, a virus inactivado (Sinopharm), a vector viral (Sputnik V, AztraZeneca, CanSino), a RNAm (Pfizer-BioNTech, Moderna).

<https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2021-10/caracteristicas-de-las-vacunas-contra-la-COVID19-disponibles-en-argentina.pdf>

5. Diagnostico

5.1 Diagnóstico virológico

Poder establecer un diagnóstico virológico de manera rápida y concreta es muy importante para reducir el uso inadecuado de antimicrobianos, reducir el número y tiempo de hospitalizaciones, para la administración de un tratamiento adecuado, e implementar medidas de control adecuadas para el virus en circulación (Aguilera-Alonso et al., 2020).

5.2 Métodos de detección

5.2.1 Inmunofluorescencia directa

El laboratorio juega un rol importante para el diagnóstico definitivo del agente viral en cuestión, dentro de los métodos de diagnóstico virológico, están los directos que se basan en la detección del antígeno, o indirectos, donde se detecta presencia de anticuerpos generados por la presencia del agente viral. En el caso de la inmunofluorescencia directa, se realiza una inmunomarcación a células epiteliales del tracto respiratorio que están adheridas a un portaobjetos, con un anticuerpo monoclonal que se encuentra marcado con un fluorocromo, el isotiocianato de fluoresceína es el más usado. Se lo incuba y posteriormente se lava para eliminar anticuerpo monoclonal no unido y se visualiza en el microscopio de fluorescencia (Treanor, 2017) (Keneth & Weaver, 2017)

La gran mayoría de los laboratorios cuentan con la inmunofluorescencia (IF), por lo cual es una buena alternativa para identificación de muchos virus respiratorios (Atmar, 2010), sin embargo, cabe resaltar que no es posible el diagnóstico de los HRV por IF, dado que al tener más de 100 serotipos es imposible contar con un panel que me permita identificarlo (Atmar, 2010)

5.2.2 RT-qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción inversa, permite detectar y cuantificar moléculas de RNA. En esta metodología gracias a la enzima transcriptasa inversa, las moléculas de RNA se transcriben a DNA complementario (DNAc), donde luego este DNAc se usa como molde para la reacción de PCR, y el producto de amplificación se mide mediante una señal de fluorescencia que se incrementa en cada ciclo de PCR por distintas estrategias (Mackay et al., 2002). La instrumentación del equipo en tiempo real permite monitorear la señal durante cada ciclo térmico. En nuestra metodología empleamos el formato tipo TaqMan, que agrega a la reacción una sonda o probe que une específicamente en la zona amplificada por la PCR. Esta sonda tiene un fluoróforo unido covalentemente en el extremo 5' y una molécula apantalladora que absorbe en la misma longitud de onda en la que emite el fluoróforo en el extremo 3'. De esta forma el apantallador o quencher absorbe la fluorescencia liberada por el fluoróforo mientras la sonda esté intacta por estar las dos moléculas cercanas entre sí. Durante la extensión del cebador en la PCR, la enzima DNA polimerasa (Taq Pol) degrada la sonda separando así fluoróforo y quencher permitiendo, por lo tanto, que el fluoróforo indicador emita la señal de fluorescencia. (Atmar, 2010)

6. Materiales y métodos

Muestras: Para SARS-CoV-2 se contó con muestras de hisopados nasofaríngeos almacenadas a -20°C que correspondían a enero del año 2022. Las muestras fueron originalmente obtenidas en centros de salud y remitidas a la Unidad COVID-19 de la Universidad Nacional de Quilmes con fines de diagnóstico. Se trabajo con una selección de muestras que resultaron positivas para el virus identificadas por un código numérico sin posibilidad de cruzar información sobre la identidad del paciente (anonimizadas). Estas muestras fueron procesadas en la Unidad Covid-19 por RT-qPCR (Corman et al., 2020).

Para Flu A y B, HRV y RSV se contó con muestras de hisopados nasofaríngeos remitidas por el Laboratorio del Hospital Mi Pueblo de Florencio Varela obtenidas entre fines del 2021 hasta el pico de incidencia de la patología respiratoria en julio-septiembre de 2022 en la sala de pediatría de dicho hospital, también se contó con muestras de Flu A, obtenidas en febrero-marzo del año 2023, y muestras de HRV obtenidas en mayo-junio del año 2023. Estas

muestras fueron previamente analizadas por el Laboratorio del Hospital Mi Pueblo para detectar la presencia de los ocho virus respiratorios incluidos en la rutina: RSV, Flu A y B, Parainfluenza 1, 2 y 3, metapneumovirus y adenovirus. El kit empleado es el kit *D³ Ultra 8TM DFA Respiratory Virus Screening & Identification*, que permite la identificación de 8 virus respiratorios a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos por inmunofluorescencia directa. El kit consta de reactivos donde por un lado tenemos un vial que integra los 8 anticuerpos marcados, y otro vial de anticuerpo monoclonal individual para cada virus, para posteriormente hacer la identificación.

Un subgrupo de las muestras de RSV fueron previamente procesadas por la misma técnica de RT-qPCR utilizada en este trabajo, pero en formato monoplex (Fry et al., 2010) en un trabajo final previo (Melisa Herasimiuk. Trabajo Final, Bioquímica, UNAJ “Puesta a punto de un método de RT-PCR en tiempo real para la detección de Virus Sincicial Respiratorio (VSR) y comparación con métodos de rutina en el laboratorio bioquímico” 2/6/2023). La identificación de las muestras con los correspondientes valores de Ct obtenidos en ese trabajo son mostrados en la tabla 1.

Sample	Contenido	Fluor	Cq
R00002	RSV	FAM	34.57
R00004	RSV	FAM	28.46
R00005	RSV	FAM	30.34
R00009	RSV	FAM	N/A
R00010	RSV	FAM	25.79
R00018	RSV	FAM	32.82
R00041	RSV	FAM	30.12
R00057	RSV	FAM	36.16
R00062	RSV	FAM	32.47
R00081	RSV	FAM	27.47
R00133	RSV	FAM	N/A
R00017	RSV	FAM	24.50
Control +			

Tabla 1. Valores de Ct RSV en formato monoplex.

En el caso de los HRV , se trabajó con muestras identificadas como positivas por RT-qPCR en formato monoplex (Marccone et al., 2012) en un trabajo final en curso (Jesús Villanueva. Trabajo Final Bioquímica, “Determinación de la incidencia de los rinovirus en niños internados con patología respiratoria severa en el Hospital Mi Pueblo de Florencio Varela”). En todos los casos se trabajó con una selección de muestras que resultaron positivas y negativas por las técnicas mencionadas para los cinco virus. La identificación de los especímenes se realizó por medio de un código numérico generado exclusivamente para este trabajo adjuntando solo la información sobre el resultado sin posibilidad de cruzar información sobre la identidad del paciente (anonimizadas).

Controles: Para este ensayo, se utilizaron distintos tipos de controles

- Controles positivos de genoma viral: confeccionados en base muestras positivas con buenas señales de IFD o Cts bajos según el caso (Ej.: para SARS-CoV-2, muestra R00308), para RSV muestra R00017), que fueron diluidas apropiadamente en PBS estéril para que generen un Ct de 30 aproximadamente. Estos controles se alicuotaron en volúmenes individuales adecuados para un procesamiento y se almacenaron a -20°C.
- Control negativo: de rutina se utilizó un volumen igual al de la muestra de agua destilada y, preliminarmente, muestras negativas para verificar especificidad.
- Controles del proceso: para controlar el proceso se utilizaron dos tipos de controles: 1) Control exógeno de RNA provisto en el kit QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen, este control permite evaluar mediante primers y sonda (Cy5) incluidos en la mix de reacción el potencial inhibitorio de las muestras sobre los procesos enzimáticos de detección y el funcionamiento correcto de los reactivos. 2) Control endógeno, en este caso se trata de primers y probes para la RNasa P celular que permite evaluar la calidad de la toma de muestra al indicar su celularidad. Es provisto por el kit QIAprep& con sonda marcada con Hex pero también tenemos el conjunto de primers/probe con sonda marcada con Cy5 en nuestro laboratorio para utilizar en otras combinaciones.
- **Pre-tratamiento de la muestra:** Como el analito a identificar en el material clínico de partida es RNA, debe hacerse un paso previo de extracción del material genético que sea eficiente para el tipo de muestra y virus blanco. Dado que el kit utilizado y

muchos procesos incluyen un paso simple de extracción con buffer de lisis, se contrastó este método con un método de extracción y purificación más seguro, utilizándose entonces dos métodos:

- A. Método de extracción por columna de sílica basado en el método originalmente descrito por Boom (Boom et al., 1990)
- B. Método de lisis, con un buffer de lisis (provisto en el kit QIAprep& Viral RNA UM, Qiagen) conteniendo detergentes suaves y agentes caotrópicos que se mezcla con un volumen de muestra, se incubaba por cierto tiempo para dar lugar a la liberación del RNA

RT-qPCR: El kit empleado permite la detección de patógenos respiratorios, y realiza la transcripción reversa (RT) y la amplificación (PCR) en un solo tubo. La Master Mix provista por el kit contiene la enzima retrotranscriptasa y una polimerasa termoestable (TaqPol), que es la que da lugar a la amplificación posterior. El proceso se llevó a cabo en el equipo termociclador en tiempo real CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System de BioRad Laboratories, previamente configurado con un paso de retrotranscripción donde el RNA es copiado a DNA, donde la mix se mantiene 10 minutos a 50°C generando el cDNA es decir el DNA copia del RNA presente en la muestra. A continuación, el programa incluye un paso para inactivar la retrotranscriptasa y activar la TaqPol mediante el aumento de temperatura a 95°C unos 2 minutos. Luego el programa continúa con una serie de entre 35 y 45 ciclos de amplificación por PCR a las temperaturas que incluyen la desnaturalización e hibridación/extensión.

Las distintas combinaciones de primers y probes se basan en secuencias publicadas (Fry et al., 2010; Mancini et al., 2020; Marcone et al., 2012) y se muestran en la tabla 2.

