

Universidad Nacional de San Martín

Escuela de Bio y Nanotecnologías (EByN, UNSAM) -

Administración Nacional de Laboratorios e Institutos

de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán” (ANLIS)

Diagnóstico Molecular de Rinovirus en Niños con Infección Respiratoria Aguda internados en el Hospital Regional Río Gallegos mediante Q-RT-PCR.

Tesis presentada para optar al título de

Magister en Microbiología Molecular

Autor: Pamela Victoria Reynares.

Directora: Mg. Hortensia Del Valle Cano.

Codirectora: Dra. Andrea Pontoriero.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Molecular - Hospital Regional
Río Gallegos.

DEDICATORIA

A mis padres, quienes desde el primer día me enseñaron el valor de la educación y me brindaron su apoyo incondicional, y a quienes fueron mis docentes en la educación pública. Desde la primera infancia hasta el posgrado su influencia y apoyo han sido fundamentales.

AGRADECIMIENTOS

Hoy, al llegar al final de esta travesía de cuatro años, no puedo dejar de detenerme y reflexionar sobre el inmenso viaje que hemos emprendido juntos. Desde el momento en que decidí sumergirme en el mundo del posgrado, no solo me embarqué en una búsqueda académica, sino que también me encontré frente a un acontecimiento histórico sin precedentes, como trabajadora de la salud. Los días de incertidumbre, temor y tristeza se entrelazaron con mi crecimiento personal y profesional de maneras que nunca imaginé.

Al mirar hacia atrás, me llena de gratitud el recordar cada paso dado y cada obstáculo superado. Y detrás de cada logro, hay nombres que brillan con luz propia, personas cuya dedicación y apoyo fueron fundamentales para llegar hasta aquí.

A mis directoras, Hortensia y Andrea, les debo un agradecimiento especial por su paciencia infinita y su inquebrantable empeño en guiarme a lo largo de esta tesis. Su dedicación no solo ha sido fundamental para mi crecimiento académico, sino que también ha dejado una huella imborrable en mi camino hacia un futuro profesional lleno de logros y realizaciones.

A mi colega Alejandra, gracias por alentarme siempre a seguir estudiando y creciendo profesionalmente. A mis compañeros de laboratorio, Meli, Brenda Ariel y Cristian gracias por su apoyo incondicional.

Al departamento de docencia del Hospital Regional Río Gallegos, mi profundo agradecimiento por no solo brindarme orientación durante las distintas etapas del proyecto, sino también por conectarme con Marta del Valle, quien compartió su invaluable conocimiento con una generosidad extraordinaria.

A los profesionales del Instituto Carlos G. Malbrán, Martin Avaro, que compartió información invaluable para la puesta a punto, Cristina Karles y Enrique Lamuedra por facilitar que muestras respiratorias viajen de una punta a otra del país y a Marcelo Rodríguez, por su generosidad y disposición para colaborar en el proceso de validación.

A Yesi del Hospital Zonal Bariloche, a Caro del Laboratorio Central Neuquén, a Ana María Zamora de Tucumán por su tiempo y disposición para compartir muestras e información crucial para el desarrollo de este trabajo. A Gabriela A Andrea de Biosystems, por su apoyo

invaluable al proporcionarnos muestras de cortesía de insumos que garantizaron la viabilidad de nuestros estudios.

A los mejores amigos que la universidad pudo darme Fede, Coquita y Lore.

Pero nada de esto sería posible sin el apoyo y sustento de mi familia, en especial mis padres que fomentaron mi curiosidad por descubrir el mundo desde que era una niña, mis 4 hermanos, mis 6 sobrinos y mis cuñados.

Y finalmente, a Cesar y Esme, por su paciencia y comprensión mientras perseguía mis sueños. Gracias por esperar a que termine de estudiar para empezar con la diversión.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento no bastaría para expresar la profundidad de mi gratitud. Su presencia en mi vida ha hecho de este viaje una experiencia inolvidable, llena de aprendizaje, crecimiento y, sobre todo, amor.

Con cariño y gratitud infinita,

Pamela

RESUMEN

Diagnóstico Molecular de Rinovirus (RV) en Niños con IRA internados en el Hospital Regional Río Gallegos mediante Q-RT-PCR.

Las Infecciones Respiratorias Agudas (*IRA*) representan la primera causa de mortalidad en menores de cinco años, principalmente en países en vías de desarrollo y su etiología está mayormente asociada a virus respiratorios (VR). Si bien los Rinovirus (*RV*) se consideran principalmente agentes etiológicos de enfermedades respiratorias que, afectan a las vías respiratorias altas y pueden ser consideradas leves en individuos inmunocompetentes, con un curso benigno y autolimitado, la capacidad de algunas cepas de desarrollarse a 37 °C hace posible la propagación de RV en vías respiratorias bajas generando manifestaciones clínicas tales como Bronquiolitis, Neumonía adquirida en la comunidad, Exacerbaciones del Asma, Exacerbaciones de Enfermedad Obstructiva Crónica y Exacerbaciones pulmonares en pacientes que padecen Fibrosis Quística.

El método Gold Standard de detección de RV es el aislamiento en cultivo celular, pero tanto esta metodología, como la detección de antígenos y anticuerpos no es de utilidad para diagnóstico de rutina de RV. La implementación de técnicas de diagnóstico, rápidas y de alta sensibilidad como la detección del genoma viral mediante Q-RT-PCR, facilitan su detección y caracterización.

El objetivo general de este estudio fue Implementar la técnica de Q-RT-PCR para diagnóstico de RV, en muestras clínicas de pacientes menores de 15 años, con IRA alta o baja internados en las Salas de Neonatología y Pediatría en el HRRG. Para llevarlo a cabo, se optimizó el protocolo para la determinación de Virus Respiratorios No Influenza mediante ensayos de Q-RT-PCR desarrollado por el Laboratorio de Virus Respiratorios de la División de Enfermedades Virales del CDC que amplifica la secuencia 5'NCR de RV.

Se analizaron 145 muestras respiratorias de pacientes pediátricos internados en el Hospital Regional Río Gallegos con diagnóstico clínico de IRA a los cuales se les solicitó las determinaciones incluidas dentro del panel de virus respiratorios recolectadas entre octubre

de 2021 y septiembre de 2022. El porcentaje de detección de VR totales aumenta un 21% gracias a la implementación de la detección de RV por Q-RT-PCR en los pacientes estudiados convirtiéndolo en el segundo VR más detectado. Se detectó RV durante casi todo el año, con un pico estacional durante el otoño. El grupo etario más afectado fueron los niños menores a dos años, y su detección decrece con la edad. No se observó que haya una diferencia significativa en cuanto al sexo de los pacientes afectados.

Este es el primer estudio en la provincia de Santa Cruz que evalúa la implicancia que este virus tiene en las infecciones respiratorias que afectan a los niños de la región. Con esta información se podrá planificar los requerimientos y diseñar estrategias que apunten a prevenir, controlar y así reducir el impacto de las enfermedades causadas por estos patógenos en la salud pública, como así también sugerir la incorporación de RV dentro del protocolo de vigilancia nacional.

Palabras Clave: IRAs - Respiratorios-Rinovirus- Pediátricos- Q-RT-PCR.

ABSTRACT

Molecular Diagnosis of Rhinovirus (RV) in children with ARI hospitalized in the Río Gallegos Regional Hospital using Q-RT-PCR.

Acute Respiratory Infections (ARIs) represent the main cause of mortality in children under five years of age, mainly in developing countries, and their etiology is mostly associated with respiratory viruses. Although Rhinoviruses (RV) are mainly considered etiological agents of respiratory diseases that affect the upper respiratory tract and can be considered mild in immunocompetent individuals, with a benign and self-limiting course, the ability of some strains to develop at 37 °C makes possible the spread of RV in the lower respiratory tract generating clinical manifestations such as Bronchiolitis, Community Acquired Pneumonia, Asthma Exacerbations, Chronic Obstructive Disease Exacerbations and Pulmonary Exacerbations in patients suffering from Cystic Fibrosis.

The Gold standard method for RV detection is isolation in cell culture; but this methodology as well as the detection of antigens and antibodies are not useful for routine RV diagnosis. The implementation of rapid and highly sensitive diagnostic techniques, such as the detection of the viral genome by Q-RT-PCR, facilitates its detection and characterization.

The general objective of this study was to implement the Q-RT-PCR technique for RV diagnosis, in clinical samples from patients under 15 years of age, with high or low IRA hospitalized in the Neonatology and Pediatrics wards at HRRG. To carry this out, the protocol for the determination of Non-Influenza Respiratory Viruses was optimized through Q-RT-PCR assays developed by the Respiratory Virus Laboratory of the CDC's Division of Viral Diseases, which amplifies the 5'NCR sequence of RV.

A total of 145 respiratory samples from pediatric patients hospitalized in the Río Gallegos Regional Hospital with a clinical diagnosis of ARI were analyzed, for whom the determinations included within the respiratory virus panel were requested, collected between October 2021 and September 2022. The percentage of total VR detection increases by 21% thanks to the implementation of RV detection by Q-RT-PCR in the patients studied, making it

the second most detected VR. RV was detected throughout the year, with a seasonal peak during the autumn. The most affected age group were children under two year, and its detection decreases with age. No significant difference was observed in terms of the sex of the affected patients.

This is the first study in the province of Santa Cruz that evaluates the impact of this virus on respiratory infections affecting children in the region. With this information, it will be possible to plan the necessary resources and design strategies aimed at preventing, controlling, and thus reducing the impact of diseases caused by these pathogens on public health. Additionally, it may suggest the incorporation of RV into the national surveillance protocol.

Keywords: IRAs - Respiratory-Rhinovirus- Pediatric- Q-RT-PCR.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Generalidades.....	1
1.2.	Taxonomía	2
1.2.1.	Familia.....	2
1.3.	Antecedentes Históricos.....	5
1.4.	Estructura Vírica.....	6
1.5.	Patogenia	8
1.5.1.	Respuesta Inmune	11
1.6.	Epidemiología	12
1.1.1	Epidemiología de RV en Argentina	13
1.7.	Manifestaciones Clínicas.....	15
1.7.1.	Infecciones Asintomáticas	15
1.7.2.	Manifestaciones en vías aéreas inferiores	15
1.7.3.	Infecciones en pacientes inmunocomprometidos	19
1.7.4.	Manifestaciones en vías aéreas superiores.....	15
1.8.	Diagnóstico	19
1.8.1.	Recolección y conservación de muestras	19
1.8.2.	Detección de antígenos y serología.....	20
1.8.3.	Cultivo virológico convencional	20
1.8.4.	Métodos de cultivo rápido	21

1.8.5. Cultivo de órganos	22
1.8.6. Amplificación de ácidos nucleicos mediante RT-PCR	22
1.8.7. RT-PCR formato multiplex	24
1.8.8. Paneles de amplificación de ácidos nucleicos virales mediante “Microarrays”	24
1.8.9. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos por NASBA.....	25
1.8.10. Genotipado	25
1.8.11. Secuenciación del genoma completo	26
1.9. Fundamentación	27
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivos Generales.....	28
2.2. Objetivos Específicos	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Universo y ubicación del estudio.....	29
3.2. Extracción de ARN Viral	29
3.3. Detección de RV por Q-RT-PCR.....	30
3.4. Interpretación de Resultados	32
3.5. Validación Analítica.....	32
3.6. Validación Clínica	33
3.7. Evaluación de la Precisión.....	33
3.8. Toma de muestras	34
3.9. Análisis estadístico.....	34

4.	RESULTADOS.....	36
4.1.	Validación Analítica.....	36
4.2.	Validación Clínica.....	37
4.3.	Evaluación de la Precisión.....	37
4.4.	Resultados de las muestras estudiadas.....	38
4.4.1.	Distribución por sexo y grupos etarios.....	39
4.4.2.	Muestras analizadas y RV detectados por semana epidemiológica (SE).....	40
4.4.3.	Síntomas clínicos que presentaron los pacientes a los que se les detectó RV.....	42
4.4.4.	Detección de RV en relación a otros VR.....	44
5.	DISCUSIÓN.....	49
6.	CONCLUSIONES.....	54
7.	BIBLIOGRAFIA.....	56
8.	ANEXOS.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Árbol filogenético de RV	4
Figura 2 Estructura genómica de RV	6
Figura 3 Estructura de los RV.....	7
Figura 4 Replicación de RV en el citoplasma celular	9
Figura 5 Algoritmo de vigilancia epidemiológica en personas con síntomas respiratorios agudos con criterio de internación.....	14
Figura 6 Estructura Química de Nucleótidos de ADN, ARN Y LNA	23
Figura 7 Algoritmo de Trabajo.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de Q-RT-PCR desarrollados por CDC.....	30
Tabla 2 Secuencia de Primer Forward con las modificaciones introducidas	31
Tabla 3 Programa de Ciclado de Q-RT-PCR	31
Tabla 4 Resultados del análisis de las distintas diluciones de RNA liofilizado de RV	36
Tabla 5 Síntomas observados en pacientes a los que se les detectó RV.	43