Nombre	Secuencia	Referencia	
InfluA-F	GACCRATCCTGTACCTCTGAC	Mancini et al., 2020	
InfluA-R	AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA		
InfluA-P	TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG		
InfluB-F	TCCTCAAYTCACTCTTCGAGCG		
InfluB-R	CGGTGCTCTTGACCAAATTGG		
InfluB-P	CCAATTGAGCAGTGAAACTGCGGTG		
E-F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT		
E-R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA		
E-Pcy5	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG		
N2-F	TTACAAACATTGGCCGCAAA		
N2-R	GCGCGACATCCGAAGAA		
N2-P	ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG		
E-Phex	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG		
RP-F	AGATTTGG CCTGCGAGCG		
RP-R	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT		
RP-P	TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG		
RSV-F	GGCAAATATGGAAACATACGTGAA		Fry et al., 2010
RSV-R	TCTTTTCTAGGACATTGTAYTGAACAG		
RSV-P	CTGTGTATGTGGAGCCTTCGTGAAGCT		
RSV-ConF	AACAGTTTAACATTACCAAGTGA		
RSV-ConR	GCATCAATATCTCAAGTCAATGA	Marcone et al., 2012	
RinoF 356-369	CYAGCCTGCGTGCC		
RinoR 563-543	GAAACACGGACACCCAAAGTA		
T-Rino 444-465	TCCTCCGGCCCCCTGAATGYGGC		

Tabla 2. Secuencias de primers y probes utilizados en este trabajo. Los fluoróforos contenidos en cada sonda son indicados con código de color: azul para FAM, verde para HEX y rosa para Cy5.

Como ya mencionamos, la reacción y detección del virus se realiza con el equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories), que utiliza hasta 5 canales. Debido a que los probes fueron solicitados en distintos tiempos y para proyectos distintos, parte de este trabajo fue el de compatibilizar el uso de éstos en una multiplex que utilice dos wells por muestra para detectar cinco virus y dos controles. Los probes están marcados como sigue:

- FAM para el VSR, HRV, Flu A, gen N de SARS-Cov-2
- HEX para Flu B y control endógeno de Qiagen (Human sampling)
- Cy5 para el gen E del SARS-CoV-2 y control endógeno de Mancini et al.

Los resultados se analizarán con el Software Maestro (CFX Maestro Software, BioRad Laboratories).

7. Desarrollo

7.1 Preparación de primer y probes

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 Genomics, Louisville, KY, y Macrogen para la preparación de soluciones madres.

7.1.1 Diluciones de primers y probes

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

A modo de ejemplo se detalla el proceso de preparación de la solución de trabajo del primer reverse Flu B, el resto de los primers y probes siguen un procedimiento similar:

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

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

$$4561 \times 100 \text{ uM} = V_f \times 500 \text{ uM} \text{ despejo } V_f = 912,2 \text{ ul}$$

De esta solución madre se realiza una dilución para llevarla a 24 uM. Vamos a preparar 100 ul.

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

$$V_i \times 500 \text{ uM} = 100 \text{ ul} \times 24 \text{ uM} \text{ despejo } V_i = 4,8 \text{ ul de solución madre en } 95,2 \text{ ul de buffer TE}$$

7.2 Extracción de material genético

Se realizó extracción en columna para las muestras de los virus en estudio, y se empleó el *Easy Pure Viral DNA/RNA Kit* (TransGen Biotech), Zymo Research.

Estos kits son métodos rápidos y sencillos basados en columna para aislar el material genético viral. El procedimiento básicamente consiste en un paso de lisis, un paso de enriquecimiento del material genético con un Carrier y unión del RNA a una membrana de silica en la columna, lavados y finalmente elución del RNA de la columna.

7.2.1 Procedimiento para TransGen:

1. Se adicionan 20 ul de Proteinasa K estéril en un tubo eppendorf de 1,5 ml libre de RNAsas.
2. Se agregaron al tubo anterior 200 ul de la muestra.
3. Se agregaron 200 ul de buffer BB5 con el carrier RNA (previamente preparado según indicaciones del inserto, donde se tomaron 210 ul de BB5 y 5,9 ul del Carrier RNA), la mezcla se vortexeo por 15 segundos.
4. Se incubo en termociclador a 56°C 15 minutos.
5. Se añadieron 250 ul de etanol 96% al tubo que contenía la muestra. Se mezclo con pulsos de vortex por 15 segundos, y se incubo 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Se transfirió el contenido a una columna de centrifugación. Se centrifugo a 12000 x g por 1 minuto y luego se desechó el líquido del tubo colector eluido, y se colocó cuidadosamente la columna en el mismo tubo de recolección.
7. Con cuidado a la columna se adicionaron 500 ul de WB5(que contenía etanol agregado previamente) y se centrifugo a 12000 x g por 1 minuto. Se descarto el líquido contenido en el tubo. Este paso se realizó dos veces.
8. Se centrifugo a 12000 x g por 1 minuto para remover el etanol que hubiese quedado y secar por completo la membrana.
9. Se traspaso la columna a un tubo de micro-centrifuga de 1,5 ml libre de RNA asas.
10. Se añadieron 30 ul de Agua libre de RNAasas (provista por el kit), en el centro de la columna y se incubo a temperatura ambiente durante 1 minuto.
11. Se centrifugó a 12000 x g por 1 minuto

12. El extracto se almacena a -80°C .

7.2.2 Procedimiento Zymo Research:

1. Se agregan 400 μl del Buffer Viral DNA/RNA y 200 μl de muestra en un tubo eppendorf RNase free 1,5 ml. Dejo reposar 15 minutos a temperatura ambiente.
2. Se transfirió la mezcla en la columna con su tubo colector, se centrifugó a $12.000 \times g$ por 2 minutos. Se cambió de tubo colector.
3. Se agregan 500 μl de Buffer Viral Wash a la columna y se centrifugó $12.000 \times g$ por 30 segundos, descarto el eluido con cuidado y vuelvo a colocar la columna en el tubo colector. Repito este paso.
4. Se agregaron 500 μl de etanol 96% a la columna y centrifugó $12.000 \times g$ por un minuto, descarto el eluido y transfiero la columna a un tubo RNase free 1,5 ml.
5. Se agregan 50 μl de Water DNase/RNase-Free a la columna, se procedió a la centrifugación $12.000 \times g$ por 30 segundos, e inmediatamente se pone en hielo.

7.3 Kit QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen: Reactivos

Este kit permite detectar virus RNA a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos, y cuenta con los siguientes reactivos:

- Viral RNA Master Mix: Este reactivo está compuesto por: transcriptasa inversa (modificada por recombinación, que se activa a 50°C , que es el paso de transcripción inversa), DNA polimerasa (modificada por recombinación, que se activa a 95°C), buffer y mezcla de dNTPs (dNTPC, dNTPG, dNTPA, dNTPT).
- Human Sampling IC Assay: Llamado también control endógeno. Es un control de celularidad que permite evaluar si hay presencia de material humano en la muestra, consiste en una mezcla de primer y sonda marcada con fluoróforo que se detecta en el canal HEX, y está dirigido contra dos transcritos humanos (RNase P y B2M),
- RNA IC Template Assay: Llamado también control exógeno o control interno positivo, permite detectar si hubo procesos de inhibición, es un RNA sintético que consiste en una combinación de primer y sonda marcada con un fluoróforo que se detecta en el canal Cy5.

- **Viral RNA UM Prep Buffer:** Libera moléculas de RNA de las envolturas que los rodean y así prepara las muestras para la detección del virus.

A partir del protocolo propuesto por el manual de instrucciones provistos por el kit, se probaron diferentes opciones para la puesta a punto, y se adaptó para ser utilizada en la detección simultánea de los cinco virus (SARS-CoV-2, Flu A, Flu B, HRV y RSV). De esta forma se llegó a un protocolo final de trabajo para la preparación de la mezcla de reacción empleada en cada corrida.

7.4 Kit QIAprep& Viral RNA UM de Qiagen: Protocolo

Para el análisis de muestras según el kit empleado, el protocolo es el siguiente:

1. Se descongelan gradualmente los reactivos del Kit (Viral RNA Master Mix, Human Sampling IC, RNA IC Template, Viral RNA UM Prep Buffer), los primers y probes. Una vez descongelados se vortexean y centrifugan.

Durante el trabajo en mesada, todos los reactivos se mantienen dentro de una conservadora de Telgopor y en hielo para protegerlos de la luz y el calor (figura 9).

2. Se preparó la mix de reacción bajo flujo laminar (tabla 3), para evitar contaminación tanto de los reactivos como de la mix (figura 9). 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 vigorosamente las muestras, y se realiza una breve centrifugación para homogeneizar el contenido. Si trabajamos con extractos de RNA, estos siempre deben estar en hielo, no expuestos a temperatura ambiente.

4. Bajo flujo laminar se añaden 2 ul de Viral RNA UM Prep Buffer (buffer de lisis), a cada tubo correspondiente del strip (se usaron strip de 8 tubos) ver figura 10. En caso que se trabaje con extractos, el paso es diferente, donde se toman 4 ul de extracto de RNA más 6 ul de agua destilada provista por el kit, y para evitar contaminación el agua debe agregarse bajo flujo laminar en cada tubo, y luego en cabina de seguridad tipo II se agregan los extractos de RNA, donde no precisan un tiempo de incubación.

5. En cabina de seguridad tipo II se añadió a cada tubo del strip 8 ul de muestra (caso que fuera extracto 4 ul del mismo), o control (positivo o negativo), se homogeneizó suavemente, se cerró herméticamente y se lo dejó incubar 5 minutos para la liberación del material genético. Se realizó una pequeña centrifugación antes de abrir en el siguiente paso.

6. Por último, aún en cabina de seguridad tipo II, se añaden los 10 ul de mix de reacción a cada tubo, se cerró herméticamente el strip, se vortexeo a velocidad baja, se centrifugó y se llevó inmediatamente al equipo autoanalizador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (figura 11).

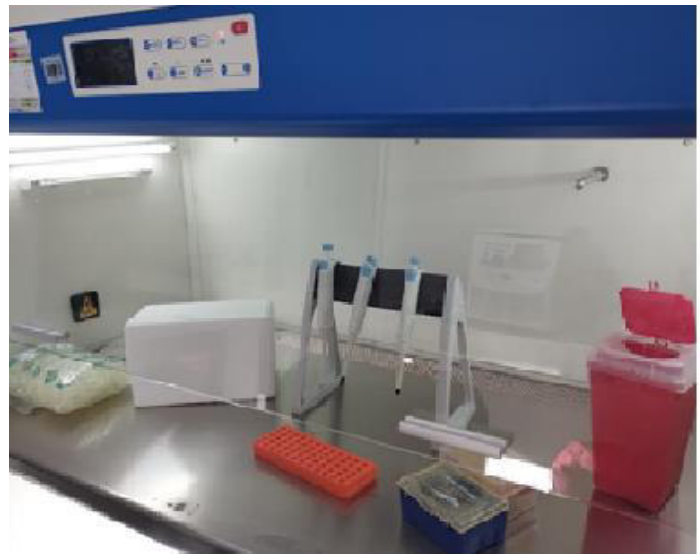


Figura 9. Preparación de la mix en flujo laminar, con sus reactivos en su respectiva conservadora. Imagen diseñada para el trabajo.