ABREVIATURAS

°C: Grados Centígrados

AD: Adenovirus

ANF: Aspirados nasofaríngeos

ARNm: ARN mensajero

BAL: Lavado Broncoalveolar

BOS: Síndrome de bronquiolitis obliterante

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

CDHR3: Proteína de la familia relacionadas a Cadherina 3

EPOC: Enfermedad Obstructiva Crónica

ETI: Enfermedad Tipo Influenza

EV: Enterovirus

FluA: Influenza A

FluB: Influenza B

FQ: Fibrosis Quística

GC: Guanina-Citosina

hMPV: Metapneumovirus humano

HNF: Hisopos nasofaríngeos

HRRG: Hospital Regional Río Gallegos

HS: Heparan Sulfato

ICAM-1: Molécula de Adhesión Intercelular 1

IgA: Inmunoglobulina A

IgE: Inmunoglobulina E

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL: Interleuquina

INF: Interferón

IP: Proteína inducible

IRA: Infección respiratoria aguda

IRAG: Infección respiratoria aguda grave

LDLR: Receptores de lipoproteínas de baja densidad

MHC: Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad

MIP: Proteína inflamatoria de macrófagos

NAC: Neumonía adquirida en la comunidad

NCR: Regiones no codificantes

NIAID: Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas USA

OMS: Organización Mundial de la Salud, *Organización Mundial de la Salud*

ORF: Marco de lectura abierto

pb: Pares de bases

Q-RT-PCR: Retro-Reaccion en cadena de Polimerasa *en tiempo real*

RANTES: Células T normales expresadas, secretadas y reguladas bajo activación

RNA: Acido Ribonucleico

RV: Rinovirus

RV-A: Rinovirus A

RV-B: Rinovirus B

RV-C: Rinovirus C

RV-D: Rinovirus D

S. pneumoniae: Streptococcus pneumoniae

Sars-Cov-2: Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave

SNVS: Sistema Nacional de Vigilancia

TNF: Factor de necrosis tumoral

VLDLR: Receptor de lipoproteína de muy baja densidad

VR: Virus Respiratorios

VSR: Virus sincicial respiratorio

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) representan el grupo de enfermedades más frecuentes del ser humano a lo largo de la vida, predominando en la edad pediátrica, con una incidencia máxima en los menores de un año. Suponen la primera causa de consulta y también de hospitalización en menores de cinco años, originando numerosas consultas médicas en atención primaria y urgencias hospitalarias. Las IRAs representan la primera causa de mortalidad en menores de cinco años, principalmente en países en vías de desarrollo. La etiología mayoritaria está asociada a virus respiratorios (80%– 90%) (Chirinos-Saire, Reyna-García, Aguilar-Huauya, & Santillán-Salas, 2021), aunque las infecciones bacterianas suponen un agente causal importante en el caso de las neumonías. Las manifestaciones de las infecciones respiratorias víricas son muy variables, con un espectro clínico que incluye desde infecciones leves, que pueden ser atendidas de forma ambulatoria, hasta formas más graves, que precisan hospitalización de duración variable. Además, un único agente puede dar lugar a cuadros clínicos muy distintos, mientras que varios agentes infecciosos pueden dar lugar a síndromes semejantes, no diferenciables clínicamente. En su mayoría, estas infecciones sólo afectan a las vías respiratorias altas y pueden ser consideradas leves en individuos inmunocompetentes, con un curso benigno y autolimitado (catarro común, rinitis y faringoamigdalitis). Alrededor del 5% implican las vías respiratorias inferiores (bronquiolitis, bronconeumonías y neumonías) y constituyen infecciones potencialmente más graves, especialmente en pacientes con enfermedades subyacentes, inmunodeprimidos o en las edades extremas de la vida, pudiendo requerir asistencia hospitalaria (Francisco González & Calvo Rey, 2023)

En abril de 2024 el estudio de la carga Mundial de Enfermedades, Lesiones y Factores de riesgo 2021 de IRAs no relacionadas a Sars-Cov-2 estimó mediante un modelo matemático que en 2021 se produjeron 344 millones casos de IRAs bajas (sin incluir tuberculosis, tos ferina o Sars-Cov-2) y 2,18 millones de muertes, de las cuales 502.000 se produjeron en menores de 5 años y aproximadamente la mitad (254.000) ocurrieron en países con un índice socioeconómico bajo. El patógeno responsable de la mayor proporción de episodios fue S.

pneumoniae, seguido por el conjunto de virus respiratorio estudiados (excepto Influenza y Virus Sincicial Respiratorio) (Bender, y otros, 2024).

En Argentina, durante los años 2021, 2022 y 2023, se notificaron en el Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS 2.0) 763.350, 1.693.023 y 1.527.662 casos de Enfermedad Tipo Influenza (ETI) Neumonía, Bronquiolitis en menores de dos años y de Infección respiratoria aguda grave (IRAG) a los cuales la provincia de Santa Cruz aportó 11.652, 5977 y 5222 casos respectivamente (Ministerio de Salud de la República Argentina, 2022) (Ministerio de Salud de la República Argentina., 2023) (Ministerio de Salud de la República Argentina., 2024).

1.2. Taxonomía

1.2.1. Familia

Los Rinovirus (RV) pertenecen a la familia Picornaviridae y dentro de esta al género Enterovirus (EV). La familia Picornaviridae recibe su nombre del pequeño tamaño de los virus que lo conforman (del latín pico; pequeño) y al RNA de su genoma (Zell, y otros, 2017) y comprende 63 géneros que contienen 147 especies, aunque muchos virus están actualmente a la espera de clasificación. Los picornavirus pueden causar infecciones subclínicas en humanos y animales o afecciones que van desde una enfermedad febril leve hasta enfermedades graves del corazón, el hígado y el sistema nervioso central. Los Enterovirus son virus desnudos, con cápside de simetría icosaédrica y miden entre 20 y 30 nm de diámetro. La ausencia de envoltura los hace relativamente resistentes a muchos desinfectantes comunes (etanol al 70%, isopropanol y compuestos de amonio cuaternario). Son también resistentes a solventes lipídicos como el cloroformo y el éter. Son estables frente a varios detergentes y a temperatura ambiente. Son inactivados por formaldehído, glutaraldehído e hipoclorito de sodio (Carballal & Oubiña, 2015).

El género Enterovirus se clasifica en 12 especies: Enterovirus A– Enterovirus H, Enterovirus J y Rinovirus A (RV-A), Rinovirus B (RV-B) y Rinovirus C (RV-C). El prefijo "humano" no debe utilizarse en los nombres de los taxones de Enterovirus o Rinovirus ni en sus nombres individuales o abreviaturas. (Simmonds, y otros, 2020).