Figura 10. Agregado de buffer de lisis a cada strip. Imagen diseñada para el presente trabajo.

Mix MONOPLEX (sugerido por Qiagen)

Reactivos QIAprep & amp Viral RNA UM Kit	Volumen (ul) para 1 reacción	Concentración final
Viral RNA Máster Mix, 4X	5	1x
20x PRI-PRO	1	0,4 uM primer - 0,1 uM probe
20x RNA IC Template (Cy5)	2	1x
20x Human Sampling IC (HEX)	1	1x
Agua destilada	1	
8 ul muestra + 2 ul Viral RNA UM Prep Buffer o 4 ul extracto + 6 ul agua destilada	10	
Vol. final	20	

Tabla 3. Mix de reacción para formato monoplex.

Las condiciones térmicas empleadas para la amplificación por RT-qPCR son:

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

Tabla 4. Esquema de las condiciones térmicas empleadas para la amplificación por RT-qPCR

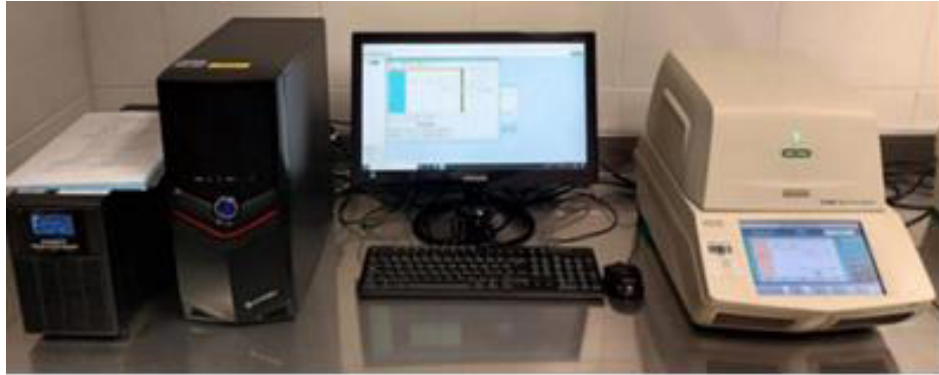


Figura 11. Equipo CFX96 Touch Real Time PCR Detection System (Biorad Laboratories).

7.5 Búsqueda y selección de material de referencia

Con el fin de generar material de referencia para ser utilizado durante el estudio como control positivo para SARS-CoV-2, se procesaron algunas muestras positivas para este virus mediante RT-qPCR, y se buscó aquellas con Ct bajo.

Se seleccionó la muestra de SARS-CoV-2 R00308 con Ct=18,61. A partir de esta muestra se realizó una dilución al cuarto en PBS y se alicuotó en 10 tubos eppendorf de 0,2 ml con 30 μ l por tubo. Estos tubos fueron almacenados a -20°C para ser empleados en las corridas como controles positivos con valor de Ct conocido. También se utilizó como C. positivo de RSV una dilución al tercio de la muestra R00017 con Ct=24,50.

7.6 Estrategia general de desarrollo de la multiplex en base a tres técnicas descriptas

Se utilizarán los primers y probes de tres desarrollos previos (Mancini, Marcone y Fry) para ensayar distintas combinaciones de grupos de virus a detectar. Previamente, se estableció la compatibilidad de los grupos de primers y probes utilizados en las referidas técnicas por el método Multiple Primer Analyzer, (Thermo Fisher Scientific, analizado por el Dr. Mandile, resultados no mostrados). Se tomó como base la técnica triplex de Mancini sobre la cual se fue agregando complejidad ya que el total de analitos a detectar son siete: cinco agentes virales más los controles endógeno y exógeno. Considerando que el equipo a utilizar cuenta

con cinco canales y que, debido a limitaciones del mercado local, solo contamos con tres fluoróforos distintos en nuestras sondas, el objetivo final será utilizar dos wells de la forma más eficiente para la detección de los siete analitos mencionados.

8. Resultados y discusión de resultados

8.1 Prueba de los primers para los virus de influenza

Inicialmente se probaron los componentes de las mezclas de reacción de Mancini en forma parcial mix 1 (Mancini) que testea los dos virus de influenza A y B combinado con el control exógeno que utilizan los canales para FAM, HEX y Cy5 respectivamente.

Se preparó una monoplex, según protocolo (ver tabla 3), para Flu A (FAM) con control endógeno (HEX) y una monoplex para Flu B (HEX) pero sin el control endógeno ya que este último emitía en el mismo canal.

Muestras y procesamiento 1: se utilizaron dos muestras positivas para Flu A y cinco para Flu B correspondientes al período diciembre-enero de 2022 según resultados previos de IFD del Hospital Mi Pueblo y se utilizó buffer de lisis, no extracción por columna, para lograr un procesamiento lo más simple posible.

Resultados: Al procesar estas muestras no se detectó producto de amplificación en ninguna de las muestras, por lo que se decide realizar una extracción y semi-purificación más eficiente mediante columnas.

Muestras y procesamiento 2: Se preparo una mix con formato dúplex, según protocolo sugerido por Qiagen, o sea concentraciones finales de primers 0,4 uM y de probes 0,1 uM. En este caso se arma la mix con primers y probes para Flu A y Flu B y control exógeno, pero sin control endógeno ya que utiliza el mismo canal que Flu B (Hex). Nuevamente se utilizaron muestras positivas por IFD para Flu A del periodo febrero-marzo 2023 y Flu B del período diciembre-enero 2022, pero, diferencia del procesamiento 1, en este caso las muestras fueron extraídas por columnas (Zymo Research) y no con buffer de lisis.

Muestras Flu A en wells A a C: R00179; R00178 y R00180

Muestras Flu B en wells D a G: R00145; R00141; R00146; R00140

Resultados: Al procesar estas muestras se detectó producto de amplificación para Flu B (HEX), y no para Flu A (FAM) como se observa en la tabla 5.

Debido a que las muestras de Flu A no amplificaron pero el control endógeno indicaba presencia de celularidad, estas se enviaron a reprocesar al Hospital Mi Pueblo (HMP), donde volvieron a dar positivas por un método molecular (IDNow, ABBOTT). Por esta razón se pensó en primera instancia que el problema podía deberse a que no funcionaban los primers o el probe (Eurofins), por lo cual se preparó y se corrió un gel de agarosa con los productos de amplificación de la RT-qPCR para Flu A y B.

El tamaño de los amplicones se calcula a partir de las posiciones de los primers en la secuencia del gen de la proteína de matriz M1 correspondiente al segmento 7 del virus de Flu A como se muestra en la figura 12.

Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq	Fluor	Cq
R00179	Flu A	A07	FAM	N/A	HEX	N/A
R00178	Flu A	B07	FAM	N/A	HEX	N/A
R00180	Flu A	C07	FAM	N/A	HEX	N/A
R00145	Flu B	D07	FAM	N/A	HEX	31.38
R00141	Flu B	E07	FAM	N/A	HEX	21.61
R00146	Flu B	F07	FAM	N/A	HEX	24.65
R00140	Flu B	G07	FAM	N/A	HEX	23.14
Control -	Agua d.	H07	FAM	N/A	HEX	N/A

Tabla 5. Valores de Ct obtenidos: Flu A (FAM), Flu B (HEX).
Tabla extraída de CFX96-Maestro.

1 agcaaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgttct
 61 ctctatcgtc ccgtcaggcc cctcaaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt
 121 tgetggaag aataccgatc ttgaggctct catggaatgg ctaaagacaa **gaccaatct**
 181 **gtcacctctg** **actaagggga** ttttaggatt tgtgttcacg ctacc**gtgc** **ccagtgagcg**
 241 **aggactgcag** **cgtagacgct** **tgtccaaaa** **tgccctta**at gggaatgggg atccaataa
 301 tatggacaga gcagttaaac tgtatcgaaa gcttaagagg gagataacat tccatggggg
 361 caaagaaata gcactcagtt attctgctgg tgcacttggc agttgtatgg gactcatata
 421 caacaggatg ggggctgtga ccaccgaatc agcatttggc cttatatcg ccaacctgtga
 481 acagattgcc gactcccagc ataagtctca taggcaaatg gtaacaaca ccaaccatt
 541 aataagacat gagaacagaa tggttctggc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat
 601 ggctggatcg agtgaacaag cagctgaggc catggagggt gctagtcagg ccaggcagat
 661 ggtgcaggca atgagagcca ttgggactca tctagctct agcactggtc tgaaaaatga
 721 tctcctgaa aatttcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacgattcaa
 781 gtgatcctct tgttggcc gcaagtataa ttgggattgt gcacctgata ttgtggatta
 841 ttgatgcct ttttcaaa agcatttacc gtatcttaa acacggtta aaaagagggc
 901 ctctacgga aggagtacca gactctatga gggagaata tcgagaggaa cagcagaatg
 961 ctgtggatgc tgacgatggt cattttgca gcatagagct agagtagaaa caaggtatgt
 1021 tttact

Figura 12. Ubicación de los primers (verde), y probe (amarillo), en la secuencia del segmento 7 de Flu A. Imagen realizada para el presente trabajo.

Por lo tanto, se espera un producto de 106 pares de base para el amplicón de Flu A.

Análisis de los productos de amplificación

- En este gel de agarosa se analizan los productos de las real time de Flu A y B utilizando como control los productos de la Real Time de RSV.

ORDEN:

Flu A R00179-R00178-R00180

Flu B R00145-R00141-R00146-R00140

RSV R00010-R00081-R00002-R00004

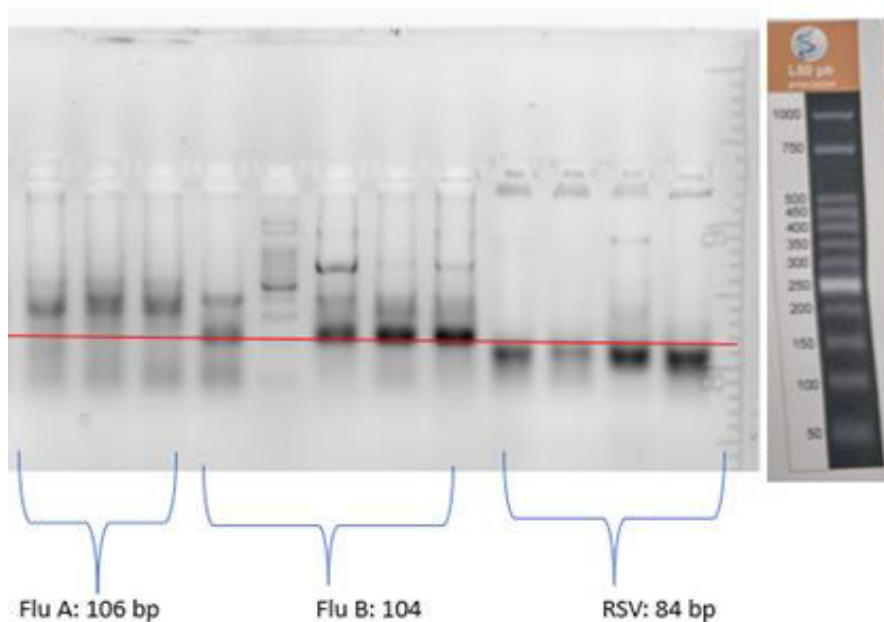


Figura 13. Gel de agarosa. Línea roja indica 100bp. Imagen realizada para el presente trabajo.

La corrida electroforética no mostro un producto con el tamaño esperado para Flu A (106 pb), lo que podría indicar que los primers estaban mal sintetizados. Esto motivó un reclamo a la empresa que comercializa el producto acompañado por los resultados descriptos y la imagen del gel probando la ausencia del amplicón esperado. Por otro lado se mandaron a sintetizar nuevos primers a la compañía Macrogen que incluyeron los primers originales (Tabla 2) y un par de primers más cortos y que aparean en otras posiciones para verificar si el problema era de diseño de primers.

La secuencia de diseño propio es Flu A Rs (Flu A Reverse Short) : CCCATTAAGGGGATTYTGGAC.

Finalmente la compañía Eurofins acepta resintetizar, por lo que contamos con dos pares de primers descriptos y un par de diseño propio para Flu A que fueron testeados y los resultados comparados se exponen a continuación.

➤ **Prueba de primers para Flu A (Macrogen):**

Estos primers fueron comprados mientras se esperaba la síntesis y envío de los primers de Eurofins. Se preparo una mezcla monoplex, según protocolo, con siete muestras positivas para Flu A (IFD, HMP) extraídas con buffer de lisis. Al procesarlas, cuatro de las siete mostraron amplificación para el canal esperado (FAM), y las otras tres no, lo cual probablemente sea debido a que fueron procesadas con buffer de lisis y no extraídas por columnas.

Luego se procedió a seleccionar cuatro muestras de estas siete, dos de las que amplificaron (R00244 y R00245) y dos de las que no (R00251 y R00258). A las cuales se las volvió a procesar, pero con paso previo de extracción (Zymo) y con dos mezclas de reacción diferentes, una conteniendo el **primer reverse** (wells A, B, C, D), y la otra conteniendo el **primer reverse short** (wells E, F, G, H). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq
R00244	Flu A	A07	FAM	23.61
R00245	Flu A	B07	FAM	24.88
R00251	Flu A	C07	FAM	32.93
R00258	Flu A	D07	FAM	30.99
R00244	Flu A	E07	FAM	N/A
R00245	Flu A	F07	FAM	N/A
R00251	Flu A	G07	FAM	N/A
R00258	Flu A	H07	FAM	N/A

Tabla 6. Valores de Ct obtenidos: Flu A (FAM).
Tabla obtenida del CFX96- Maestro.

Resultados: Comparando los resultados del grupo de cuatro muestras positivas por IFD se observa que solo mostraron amplificación todas las muestras por nuestra real time cuando se realiza el paso de extracción previa por columna, lo que vuelve a demostrar la necesidad de este tipo de extracción para optimizar la técnica. Por otro lado, cuando se prueba en paralelo el uso de nuestro primer reverse modificado y el original (tabla 6) se demuestra que esta modificación no genera amplificación observable y que el nuevo primer no es útil.

Selección primers y concentración de probe para Flu A

Se reprocessan los extractos de las cuatro muestras (R00244, R00245, R00251, R00258), con la mezcla para monoplex conteniendo los nuevos primers de **Eurofins** para comparar con los resultados obtenidos previamente con los primers de **Macrogen**. Adicionalmente se prueban dos concentraciones de probe, la original (0,1 uM, tabla 3) y una concentración algo mayor para verificar si se mejora la señal (0,15 uM).

En los wells A07, B07, C07 y D07 las concentraciones son de 0,4 uM para los primers y 0,1 uM para la probe. En los wells E07, F07, G07 y H07, las concentraciones fueron de 0,4uM para los primers y de 0,15uM para la probe.

Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq
R00244	Flu A	A07	FAM	23.19
R00245	Flu A	B07	FAM	24.32
R00251	Flu A	C07	FAM	32.16
R00258	Flu A	D07	FAM	30.40
R00244	Flu A	E07	FAM	22.68
R00245	Flu A	F07	FAM	24.13
R00251	Flu A	G07	FAM	31.66
R00258	Flu A	H07	FAM	29.28

Tabla 7. Valores de Ct obtenidos: (FAM) para Flu A, empleando Eurofins. Tabla extraída de Cfx96-Maestro.

Resultados: En la figura 14 se puede ver que al aumentar la concentración de probe a 0,15 uM, las curvas tienen un perfil sigmoideo más ajustado y con señales finales más altas, lo que significa que hay mayor emisión de señal de fluorescencia con resultados más definidos.

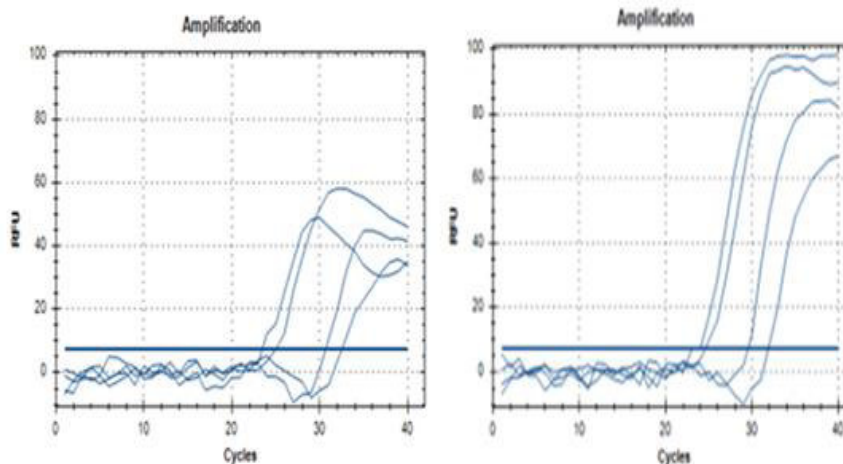


Figura 14. Curva de fluorescencia FAM para Flu A, con probe 0,1 uM (izquierda), 0,15uM (derecha).

Por otro lado, a partir de estos resultados es posible comparar los valores de Cq de las reacciones cuando se utilizan los primers sintetizados por Macrogen vs los sintetizados por Eurofins. Si bien se trata de dos corridas independientes, éstas se hicieron con solo una semana de diferencia, los extractos, las condiciones y concentraciones de reactivos son iguales y se usaron las mismas concentraciones de probe (0,1 uM) y de primers (0,4 uM). Como puede observarse en la tabla 8, la comparación entre los primers de Macrogen y Eurofins para Flu A, demuestra que presentan un desempeño muy similar (Cqs prácticamente iguales), por lo que concluimos que podrían usarse indistintamente.

Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq
R00244	Flu A	A07	FAM	23.61
R00245	Flu A	B07	FAM	24.88
R00251	Flu A	C07	FAM	32.93
R00258	Flu A	D07	FAM	30.99

Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq
R00244	Flu A	A07	FAM	23.19
R00245	Flu A	B07	FAM	24.32
R00251	Flu A	C07	FAM	32.16
R00258	Flu A	D07	FAM	30.40

Tabla 8. Valores de Ct obtenidos: Flu A (FAM), usando Macrogen a 0,1 uM probe (izquierda) y Eurofins a 0,1 uM probe (derecha). Tabla extraída de CFX96-Maestro.

8.2 Prueba de combinaciones de primers y probes no descriptas

A partir de este punto se comienza a probar mezclas de primers y probes originalmente descriptas para reacciones por separado. Iniciamos con una RT-qPCR utilizando los primers y probes de Mancini para SARS-CoV-2 y de Fry para RSV con control endógeno. En este caso utilizamos el canal de Cy5 para el gen E de SARS-Cov-2, el de FAM para RSV y el de HEX para el control. En la mezcla no se incluye el control exógeno, ya que el gen E de SARS-CoV-2 utiliza el mismo fluoróforo (Cy5).

Muestras y procesamiento: Se preparo una mix con formato dúplex según protocolo sugerido por Qiagen para las concentraciones finales de primers y probes (0,4 uM y 0,1 respectivamente). La mix empleada utiliza una premezcla de primers y probes cuyas concentraciones se calculan para que, al agregar 1 ul en la mezcla de reacción su concentración final sea la deseada. Denominamos a estas premezclas de **Primers y probes como Pri-Pro**. De esta forma la mezcla de reacción se compone de la siguiente forma: Pri-Pro RSV 1 ul; Pri-Pro SARS-CoV-2 gen E 1 ul; C. endógeno kit Qiagen 1ul; UM master mix Qiagen 5 ul; AD 2 ul.

Se usaron muestras positivas para RSV por IFD (HMP) y positivas para SARS-Cov-2 por RT-qPCR (UNQ). Como controles positivos de usaron muestras preseleccionadas, diluídas y alicuotadas (ver métodos) y una muestra de sobrenadante de cultivo previamente evaluada (Trabajo final Bioquímica, (TFB) UNAJ Melisa Herasimiuk).