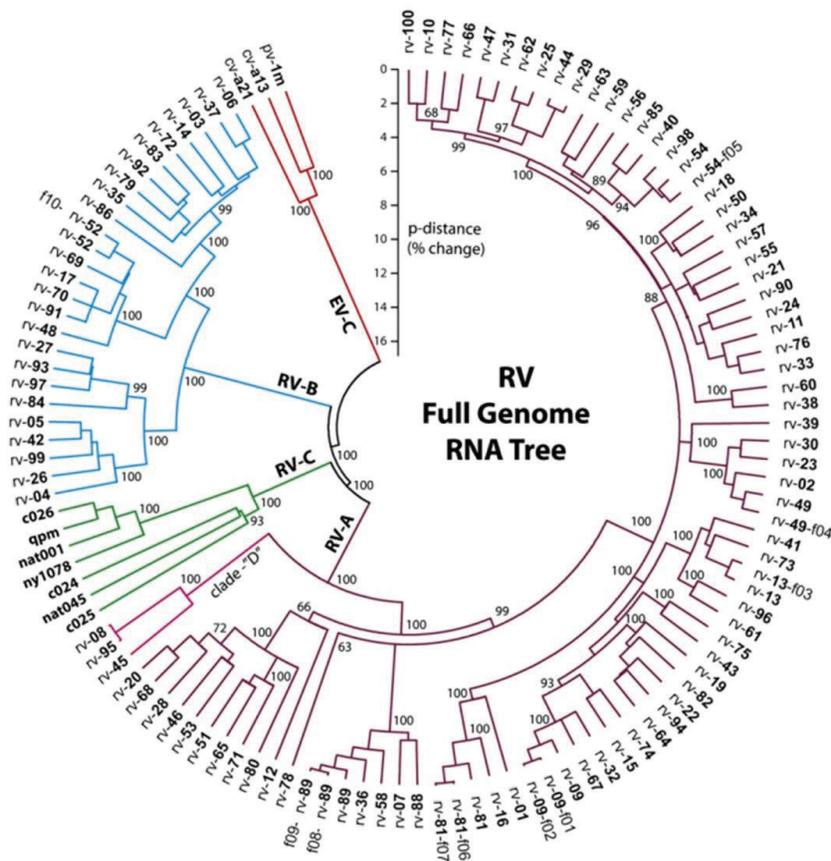
A diferencia de los RV, los enterovirus son estables a un pH bajo, pero se desconoce la base molecular de la diferencia en la sensibilidad al ácido entre los RV y los enterovirus (Blomqvist S, 2004).

Los RV, al igual que otros virus de ARN, están predispuestos a una amplia variación genética debido principalmente a la falta de actividad correctora de la ARN polimerasa dependiente de ARN que cataliza la síntesis de ARN viral. El rápido ciclo de replicación y la alta frecuencia de mutación favorecen la evolución viral y resulta en una gran diversidad genotípica y fenotípica ilustrada por el alto número de serotipos identificados: 80 RV-A, 32 RV-B y 57 RV-C (Simmonds, y otros, 2020).

Gracias al surgimiento de la secuenciación genómica, que permitió analizar el genoma viral, se pudo confeccionar el árbol filogenético de RV (figura 1), del cual se desprende que RV-A y RV-C comparten un ancestro común, un grupo hermano del ancestral RV-B. Además, la divergencia temprana de RV-C y la presencia de gran variedad de serotipos dentro de las especies RV-A y RV-B sugiere un “espacio” evolutivo dentro de RV-C lo que indica que podría haber muchos RV-C por descubrir. También se observa una clara agrupación y aparente divergencia temprana de un pequeño clado dentro RV-A denotado aquí como "clado D", lo que podría ser indicativo de que estos representan una cuarta o nueva especie emergente Rinovirus D (RV-D) (Palmenberg A. C., 2010).

Figura 1

Árbol filogenético de RV



Árbol filogenético de unión de vecinos muestra las relaciones entre los serotipos de RV creados sobre la base de secuencias genómicas completas. Las secuencias EV-C (Poliovirus 1M, coxsackievirus a13 y coxsackievirus a 21) se utilizaron como grupos externos. Las longitudes de las ramas son proporcionales a la similitud (p-distancia). Los números en los puntos de bifurcación son valores de arranque que indican la confianza de la bifurcación (100 es el máximo) (Palmenberg A. C., 2010).

Se encontró evidencia estadística altamente significativa que respalda el potencial de recombinación; no obstante, aún falta determinar el momento en que podría haber ocurrido, la frecuencia y la posibilidad de descubrir recombinantes nuevos a medida que se secuencien más RV (Palmenberg A. C., 2010).

1.3. Antecedentes Históricos

El primer aislamiento in vitro exitoso de RV se llevó a cabo pasando el virus en serie en explantes de pulmón humano en el año 1953. Pasada la mitad de la década de 1950 en dos laboratorios de Estados Unidos se aislaron agentes patógenos de lavados nasofaríngeos en cultivos de tejido renal de mono Rhesus. Luego se demostró que estas dos cepas, eran serológicamente idénticas y se denominaron Echo 28 debido a las propiedades que compartían con los Enterovirus, las cuales años más tarde fueron reclasificadas como RV-A. El gran avance en los aislamientos de RV se produjo a principios de la década de 1960 cuando Tyrrell y Parsons aislaron la cepa HGP (más tarde RV2) en cultivos de células de riñón embrionario humano imitando el entorno de la nariz (temperatura de incubación cercana a los 33°C, pH neutro del medio y leve agitación de los cultivos). Estas condiciones, junto con el desarrollo de nuevas líneas celulares, llevaron a un aumento explosivo de aislamiento de nuevas cepas muchas de las que resultaron ser antigénicamente diferentes ((Andrews, 1953) citado en (Blomqvist S, 2004)) (Prince WH, 1956) y (Pelon, 1957).

El nombre de Rinovirus fue sugerido por Andrews en 1961, más tarde, en 1963 Tyrrell y Chanock propusieron una descripción del grupo. En el año 1967, el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) iniciaron un Programa Colaborativo de Rinovirus, cuyo objetivo era comparar las relaciones antigénicas de las cepas de RV para lograr un esquema de designación aceptable. Los diferentes serotipos se clasificaron con números consecutivos conforme se iban descubriendo (Blomqvist S, 2004) (Fields, 2007) (Rudi, 2011).

Las muestras clínicas recolectadas durante las décadas de 1960 y 1970 fueron sometidas a serotipificación y condujeron a la identificación de aproximadamente 100 cepas o serotipos diferentes (conocidas como el conjunto de referencia o prototipo). A medida que la tecnología de secuenciación ha mejorado, se están descubriendo distintos RV, pero ya no se clasifican según serotipo (Palmenberg A. C., 2010).