Muestras SARS-CoV-2 en well A5 y B5: R00312; R00310

Muestras RSV en wells C5 y D5: R00005; R00018

Control positivo (C+) RSV en well E5: Cultivo

Control positive RSV en well F5: R00017

Control positive SARS-CoV-2 en well G5: R00308

Resultados: En esta puesta a punto de RT-qPCR para SARS-CoV-2 y RSV, se utilizaron dos muestras, las R00005 y R00018 previamente procesadas en formato monoplex para RSV (TFB Melisa Herasimiuk) cuyos resultados se muestran en tabla 1. En base a los resultados obtenidos aquí procesando estas muestras de RSV en el formato multiplex, se puede constatar que los valores de Ct son comparables. Debe considerarse que las muestras fueron congeladas

y descongeladas entre los procesos y que, al trabajar con volúmenes tan pequeños, los errores de carga pueden llevar a que el valor se modifique en algo el Ct. En base a estos resultados concluimos que, en formato multiplex fueron detectados todos los virus previamente detectados en formatos monoplex y que, en principio, no se afectaría de forma muy significativa la sensibilidad.

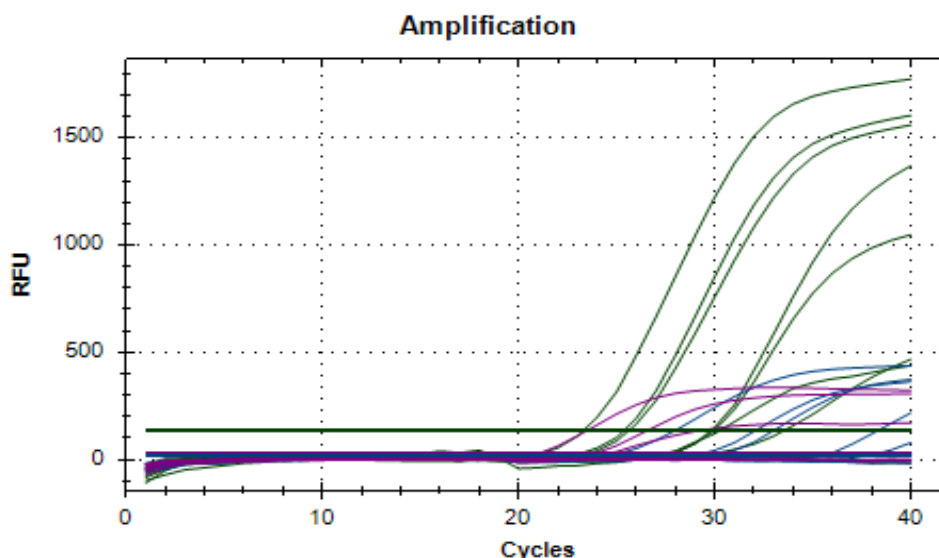


Figura 15. Curvas de fluorescencia: RSV (FAM), SARS-CoV-2 (Cy5), control endógeno (HEX). Imagen obtenida del CFX96-Maestro.

Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq
R00312	SARS-CoV-2	A05	FAM	N/A	A05	HEX	30.34	A05	Cy5	24.30
R00310	SARS-CoV-2	B05	FAM	N/A	B05	HEX	25.67	B05	Cy5	23.53
R00005	RSV	C05	FAM	30.09	C05	HEX	23.34	C05	Cy5	N/A
R00018	RSV	D05	FAM	35.45	D05	HEX	30.03	D05	Cy5	N/A
Control +	Cultivo RSV	E05	FAM	24.44	E05	HEX	33.62	E05	Cy5	N/A
R00017	RSV	F05	FAM	29.04	F05	HEX	25.41	F05	Cy5	N/A
Control +										
R00308	SARS-CoV-2	G05	FAM	N/A	G05	HEX	29.84	G05	Cy5	20.85
Control +										
Control -	Agua d.	H05	FAM	37.99	H05	HEX	N/A	H05	Cy5	N/A

Tabla 9. Valores de Ct obtenidos: RSV (FAM), C. endógeno (HEX), SARS-CoV-2 (Cy5). Tabla extraída de CFX96-Maestro.

RT-qPCR para detección de tres virus RSV, SARS-CoV-2 y HRV

Continuando con la prueba de nuevas combinaciones se trabaja en este caso con los componentes de las mezclas de reacción de Mancini, Fry y Marcone en forma parcial, para testear los virus de SARS-CoV-2, RSV y HRV combinado con el control endógeno que utilizan los canales para Cy5, FAM y HEX respectivamente. Dado que nuestras sondas para RSV y HRV están marcadas con el mismo fluoróforo (FAM), la idea de correr ambas detecciones en un mismo well es proceder a una discriminación posterior en los casos de positividad en el canal de FAM.

Muestras y procesamiento: Se preparo una mix con formato multiplex para RSV, SARS-CoV-2 y HRV. Como ya lo habíamos mencionado para procesar SARS-CoV-2 (gen E), no empleamos el control exógeno, ya que ambos utilizan el mismo fluoróforo (Cy5).

La mix empleada es: (Pri-Pro) RSV 1ul; Pri-Pro HRV 1 ul; Pri-Pro SARS-CoV-2 gen E 1 ul; C. endógeno kit Qiagen 1ul; UM master mix Qiagen 5 ul; AD 1 ul.

Se usaron muestras positivas por IFD para RSV y positivas por RT-qPCR para SARS-Cov-2 (UNQ) y HRV (TFB en proceso, Jesús Villanueva) procesadas con buffer de lisis del kit.

Muestras SARS-CoV-2 en wells A y B: R00312; R00310

Muestras HRV en wells C y D: R00054; R00115

Muestras RSV en wells E y F: R00005; R00018

Control positivo RSV en well G: Dilución de cultivo

Resultados: Como se observa de la tabla 10 fue posible detectar en forma clara los virus SARS-CoV-2 y RSV, sin embargo, esto no fue el caso para las dos muestras con HRV. Una de las muestras fue negativa y para la otra se obtuvo un Ct muy alto. Según resultados previos obtenidos en el TFB en curso del alumno Jesús Villanueva consideramos que es muy posible que para las muestras de HRV sea imprescindible hacer el paso previo de extracción del RNA con columna de silica, para mejorar la sensibilidad. Esto se evidenció posteriormente cuando al utilizar la muestra R00054 extraída por columna en el estudio de comparación que sigue (ver abajo se obtuvo un Ct de 25.22 (tabla 11) mucho menor al de 39.46 (tabla 10) obtenido en este proceso con buffer de lisis. Es importante destacar que, si bien para la extracción en columna se empleó el kit TransGen, en otros TFB en curso se demostró también la utilidad de kits de origen nacional (PBL).

Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq
R00312	SARS-CoV-2	A07	FAM	N/A	A07	HEX	34.48	A07	Cy5	24.42
R00310	SARS-CoV-2	B07	FAM	39.45	B07	HEX	26.03	B07	Cy5	22.46
R00054	HRV	C07	FAM	39.46	C07	HEX	25.57	C07	Cy5	N/A
R00115	HRV	D07	FAM	N/A	D07	HEX	30.68	D07	Cy5	N/A
R00005	RSV	E07	FAM	31.93	E07	HEX	23.45	E07	Cy5	N/A
R00018	RSV	F07	FAM	38.65	F07	HEX	30.15	F07	Cy5	N/A
Control +	Dilución cultivo RSV	G07	FAM	27.96	G07	HEX	34.5	G07	Cy5	N/A
Control -	Agua d.	H07	FAM	N/A	H07	HEX	N/A	H07	Cy5	N/A

Tabla 10. Valores de Ct: RSV y HRV (FAM), C. endógeno (HEX), SARS-CoV-2 (Cy5). Tabla extraída de CFx96-Maestro.

Comparación de valores de Ct monoplex (HRV) vs multiplex (RSV, SARS-CoV-2 y HRV)

Para evaluar si se ve afectado el valor de Ct cuando se utilizan formatos multiplex en comparación con los resultados en mezclas monoplex, se procesan en simultáneo ambos formatos para muestras de HRV extraídas por columnas.

Muestras y procesamiento: Se preparo una mix con formato monoplex para HRV, según protocolo, y otra mix para formato multiplex: Pri-Pro RSV 1ul; Pri-Pro HRV 1 ul; Pri-Pro SARS-CoV-2 gen E 1 ul; C. endógeno kit Qiagen 1ul; UM master mix Qiagen 5 ul; AD 1 ul (Las muestras fueron extraídas mediante columnas TransGen).

Muestras HRV en wells A a G: R00054; R00082; R00087; R00098; R00111; R00112; R00128.

Resultados: Pudo verse que las curvas obtenidas en ambos casos siguen el formato sigmoideo esperado con valores máximos similares y, sobre todo que los valores de Ct para el formato multiplex es casi idéntico a los obtenidos para el formato monoplex. Por estas observaciones concluimos que la utilización del formato multiplex no interfiere en el nivel de sensibilidad de detección del virus.

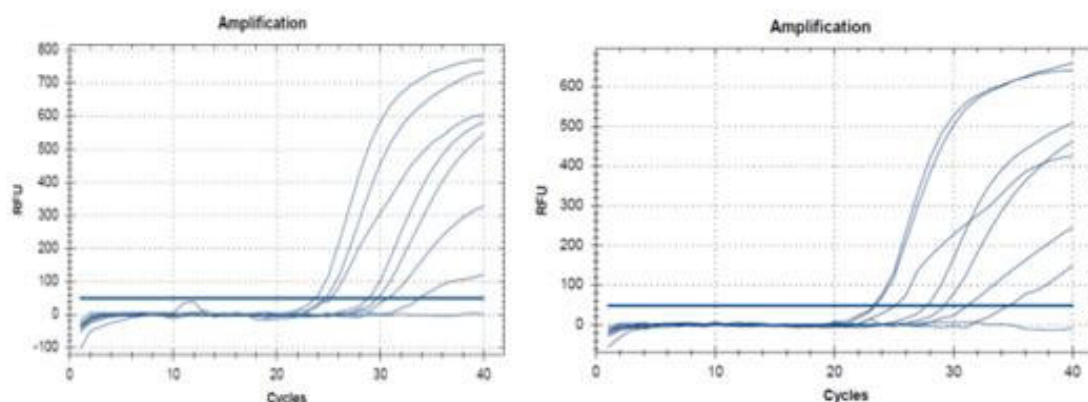


Figura 16. Curvas de fluorescencia (FAM) para HRV en formato multiplex (izquierda) y monoplex (derecha). Imagen obtenida del CFX96- Maestro.

Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq
R00054	HRV	A06	FAM	25.22
R00082	HRV	B06	FAM	33.73
R00087	HRV	C06	FAM	24.70
R00098	HRV	D06	FAM	28.83
R00111	HRV	E06	FAM	30.70
R00112	HRV	F06	FAM	23.69
R00128	HRV	G06	FAM	29.70
Control -	Agua d.	H06	FAM	N/A

Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq
R00054	HRV	A07	FAM	25.11
R00082	HRV	B07	FAM	34.64
R00087	HRV	C07	FAM	23.42
R00098	HRV	D07	FAM	27.74
R00111	HRV	E07	FAM	31.16
R00112	HRV	F07	FAM	23.26
R00128	HRV	G07	FAM	29.21
Control -	Agua d.	H07	FAM	N/A

Tabla 11. Valores de Ct obtenidos: HRV (FAM) en formato multiplex (izquierda), formato monoplex (derecha) Tabla extraída de CFX96-Maestro.

Comparación de valores de Ct para la detección de Flu B y SARS-CoV-2 en monoplex vs multiplex alternativas

Para evaluar si se ve afectada la sensibilidad de detección de SARS-CoV-2 y Flu B cuando se utilizan dos formatos multiplex alternativos en comparación con los resultados en mezclas monoplex, se procesan en simultáneo ambos formatos. En este caso, a diferencia de la triplex de la sección anterior (RSV, SARS-CoV-2 y HRV) se utilizan mezclas para detección por

separado (distintos wells) para RSV y HRV ya que los probes para ambos usan el mismo fluoróforo (FAM).

Muestras y procesamiento: Se prepararon dos mix en formato triplex, para SARS-CoV-2, Flu B, HRV y RSV. Se procesaron cuatro muestras de Flu B (R00146, R00145, R00140, R00141) y cuatro de SARS-CoV-2 (R00345, R00344, R00346, R00347), para comparar entre el formato monoplex y el formato multiplex. Formato monoplex según protocolo (tabla 3). Para los formatos multiplex las mixes empleadas son:

Mix 1 para RSV, SARS-CoV-2 y Flu B: Pri-Pro SARS-CoV-2 gen E 1 ul; Pri-Pro RSV 1 ul; Pri-Pro Flu B 1 ul; UM master mix Qiagen 5 ul; AD 2 ul

Mix 2 para HRV, SARS-CoV-2 y Flu B: Pri-Pro SARS-CoV-2 gen E 1 ul; Pri-Pro HRV 1 ul; Pri-Pro Flu B 1 ul; UM master mix Qiagen 5 ul; AD 2 ul

Cabe aclarar que las concentraciones finales de primers y probes para cada virus son las mismas en todos los formatos.

Ubicación en placa:

- Formato monoplex: muestras positivas para Flu B se ubican en los wells 5A, 5B, 5C y 5D y muestras positivas para SARS-CoV-2 en los wells 5E, 5F, 5G, 5H
- Formato Multiplex:
 - Mix 1 en los wells 6A, 6B, 6C, 6D (muestras positivas para Flu B), 6E, 6F, 6G, 6H (muestras positivas para SARS-CoV-2)
 - Mix 2 en los wells 7A, 7B, 7C, 7D (muestras positivas para Flu B), 7E, 7F, 7G, 7H (muestras positivas para SARS-CoV-2)

Resultados: En base a los resultados mostrados, se evidencia que las diferencias en Ct son mínimas por lo que suponemos que no existe interferencia entre los oligonucleóticos en los distintos formatos a pesar de que las mezclas multiplex son mucho más complejas que las monoplex. En estos experimentos se notó que, si bien observamos curvas sigmoideas, las señales finales (meseta) de fluorescencia emitidas por las muestras de Flu B tanto para el formato monoplex como para el formato multiplex, son bajas (no mostrado), lo que hace sospechar de un problema con la sonda, ya sea concentración subóptima, degradación o pérdida de fluoróforo.

La muestra R00140 (Flu B) en el formato monoplex no presenta amplificación. Esto puede deberse a fallas durante el proceso, y resalta la importancia de que el operador esté atento a la formación de burbujas, exactitud en la carga, etc. Al comparar las mixes multiplex, ambas mezclas arrojan valores de Ct prácticamente iguales por lo que ambas mezclas podrían utilizarse indistintamente.

Flu B en formato monoplex y multiplex (2 mix)

Monoplex					Multiplex con mix 1			Multiplex con mix 2		
Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq
R00146	Flu B	A05	HEX	30.10	A06	HEX	28.98	A07	HEX	29.00
R00145	Flu B	B05	HEX	26.02	B06	HEX	25.18	B07	HEX	25.00
R00140	Flu B	C05	HEX	N/A	C06	HEX	32.46	C07	HEX	32.77
R00141	Flu B	D05	HEX	24.76	D06	HEX	23.20	D07	HEX	24.13

Tabla 12. Valores de Ct obtenidos: Flu B (HEX). Tabla extraída de CFX96-Maestro.

SARS-CoV-2 en formato monoplex y multiplex (2 mix)

Monoplex					Multiplex con mix 1			Multiplex con mix 2		
Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq
R00345	SARS-CoV-2	E05	Cy5	26.30	E06	Cy5	26.12	E07	Cy5	26.01
R00344	SARS-CoV-2	F05	Cy5	24.85	F06	Cy5	25.09	F07	Cy5	24.72
R00346	SARS-CoV-2	G05	Cy5	24.55	G06	Cy5	25.19	G07	Cy5	25.25
R00347	SARS-CoV-2	H05	Cy5	26.47	H06	Cy5	26.06	H07	Cy5	26.03

Tabla 13. Valores de Ct obtenidos: SARS-CoV-2 (Cy5). Tabla extraída de CFX96-Maestro.

Prueba de la utilidad de la extracción y la detección de HRV sobre muestras negativas

Se utilizó la mix 2 de la sección anterior y una mix monoplex para RSV para detectar virus en muestras que habían resultado negativas para el panel de ocho virus por IFD y muestras que habían resultado negativas por RT-qPCR para RSV usando el buffer de lisis para evaluar simultáneamente la utilidad de la extracción para incrementar la sensibilidad de esta última técnica. En el formato monoplex de RSV se incluyó tanto el control endógeno (HEX), como el control exógeno (Cy5) del kit Qiagen.

Muestras: Las dos muestras de RSV (00009 y R00133) que no habían presentado amplificación en el formato monoplex habían sido procesadas en un TFB previo por Melisa Herasimiuk, realizando en proceso simplificado con buffer de lisis, o sea sin extracción de ácidos nucleicos por columna. Además, se procesaron dos muestras negativas (R00348 y R00349) para el panel de inmunofluorescencia directa sospechosas de contener HRV.

Muestra RSV en wells A y E: R00009

Muestra RSV en wells B y F: R00133

Muestra negativa en wells C y G: R00348

Muestra negativa en wells D y H: R00349

Resultados: Según estos resultados puede observarse que las muestras que habían sido procesadas con el buffer de lisis del kit y resultado negativas (R00009 y R00133), en realidad, luego de la extracción de ácidos nucleicos de las muestras, pudieron ser amplificadas. El hecho de que el Ct sea alto muestra que la carga viral de estas muestras era baja lo que justifica que no hayan sido detectadas previamente y que el paso de extracción por columna incrementa la sensibilidad de la detección por este método molecular. Las muestras R00348 y R00349 son muestras negativas por inmunofluorescencia directa para los ocho virus que, procesadas aquí por RTqPCR monoplex para RSV también dan negativo. Por esto se procedió a procesar nuevamente todas estas muestras, pero ahora con la mix 2 obteniendo amplificación en tres de las cuatro (R00009, R00348 y R00349), para HRV (tabla 15).

Como se observa en estos resultados (tabla 15), la muestra R0009 resultó ser una coinfección de RSV y HRV y las dos muestras previamente consideradas negativas para el panel de IFD y RT-qPCR para RSV resultaron contener HRV. Esto resalta la gran utilidad del proceso

completo de extracción y la extensión del rango de virus detectados para resolver la mayor cantidad de diagnósticos posibles.

Mix monoplex para RSV, controles endógeno y exógeno

Monoplex					C. endógeno			C. exógeno		
Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq
R00009	RSV	A07	FAM	34.28	A07	HEX	29.72	A07	Cy5	31.85
R00133	RSV	B07	FAM	33.79	B07	HEX	26.02	B07	Cy5	30.77
R00348	Muestra -	C07	FAM	N/A	C07	HEX	26.31	C07	Cy5	31.48
R00349	Muestra -	D07	FAM	N/A	D07	HEX	26.32	D07	Cy5	31.36

Tabla 14. Valores de Ct obtenidos: RSV (FAM), C. endógeno (HEX), (Cy5) para C. interno. Tabla extraída de CFx96-Maestro.

Mix 2: HRV (FAM); Flu B (HEX); SARS-Cov-2 (Cy5)

Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq
R00009	RSV	E07	FAM	25.26	E07	HEX	N/A	E07	Cy5	N/A
R00133	RSV	F07	FAM	N/A	F07	HEX	N/A	F07	Cy5	N/A
R00348	Muestra -	G07	FAM	24.93	G07	HEX	N/A	G07	Cy5	N/A
R00349	Muestra -	H07	FAM	20.56	H07	HEX	N/A	H07	Cy5	N/A

Tabla 15. Valores de Ct obtenidos: HRV (FAM), Flu B (HEX), SARS-CoV-2 (Cy5). Tabla extraída de CFx96-Maestro.

Modificación de mix 1

En este experimento se prueba una nueva combinación de primers para testear empíricamente su compatibilidad. Se realizó una modificación en la mix 1 descrita en la sección anterior que correspondía a una mezcla de primers y probes para la detección de SARS-CoV-2, Flu B y RSV. En esta oportunidad se agregan los reactivos del control exógeno y se retiran los reactivos para la detección de SARS-CoV-2, ya que ambos usan el mismo fluoróforo (Cy5). A su vez se incorporaron los primers y probe para Flu A, quedando entonces una mezcla para

la detección de Flu A (FAM) y RSV (FAM), Flu B (HEX), más el control exógeno (Cy5). Si bien hay dos blancos virales que usan el mismo fluoróforo, la idea principal es comprobar la compatibilidad de primers utilizando muestras previamente conocidas que son positivas por IFD para estos distintos blancos.

Muestras: Se utilizaron siete muestras positivas para Flu A (R00244; R00245; R00251; R00258; R00260; R00267; R00268), tres muestras positivas para Flu B (R00145; R00141; R00146) y cuatro muestras positivas para RSV (R00154; R00156; R00273; R00272). En todos los casos las muestras fueron extraídas mediante el uso de columnas.

Mix 1: Pri-Pro Flu A 1ul; Pri-Pro RSV 1ul; Pri-Pro Flu B 1ul; C. exógeno kit Qiagen 2 ul; Master Mix Qiagen UM 5 ul.

Resultados:

Tanto la muestra de Flu A (R00244) como la muestra de RSV (R00154) no presentaron amplificación hasta el ciclo 40 de la real time, lo cual atribuimos a la conservación de estas muestras (conservadas en freezer común en HMP durante varios meses). En cuanto al análisis de las muestras de Flu B mediante RT-qPCR, se observó nuevamente que presentan baja señal de fluorescencia al utilizar 0,1 uM de probe (Figura 17), por lo tanto, se procedió repetir el ensayo pero aumentando la concentración a 0,15 uM para mejorar la sensibilidad del método. En este caso se corrieron las mismas tres muestras y una adicional (R00145, R00141, R00146, R00144) y los resultados se muestran en figura 17.

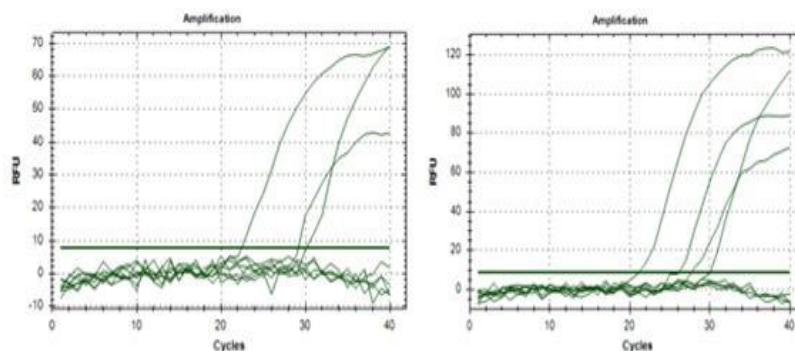


Figura 17. Curvas de fluorescencia para Flu B (HEX). Con probe 0.15uM (derecha), 0,1uM (izquierda). Imagen obtenida del CFx96- Maestro

En la figura 17 se puede ver que al aumentar la concentración de probe, las curvas tienen un perfil sigmoideo más ajustado y con señales finales más altas lo cual permite visualizar resultados más definidos por lo que decidimos formular la mix con la concentración final de 0,15 uM para la sonda de Flu B.

Modificación de mix 2

Se realizó una modificación en la mix 2 (que se correspondía a una mezcla de primers y probe para la detección de SARS-CoV-2, HRV y Flu B), retirando los reactivos de Flu B e incorporando los del control endógeno (ambos usan el mismo fluoróforo: HEX). Esta nueva mezcla queda entonces formulada para la detección de SARS-CoV-2 (Cy5) y HRV (FAM), más el control endógeno (HEX).

Muestras: Se procesaron siete muestras de SARS-CoV-2, seis de HRV y dos negativas al panel IFD. A todas las muestras procesadas se les extrajo el material genético por columna Mix 2: Pri-Pro HRV 1ul; Pri-Pro SARS-CoV-2 1ul; C. endógeno kit Qiagen 1ul; Master Mix Qiagen UM 5 ul; agua destilada 2ul.

Resultados: Todas las muestras procesadas emitieron señal de fluorescencia en el canal esperado, y las dos muestras negativas por IFD resultaron ser positivas para HRV (no incluido en el panel de IFD) mediante RT-qPCR.

8.3 Detección simultánea de los cinco virus blanco en formatos multiplex

En esta etapa, ya contando con todos los primers (ya que los de Flu A debieron resintetizarse) pero con las limitaciones impuestas por las marcas fluorescentes de FAM repetidas en tres de los blancos virales, pasamos a explorar distintas opciones para la detección de los cinco agentes en dos mix finales (dos wells).

Se probaron distintas combinaciones tomando en consideración las limitaciones impuestas por las marcas de cada sonda disponible para los blancos virales (FAM para Flu A, RSV y HRV; Cy5 para SARS-CoV-2 y HEX para Flu B) y control endógeno (HEX) y exógeno (Cy5). Para lograrlo las combinaciones posibles deben distribuirse en dos wells que nos permitan acomodar todos los blancos virales y controles endógeno y exógeno.

Luego de probar varias alternativas, decidimos utilizar en la combinación final una que discriminara directamente el virus de influenza A. Esto es debido a que para este virus existe tratamiento específico y que no es conveniente esperar una confirmación para iniciar el tratamiento de manera precoz. Por esto, en base a las posibilidades, se llegó a la conclusión que la mejor alternativa sería detectar RSV, HRV y Flu B juntos en un well y Flu A y SARS-CoV-2 en el otro. De esta manera evitamos tener que largar otra PCR para confirmar Flu A produciendo este resultado específico más rápidamente.

Adicionalmente, para verificar la calidad de la detección simultánea de dos virus (co-infecciones), se probaron **mezclas de virus en el mismo well** además de en forma individual.

Muestras: Se testean muestras ya procesadas, con valores de Ct conocidos. Se usaron 2 ul de RNA para testear los virus de manera individual (mas 2 ul de agua destilada para completar los 4 ul), y para simular co-infecciones se usan 2 ul de cada muestra (extracto) en las mezclas. De esta forma es posible comparar directamente las señales del mismo virus en infección simple o mixta ya que el material genético *input* en ambos casos es equivalente.

Muestras testeadas con mix 1 (HRV, RSV, Flu B y C. exógeno)

Muestra RSV en well A7:R00272

Muestra HRV en well B7: R00054

Muestra Flu B en well C7: R00145

Muestras Flu B + RSV en well D7: molde 2 ul de R00145 y 2 ul de R00272

Muestras testeadas con mix 2 (Flu A, SARS-Cov-2, C. endógeno)

Muestra de SARS-CoV-2 en well E7: R00307

Muestra de Flu A en well F7: R00260

Muestras de Flu A + SARS-CoV-2 en well G7: molde 2 ul de R00206 y 2 ul de R00307

Resultados: En este formato final de combinación de dos reacciones multiplex se detectan eficientemente todos los blancos y controles endógeno y exógeno (tabla 17). Por otro lado, como se puede observar en las figuras 18 y 19, los valores de Ct y las sigmoideas no son afectados ya sea que el extracto usado represente una infección simple o coinfección.

Entonces podemos decir que la presencia de más de un virus en la muestra no afectaría la sensibilidad de la detección de cada agente individual.

Sample	Contenido	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq	Well	Fluor	Cq
R00272	RSV	A07	FAM	22.93	A07	HEX	N/A	A07	Cy5	31.59
R00054	HRV	B07	FAM	27.46	B07	HEX	N/A	B07	Cy5	29.78
R00145	Flu B	C07	FAM	N/A	C07	HEX	35.58	C07	Cy5	30.48
R00145 + R00272	Flu B + RSV	D07	FAM	22.18	D07	HEX	36.55	D07	Cy5	30.17
R00307	SARS-CoV-2	E07	FAM	N/A	E07	HEX	28.61	E07	Cy5	21.10
R00260	Flu A	F07	FAM	28.89	F07	HEX	29.81	F07	Cy5	N/A
R00307 + R00260	SARS-CoV-2 + Flu A	G07	FAM	30.40	G07	HEX	28.74	G07	Cy5	21.31
Control -	Agua d.	H07	FAM	N/A	H07	HEX	N/A	H07	Cy5	N/A

Tabla 16. Valores de Ct obtenidos: Flu A, RSV y HRV (FAM), Flu B y control endógeno (HEX), control exógeno y SARS-CoV-2 (Cy5). Tabla extraída de CFX96-Maestro.

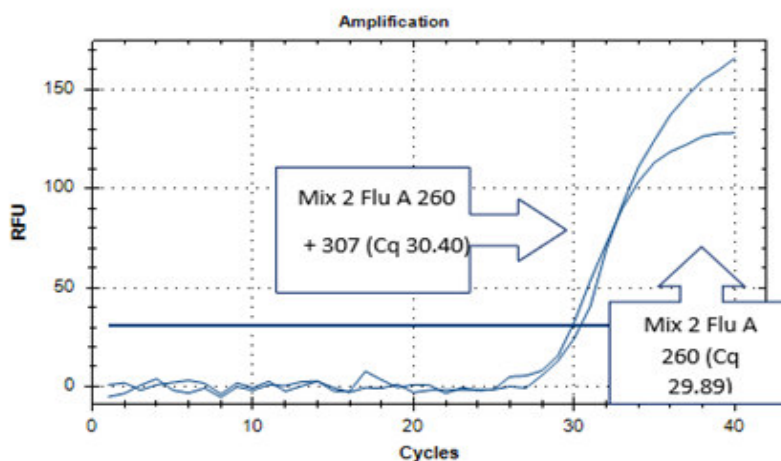


Figura 18. Curvas de fluorescencia para Flu A. Imagen obtenida del equipo CFX96- Maestro.

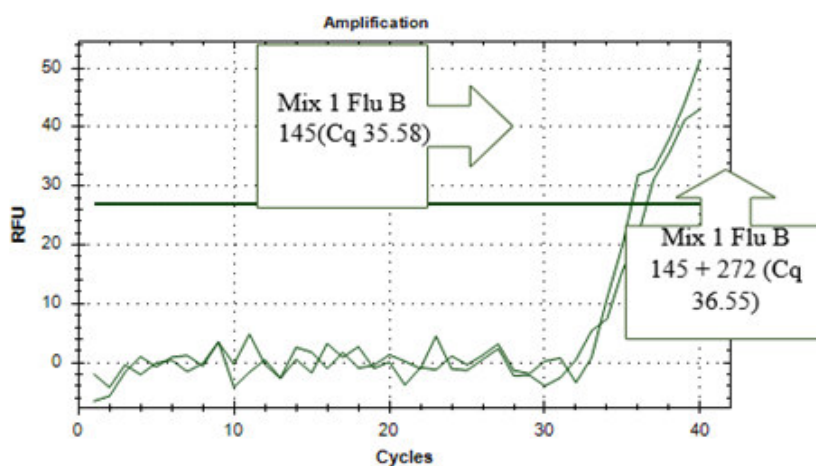


Figura 19. Curvas de fluorescencia para Flu B. Imagen obtenida del equipo CFX96- Maestro.