En 2006, se describió un nuevo clado de RV mediante tipificación molecular y se propuso como nueva especie, RV-C (no cultivables in vitro y, por lo tanto, totalmente ignorados por los métodos tradicionales de aislamiento del virus), que se confirmó taxonómicamente en 2009. Antes del descubrimiento de los RV-C, el género Rinovirus había

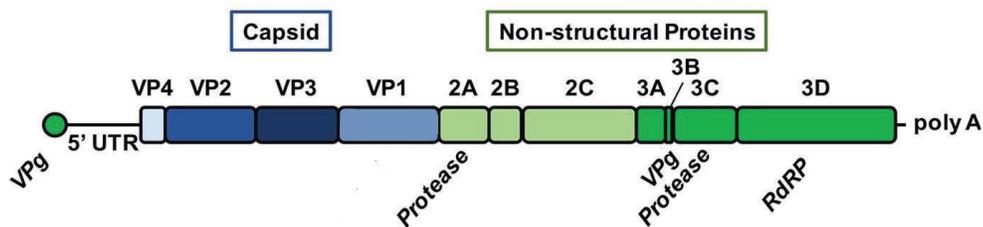
sido abolido y las especies RV-A y RV-B asignadas al género Enterovirus dentro de la familia Picornaviridae. A los RV-C se les ha asignado un nuevo esquema de denominación basado en la secuencia genética en ausencia de datos antigénicos o serológicos (Mackay, 2014) (McIntyre, Knowles, & Simmonds, 2013).

1.4. Estructura Vírica

Los RV son virus de ARN monocatenario (ss RNA) de sentido positivo de aproximadamente 7.200 pares de bases (pb) con un porcentaje de Guanina-Citosina (GC) cercano al 40% (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013). La estructura genómica de RV se puede observar en la figura 2.

Figura 2

Estructura genómica de RV



Fuente (Stobart, Nosek, & Moore, 2017).

Hay regiones no codificantes (NCR) en los extremos 5' y 3' del genoma. El 5' NCR de los RV secuenciados tiene una longitud de 610-625 bases que contiene secuencias conservadas y tramos de estructura secundaria, involucrados en el inicio de la replicación y la traducción. Una proteína pequeña, VPg, se une covalentemente al extremo 5' del genoma con su tercer aminoácido conservado, tirosina. VPg está codificada por un solo gen viral (3B), y su longitud varía en los distintos serotipos de RV de 21 a 23 aminoácidos. El 3' NCR tiene una longitud de 40 a 47 bases y el genoma termina con una cola poliadenilada (Blomqvist S, 2004) (Palmenberg A. C., 2010).

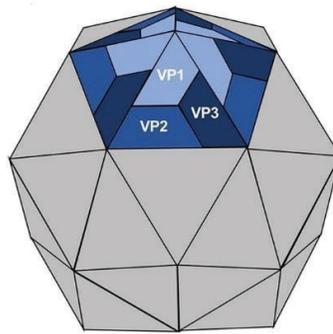
Entre las NCR 5' y 3' hay un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica una poliproteína de 2100-2200 aminoácidos de longitud. La poliproteína se traduce como un

precursor, que luego se procesa en proteínas estructurales y no estructurales individuales. La región P1 codifica las cuatro proteínas de la cápside VP4, VP2, VP3 y VP1. Las regiones P2 y P3 codifican siete proteínas involucradas en el procesamiento de proteínas y la replicación del genoma (Blomqvist S, 2004) (Palmenberg A. C., 2010).

Cuatro proteínas estructurales, VP1, VP2, VP3 y VP4, forman la cápside viral que recubre el genoma del ARN, mientras que las proteínas restantes, no estructurales, están involucradas en la replicación y el ensamblaje del genoma viral. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 son las responsables de la diversidad antigénica del virus, mientras que VP4 ancla el núcleo de ARN a la cápside (Figura 3) (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013).

Figura 3

Estructura de los RV



Fuente: (Stobart, Nosek, & Moore, 2017).

La cápside de los RV tiene simetría icosaédrica y está compuesta por 60 copias de subunidades proteicas, protómeros, cada uno de los cuales comprende una sola molécula de los cuatro polipéptidos, VP1 a VP4, siendo VP1 el más expuesto. Las proteínas VP1 a VP3 tienen la misma conformación estructural general, un barril β anti paralelo de ocho cadenas. Además, los extremos carboxilo (C) de estas 3 proteínas están ubicados en la superficie del virión, mientras que los extremos amino (N) están en el interior. La proteína de la cápside más pequeña, VP4, se encuentra en la superficie interna y está en contacto íntimo con el ARN (Blomqvist S, 2004).

La unión de las proteínas VP1, VP2 y VP3 en la cápside generan depresiones conocidas como cañones que son el sitio de unión al receptor celular. Esta disposición morfológica hace

a este sitio inaccesible a los anticuerpos, permitiendo de esta manera evadir la vigilancia inmune (Carballal & Oubiña, 2015).

1.5. Patogenia

El RV se transmite de persona a persona a través del contacto ya sea directo o a través de un fómite o aerosol. La infección por RV se inicia eficientemente por inoculación nasal y conjuntival, pero no por vía oral. En estudios de infección natural y experimental por RV, se observó que el virus se deposita regularmente en las manos y se introduce en el medio ambiente (Mackay, 2014).

Si bien 33 °C es la temperatura de crecimiento óptima para la mayoría de los RV, algunas cepas no ven significativamente obstaculizado su desarrollo a 37 °C, además los títulos alcanzados a la temperatura de las vías respiratorias bajas son suficientes para apoyar la propagación de RV en esta localización (Blomqvist S, 2004) (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013) (Papadopoulos N G, 1999).

Los RV se replican en células epiteliales polarizadas en las vías respiratorias superiores e inferiores (Figura 4). Estas especies virales, pueden clasificarse según en los receptores celulares que utilizan para su ingreso a la célula hospedadora en grupo de infectividad mayor, y grupo de infectividad menor (Basnet, Palmenberg, & Gern, 2019) (Fuchs & Blaas, 2010).

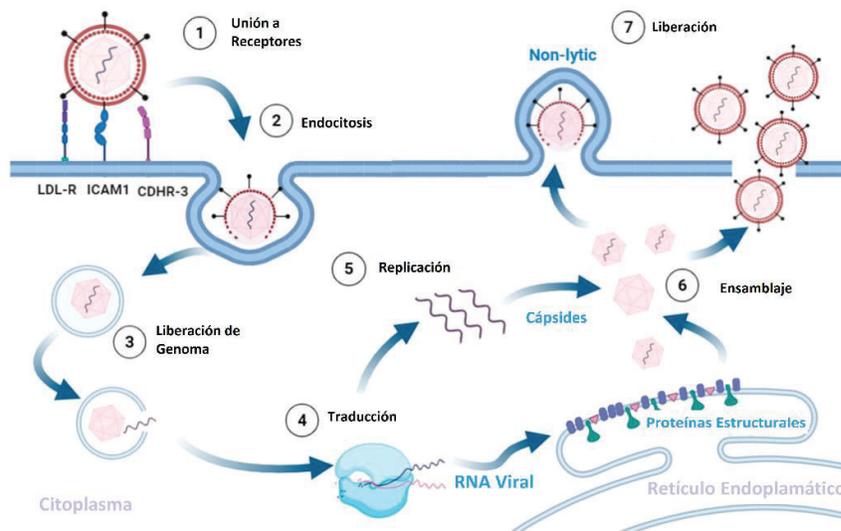
El grupo de infectividad mayor incluye a la mayoría de los RV-A y todos los RV-B. Estos utilizan la Molécula de Adhesión Intercelular 1 (ICAM-1) como su receptor celular, aunque algunos de ellos, especialmente en cultivos celulares, también son capaces de usar Heparan Sulfato (HS) como receptor alternativo. ICAM-1 es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas de proteínas de adhesión celular, y se expresa típicamente por células epiteliales, células endoteliales y leucocitos activados. Su función principal es actuar como una molécula estimuladora para la activación celular y ayuda a regular la migración de leucocitos. Presumiblemente a través de endocitosis independiente de clatrina y caveolina (Basnet, Palmenberg, & Gern, 2019) (Fuchs & Blaas, 2010).

Los virus del grupo de infectividad menor ingresan a las células a través de una vía que depende de clatrina. Dentro de este grupo se encuentran 12 tipos de RV-A, que se unen a miembros de proteínas de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR),

y todos los RV-C que utilizan la proteína de la familia relacionadas a Cadherina 3 (CDHR3). Hay al menos 3 miembros de la familia de glicoproteínas LDRL que pueden unirse e internalizar RV: el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR); el receptor de lipoproteína de muy baja densidad (VLDLR) y la proteína relacionada con LDLR (LRP). CDHR3 es una glicoproteína transmembrana que se clasifica en la superfamilia de proteínas cadherina, muchas de las cuales participan en la adhesión célula-célula dependiente del calcio u otras funciones como la vía de señalización que desencadena el desarrollo celular y la homeostasis. El descubrimiento de RV-C se retrasó 50 años respecto a otros RV debido a que en las líneas celulares estándares utilizadas por los laboratorios de diagnóstico viral no se expresa CDHR3 (Basnet, Palmenberg, & Gern, 2019) (Fuchs & Blaas, 2010).

Figura 4

Replicación de RV en el citoplasma celular



Fuente: (Kerr, Mathew, & Ghildyal, 2012)

La captación del virión en la célula pasa por diferentes rutas endocíticas, como macropinocitosis o endocitosis dependiente o independiente de clatrina, dependiendo del uso del receptor. El virus sufre un cambio conformacional dentro del endosoma debido al ambiente ácido, para formar partículas subvirales hidrófobas lo que finalmente conduce a la liberación de ARN viral en el citoplasma (Blomqvist S, 2004) (Basnet, Palmenberg, & Gern, 2019) (Kerr, Mathew, & Ghildyal, 2012). En el citoplasma celular, el genoma viral se traduce para proporcionar proteínas virales esenciales para la replicación del genoma y la producción de nuevas partículas virales. El precursor poliproteico largo primero se escinde en los

intermedios P1, P2 y P3 a través de dos proteinasas. Luego, P1 se escinde aún más para producir VP0, VP1 y VP3. VP0 se escinde en VP4 y VP2 durante el ensamblaje viral (Figura 2). Entre otras proteínas sintetizadas se encuentran la ARN polimerasa dependiente de ARN viral y las proteínas accesorias requeridas para la replicación del genoma y la síntesis de ARNm. El ARN de cadena positiva se copia en un intermedio de cadena negativa, una molécula de ARN con una secuencia de nucleótidos complementaria, que se utiliza posteriormente como plantilla para sintetizar un gran número de copias del genoma viral que se utilizan como ARNm para la traducción de más proteínas virales o, más adelante en el ciclo de infección, se empaquetan en nuevas partículas virales. La síntesis de la cadena complementaria se inicia en el extremo 3' del ARN y es cebada por la proteína VPg ((Racaniello, 2001) citado en (Blomqvist S, 2004)).

Finalmente se produce el ensamblaje y liberación de nuevos viriones infecciosos. Los protómeros se ensamblan en pentámeros, que forman una cápside icosaédrica, encerrando el genoma del RV. El paso final en la maduración del virión es la escisión de VP0 en VP4 y VP2, por un mecanismo aún desconocido. La liberación de viriones infecciosos de la célula probablemente varía entre las cepas, ya que se ha demostrado que se requieren varias vías, incluida la lisis celular y la liberación en estructuras revestidas de membrana (Kerr, Mathew, & Ghildyal, 2012).

Mientras que otros virus respiratorios, causan una destrucción de las células epiteliales de las vías respiratorias, el RV rara vez se asocia con la citopatología del tracto respiratorio superior. Sin embargo, interrumpe la función de barrera de las células epiteliales mediante la disociación de las uniones estrechas del complejo de unión estrecha, facilitando así la trans migración de patógenos (incluidos otros patógenos no RV) y sus productos (Kennedy, Turner, Braciale, Heymann, & Borish, 2012).

1.5.1. Respuesta Inmune

La infección por RV induce la expresión de ICAM-1 para aumentar la disponibilidad de receptores para que el rinovirus se una e infecte la célula, así como también induce la secreción de una amplia variedad de citoquinas y quimiocinas inflamatorias, por lo tanto, el epitelio no solo sirve como objetivo y posible reservorio para el virus infectante, sino que también es el sitio y la fuente de la respuesta inflamatoria inicial (Kelly & Busse, 2008).

Respuesta innata de las células inmunitarias Los macrófagos se activan y estimulan la producción de citoquinas pro inflamatorias tales como interleuquina (IL)-1, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interferón (INF)- γ , proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α y células T normales expresadas, secretadas y reguladas bajo activación (RANTES). IL-8 es una quimiocina potente para el reclutamiento de neutrófilos (Rudi, 2011).

Los neutrófilos son el tipo celular predominante recuperado del esputo durante las exacerbaciones agudas del asma y es probable que la activación y su degranulación contribuyan a la obstrucción de las vías respiratorias y los síntomas del tracto respiratorio inferior (Kelly & Busse, 2008).

La infección también puede inducir la infiltración y activación de eosinófilos dentro de las vías respiratorias. Estos producen y secretan ribonucleasas, incluida la neurotoxina derivada de eosinófilos y la proteína catiónica eosinofílica, que tienen propiedades antivirales. También pueden actuar como células presentadoras de antígenos en infecciones respiratorias virales para lo cual expresan en su superficie moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, cuando se estimulan con citocinas, incluido IFN- δ , GM-CSF, IL-3, IL-4, e IL-5 (Kelly & Busse, 2008).