Protocolo final multiplex

Reactivos QIAprep & amp Viral RNA UM kit	Volumen (ul) para 1 reacción	Concentración final
Viral RNA Máster Mix, 4x	5	1x
Primer Foward Flu B	0.333	0,4 uM
Primer Reverse Flu B	0.333	0,4 uM
Probe Flu B (HEX)	0.495	0,15 uM
Pri-Pro HRV (FAM)	1	(0,4 uM primer- 0,1 uM probe)
Pri-Pro RSV (FAM)	1	(0,4 uM primer- 0,1 uM probe)
20x RNA IC Template (Cy5)	2	1x
Molde: 4 ul RNA + 6 AD	10	
Volumen total	20.16 ul	

Tabla 17. Mix 1 de reacción para formato multiplex.

Reactivos QIAprep & amp Viral RNA UM kit	Volumen (ul) para 1 reacción	Concentración final
Viral RNA Máster Mix, 4x	5	1x
Primer F Flu A	0.333	0,4 uM
Primer Rv Flu A	0.333	0,4 uM
Probe Flu A (FAM)	0.495	0,15 uM
Pri-Pro SARS-CoV-2 gen E (Cy5)	1	(0,4 uM primer- 0,1 uM probe)
20x Human Sampling IC (HEX)	1	1x
Agua destilada	1.9	
Molde: 4 ul RNA + 6 AD	10	
Volumen total	20.06 ul	

Tabla 18. Mix 2 de reacción para formato multiplex.

9. Conclusiones

Con todos los resultados obtenidos se pudo elaborar un protocolo final que permite la detección simultánea de los virus estudiados por la técnica de RT-qPCR Multiplex sin observarse interferencias entre ellos, optimizando el uso de las sondas específicas que estaban disponibles. Si bien los grupos de primers y sondas fueron solicitadas en distintos momentos para otros proyectos, se pudieron compatibilizar en una Multiplex que utiliza dos wells por muestra para detectar cinco virus de los cuales tres emiten fluorescencia en el mismo canal. Durante el curso de los trabajos se advirtió un problema con la detección del virus de influenza A, se investigó la falla analizando los productos en geles de agarosa y se pudo determinar el origen del problema en los primers. Esto se confirmó luego de más de dos meses al recibir una nueva partida de primers e incluso se logró que el fabricante admita que la primera partida había sido mal sintetizada. Es importante destacar este inconveniente parte de los detalles a tener en cuenta durante cualquier puesta a punto.

Parte de los reactivos habían sido utilizados previamente en otros TFB para la detección de HRV y RSV en formato monoplex y, al procesar algunas de las mismas muestras con mezclas multiplex obtuvimos resultados casi idénticos. Esto nos permite afirmar que, al menos en forma preliminar, el desempeño de los reactivos en formatos monoplex y multiplex es muy similar no afectándose en forma notable la sensibilidad de los ensayos. Una prueba extensa, incluyendo algunas decenas de muestras podría confirmar estadísticamente esta aseveración. La puesta a punto de esta Multiplex RT-qPCR en tiempo real, permite agregar a los paneles de uso rutinario en hospitales, la detección del HRV, que por IFD no puede realizarse debido a la cantidad de serotipos que presenta. Por otro lado, tanto en este trabajo como en los precedentes de M. Herasimiuk, y S. Viceconte (en curso) fue posible detectar el RSV en muestras negativas por IFD demostrando la mayor sensibilidad de estas técnicas moleculares. Si bien en este caso utilizamos el kit Qiagen para poner a punto esta Multiplex, la perspectiva a futuro es poder utilizar un reactivo nacional, lo que implicaría un menor costo.

10. Fuente de información y referencias bibliográficas:

-Aguilera-Alonso, D., Illán-Ramos, M., Daoud, Z., Guinea, V., Culebras, E., & Ramos, J.

T. (2020). Analysis of the impact of diagnostic virology tests on the use of antibiotics in paediatric inpatients with community-acquired pneumonia.

Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica (English Ed.), 38(5), 230-233.

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.08.008>

Ali, A., Lopardo, G., Scarpellini, B., Stein, R. T., & Ribeiro, D. (2020). Systematic review

on respiratory syncytial virus epidemiology in adults and the elderly in Latin

America. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 90, 170-180.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.10.025>

Atmar, R. L. (Ed.). (2010). Respiratory Virus Infections. En R. J. Keith, *Lennette's*

Laboratory Diagnosis of Viral Infections (4th Ed, Vol. 50).

- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495-503.
<https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
- Borchers, A. T., Chang, C., Gershwin, M. E., & Gershwin, L. J. (2013). Respiratory Syncytial Virus—A Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 45(3), 331-379. <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8368-9>
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.-L., Ellis, J., Zambon, M., ... Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 25(3), 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Dimmock, N. J., Easton, A. J., & Leppard, K. N. (2007). The process of infections: IIIB. Gene expression and its regulation in RNA viruses. En *Introduction to Modern Virology* (6th Ed).
- Fry, A. M., Chittaganpitch, M., Baggett, H. C., Peret, T. C. T., Dare, R. K., Sawatwong, P., Thamthitawat, S., Areerat, P., Sanasuttipun, W., Fischer, J., Maloney, S. A., Erdman, D. D., & Olsen, S. J. (2010). The burden of hospitalized lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in rural Thailand. *PloS One*, 5(11), e15098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015098>
- Garegnani, L., Styrmisdóttir, L., Roson Rodriguez, P., Escobar Liquitay, C. M., Esteban, I., & Franco, J. V. (2021). Palivizumab for preventing severe respiratory syncytial

- virus (RSV) infection in children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11(11), CD013757. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013757.pub2>
- Hayden, F. G. (Ed.). (2017). Influenza Virus. En D. D. Richman, *Clinical Virology* (4ta Ed, pp. 1009-1059).
- Kampmann, B., Madhi, S. A., Munjal, I., Simões, E. A. F., Pahud, B. A., Llapur, C., Baker, J., Pérez Marc, G., Radley, D., Shittu, E., Glanternik, J., Snaggs, H., Baber, J., Zachariah, P., Barnabas, S. L., Fausett, M., Adam, T., Perreras, N., Van Houten, M. A., ... MATISSE Study Group. (2023). Bivalent Prefusion F Vaccine in Pregnancy to Prevent RSV Illness in Infants. *The New England Journal of Medicine*, 388(16), 1451-1464. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2216480>
- Keneth, M., & Weaver, C. (2017). Appendices I The Immunologist's toolbox. En *Janeway's immunobiologist* (9th ed., p. 760). Garland Science.
- Krause, J. C., Panning, M., Hengel, H., & Henneke, P. (2014). The role of multiplex PCR in respiratory tract infections in children. *Deutsches Arzteblatt International*, 111(38), 639-645. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0639>
- Lamers, M. M., & Haagmans, B. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 270-284. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>
- Lauer, S. A., Grantz, K. H., Bi, Q., Jones, F. K., Zheng, Q., Meredith, H. R., Azman, A. S., Reich, N. G., & Lessler, J. (2020). The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Annals of Internal Medicine*, 172(9), 577-582. <https://doi.org/10.7326/M20-0504>
- Lee, W.-M. (Ed.). (2017). Rhinovirus. En D. D. Richman, *Clinical Virology* (4th Ed, pp. 1143-1157).

- Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30(6), 1292-1305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>
- Mancini, F., Barbanti, F., Scaturro, M., Fontana, S., Di Martino, A., Marsili, G., Puzelli, S., Calzoletti, L., Facchini, M., Di Mario, G., Fabiani, C., Bella, A., Riccardo, F., Pezzotti, P., Stefanelli, P., Rezza, G., & Ciervo, A. (2020). Multiplex Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assays for Diagnostic Testing of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 and Seasonal Influenza Viruses: A Challenge of the Phase 3 Pandemic Setting. *The Journal of Infectious Diseases*, 223(5), 765-774. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa658>
- Marcone, D. N., Videla, C., Ricarte, C., Carballal, G., Vidaurreta, S., & Echavarría, M. (2012). Rhinovirus detection by real-time RT-PCR in children with acute respiratory infection in Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina De Microbiologia*, 44(4), 259-265.
- Monto, A. S., & Sullivan, K. M. (1993). Acute respiratory illness in the community. Frequency of illness and the agents involved. *Epidemiol Infect*, 110(1), 145-160. <https://doi.org/10.1017/s0950268800050779>
- Peiris, J. S. M. (Ed.). (2017). Coronaviruses. En D. D. Richman, *Clinical Virology* (4th Ed, pp. 1243-1267).
- Richman, D. D., Whitley, R. J., & Hayden, F. G. (2017). *Clinical virology* (4th ed). ASM press.
- Russell, A. B. (1999). Palivizumab: An overview. *Hospital Medicine (London, England: 1998)*, 60(12), 873-877. <https://doi.org/10.12968/hosp.1999.60.12.1254>
- Shi, T., McAllister, D. A., O'Brien, K. L., Simoes, E. A. F., Madhi, S. A., Gessner, B. D., Polack, F. P., Balsells, E., Acacio, S., Aguayo, C., Alassani, I., Ali, A., Antonio, M.,

Awasthi, S., Awori, J. O., Azziz-Baumgartner, E., Baggett, H. C., Baillie, V. L., Balmaseda, A., ... RSV Global Epidemiology Network. (2017). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: A systematic review and modelling study. *Lancet (London, England)*, 390(10098), 946-958.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30938-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8)

Srinivasakumar, N., Ogra, P. L., & Flanagan, T. D. (1991). Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. *Journal of Virology*, 65(8), 4063-4069.

<https://doi.org/10.1128/JVI.65.8.4063-4069.1991>

Treanor, J. J. (2017). Respiratory Infections. En D. D. Richman, R. J. Whitley, & F. G. Hayden (Eds.), *Clinical virology* (4th edition). ASM Press.

Williams, J. V. (Ed.). (2017). Respiratory Syncytial Virus, Human Metapneumovirus, and Parainfluenza viruses. En D. D. Richman, *Clinical Virology* (4th Ed., pp. 873-890).

Zhang, S., Akmar, L. Z., Bailey, F., Rath, B. A., Alchikh, M., Schweiger, B., Lucero, M. G., Nillos, L. T., Kyaw, M. H., Kieffer, A., Tong, S., Campbell, H., Beutels, P., Nair, H., & RESCEU Investigators. (2020). Cost of Respiratory Syncytial Virus-Associated Acute Lower Respiratory Infection Management in Young Children at the Regional and Global Level: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 222(Suppl 7), S680-S687.

<https://doi.org/10.1093/infdis/jiz683>