Respuesta Adaptativa de las células inmunológicas. Tanto la infiltración de linfocitos en las vías respiratorias como la linfopenia en sangre periférica se correlacionan inversamente con los cambios en la hiperreactividad bronquial durante la infección por RV y revierten a los niveles iniciales durante la convalecencia. Las células infectadas con RV secretan RANTES e IFN- γ -proteína inducible(IP)-10, que promueve la quimiotaxis de células T a través del receptor CXCR3, altamente expresado en células CD4+, CD8+ y Natural killers. La respuesta de las células B a la infección pueden detectarse en la generación de IgA en la mucosa el día 3, seguido de IgM y, finalmente, IgG/f después de 7 a 8 días. Estos anticuerpos son específicos

de serotipo, lo que explica las infecciones recurrentes por RV, ya que existen más de 100 serotipos diferentes (Kelly & Busse, 2008) (Kelvin , Cyril, & Kwok-Yung , 2017).

1.6. Epidemiología

En el capítulo “Epidemiología de las infecciones respiratorias” publicado en el libro “Enfermedades respiratorias pediátricas” del año 2020, Luis Avendaño Carvajal y Cecilia Perret Pérez afirman que “Varios indicadores ilustran el gran impacto global que las infecciones respiratorias agudas (IRA) tienen en la salud pública, a través de la morbilidad y la mortalidad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades infecciosas respiratorias ocupan el primer lugar en el ranking de la carga de morbilidad medida por años perdidos por muerte o discapacidad. Las infecciones de las vías respiratorias inferiores representan la tercera causa de muerte en el mundo, después de las enfermedades vasculares cardíacas y encefálicas; Sin embargo, en los países de bajo estatus económico, ocupan el primer lugar” (Avendaño Carvajal & Perret Pérez, 2020).

Los RV son la causa más común de IRA si se considera la suma de todos los grupos etarios, lo que representa una carga significativa para el sistema de atención médica, así como una pérdida económica sustancial causada por el ausentismo. Aunque son considerados agentes causales de IRAs se han descuidado durante años debido a varias razones: al ser difícil su replicación a temperaturas superiores a 33°C, se consideraban improbables causantes de infecciones del tracto respiratorio inferior; además de que las infecciones causadas en el tracto respiratorio superior son autolimitadas en individuos sanos, no causan hospitalización y, en consecuencia, no sobrecargan el sistema hospitalario; por otra parte, el diagnóstico de laboratorio de estos virus era relativamente lento y costoso lo que lo hacía clínicamente irrelevante. La mayor disponibilidad de métodos de detección molecular, junto con el hecho de que los RV pueden replicarse eficientemente a temperaturas más bajas de las vías respiratorias, permitieron que las infecciones por RV sean vistas desde un punto de vista diferente (Ljubin-Sternak S. , Meštrović, Lukšić, Mijač, & Vraneš, 2021).

Distintos estudios longitudinales demuestran que los niveles de infección por RV son mayores en los bebés y niños, y decrecen a medida que la edad de las personas aumenta, probablemente debido a la mayor exposición de los adultos a este virus y a la generación previa de anticuerpos en respuesta a otras infecciones, sin embargo, los ancianos tienen el

doble de duración de la enfermedad, y complicaciones en el 62% de las infecciones por RV (Rudi, 2011) (Papadopoulos & Johnston, 2001). Los niños menores a 5 años y los niños en edad escolar tienen la tasa de positividad viral (46,9%). El virus de la gripe, el virus sincicial respiratorio (VSR) y el RV humano son los tres principales patógenos virales con proporciones del 28,5%, 16,8% y 16,7% (Li, y otros, 2021).

Desde la primera semana de 2024, se incorpora en el informe los resultados a RV y otros virus respiratorios detectados en la red de Vigilancia de Virus Respiratorios de la República de Chile. A la semana epidemiológica (SE) 17 RV es el VR más detectado con un 33,2% de positividad (Instituto de Salud Pública de Chile., 2024).

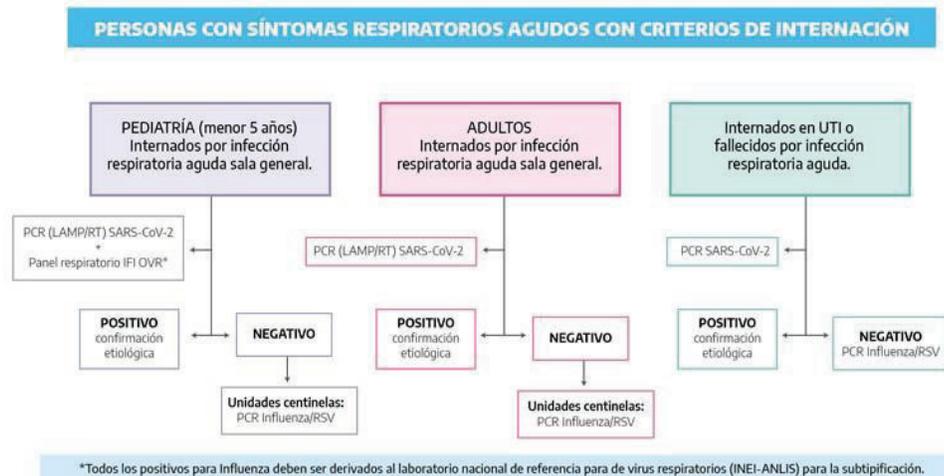
Las infecciones por RV ocurren durante todo el año, pero se observan patrones estacionales pronunciados según el tipo de clima. En los climas templados del hemisferio norte, la incidencia de infecciones por RV suele alcanzar su punto máximo durante el otoño y la primavera. Las tasas generales de enfermedades respiratorias son bajas en verano, pero los RV también se aíslan durante los meses de verano y son responsables de la mayoría de las enfermedades en este período (Blomqvist S, 2004) (Bertino, 2002) (Al-Romaihi, y otros, 2020).

1.1.1 Epidemiología de RV en Argentina

En Argentina, se analizan por inmunofluorescencia VSR, Influenza A y B (FluA, FluB), Parainfluenza 1, 2 y 3, y Adenovirus (AD); Los resultados negativos de Influenza A y B se confirman por Q-RT-PCR según corresponda, siguiendo el algoritmo de trabajo propuesto por la Red Nacional De Virus Respiratorios. A partir del año 2020, como consecuencia de la pandemia mundial de SARS-CoV-2, se incorporó la detección molecular de este patógeno, y en el mes de mayo de 2022, como estrategia para fortalecer la vigilancia de virus respiratorios se sumó la detección molecular de VSR (Ministerio de Salud Argentina, 2023). La figura 5 resume el algoritmo de vigilancia epidemiológica en personas con síntomas respiratorios agudos con criterios de internación.

Figura 5

Algoritmo de vigilancia epidemiológica en personas con síntomas respiratorios agudos con criterio de internación



Fuente: (Ministerio de Salud Argentina, 2023).

Durante el año 2023, en el marco de un estudio de efectividad vacunal para SARS-CoV-2, se implementó en el país un estudio multicéntrico en el cual participaron 6 unidades centinela ubicadas en distintas regiones del país. El algoritmo de trabajo implementado en este estudio contemplaba la detección de distintos virus respiratorios, entre los cuales se incluía el RV, mediante la técnica RT-PCR formato multiplex a partir de las muestras SARS-CoV-2 no detectables. Si bien estos resultados no están disponibles por el momento, se espera que los mismos representen un gran aporte a la epidemiología de RV a nivel nacional.

Dado que RV no está incluido dentro de la vigilancia de laboratorio de VR no se conoce la tasa de positividad nacional, sin embargo, estudios recientes realizados en Buenos Aires, Santa Fe, Mar del Plata y Tucumán muestran que el porcentaje de positividad para RV oscila entre 38,1% y 56%, siendo los más susceptibles los menores de 2 años y que el porcentaje de coinfecciones se encontró entre el 12% y el 13%, principalmente RV/VSR y RV/hMPV en segundo lugar. En cuanto a la estacionalidad, al igual que la literatura internacional, todos los autores concuerdan con que se detectó RV durante todo el año, y dos de ellos documentaron picos estacionales en otoño y primavera (Marcone, y otros, 2013) (Rudi, y otros, 2015) (Lerman , Navarro Albarracin, Figari, Macías Láinez, & Uez, 2023) (Zamora , y otros, 2016) (Zamora, y otros, 2019).

Cabe aclarar que las publicaciones mencionadas previamente corresponden a ciudades con climas templados y subtropicales, pero faltan datos epidemiológicos del comportamiento del RV en climas fríos.

Actualmente no existe una vacuna frente a RV y los tratamientos se limitan a paliar los síntomas ya que tampoco se ha desarrollado un tratamiento antiviral específico (Gómez Perosanz, 2023)

1.7. Manifestaciones Clínicas

1.7.1. Infecciones Asintomáticas

Los primeros estudios que utilizaron el aislamiento de cultivo de tejidos para detectar RV en las secreciones nasales de pacientes con síntomas de resfriado sub informaron la frecuencia de infecciones por RV. Desde el advenimiento de la detección basada en ácidos nucleicos, es posible discernir de manera más confiable la prevalencia real de la infección por RV. Sin embargo, la aplicación de técnicas de detección sensibles basadas en PCR condujo inmediatamente a un dilema con respecto a la cuestión de la prevalencia de la infección asintomática con RV. El RV se detecta mediante RT-PCR en aproximadamente el 12-22% de los individuos asintomáticos. Muchos de estos pueden ser falsos positivos. Alternativamente, si estos reflejan una colonización no infecciosa, no es obvio un mecanismo para la supervivencia a largo plazo del RV en las narinas en ausencia de infección. Sin embargo, un estudio de individuos asintomáticos con pruebas PCR positivas para RV encontró que la infección asintomática generalmente se asociaba con infección sintomática simultánea en miembros de la familia. Asimismo, en un modelo de infección experimental con RV en voluntarios se observó que entre el 20 y 30% de los mismos se mantuvieron asintomáticos (Kennedy, Turner, Braciale, Heymann, & Borish, 2012) (Jartti, Jartti, Peltola, Waris, & Ruuskanen, 2008) (Carballal & Oubiña, 2015).

1.7.2. Manifestaciones en vías aéreas superiores

Resfrío Común. RV es el principal agente etiológico del resfrío común, enfermedad autolimitada en huéspedes inmunocompetentes, con un periodo de incubación promedio de 2 días. La respuesta inmune del huésped a la replicación viral de RV es la principal causa de los

signos y síntomas que este experimenta. Entre estos podemos enumerar los siguientes: rinorrea, congestión nasal, dolor de garganta, tos, dolor de cabeza, fiebre y malestar general. Estos suelen durar de 7 a 14 días. (Rudi, 2011) (Mackay, 2014) (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013).

Otitis y Sinusitis. La inflamación que resulta del daño mucociliar disminuye la ventilación en el oído medio y aumenta la cantidad de mucus en la trompa de Eustaquio, lo que lleva a la sobreinfección bacteriana y a la acumulación de fluidos, en los que se han detectado RV en el 40% de los niños con otitis media. También se han encontrado RV en cepillados sinusales de pacientes con sinusitis; una proporción menor de estos pacientes, presentaba coinfección con bacterias (Carballal & Oubiña, 2015).

1.7.3. Manifestaciones en vías aéreas inferiores

Como ya fue mencionado, en su mayoría, estas infecciones afectan a las vías respiratorias altas y pueden ser consideradas leves en individuos inmunocompetentes, con un curso benigno y autolimitado (catarro común, rinitis y faringoamigdalitis). Alrededor del 5% implican las vías respiratorias inferiores, así como también es capaz de predisponer a neumonía bacteriana secundaria al aumentar los niveles de elastasa de neutrófilos y disminuir los niveles de péptidos antimicrobianos (Kelvin , Cyril, & Kwok-Yung , 2017) (Mallia, y otros, 2012) (Blomqvist S, 2004).

Bronquiolitis. La bronquiolitis es una de las afecciones respiratorias infecciosas más comunes de la primera infancia y la principal causa de hospitalización en lactantes. El patógeno más común asociado con la bronquiolitis grave que requiere hospitalización es VSR y el segundo más común es el RV. Los niños con bronquiolitis por RV pueden tener ciclos clínicos agudos más cortos y puede estar en mayor riesgo de sibilancias recurrentes y asma en comparación con los niños con bronquiolitis por VSR. Como el desarrollo pulmonar comienza a las 4 semanas de gestación y continúa hasta la primera infancia, la infección por RV puede tener efectos directos e indirectos graves en los tejidos pulmonares (Gern J. E., 2009) (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013).

Neumonía adquirida en la comunidad (NAC). Varios estudios clínicos de niños hospitalizados con NAC han establecido al RV como un patógeno común en dicha afección. Las manifestaciones clínicas son potencialmente graves e incluyen el requerimiento de asistencia

mecánica respiratoria y una internación promedio de 7 días, particularmente en niños con afecciones médicas crónicas subyacentes. Los posibles mecanismos incluyen infección o colonización con RV que predispone el tracto respiratorio inferior a una infección secundaria, o el RV puede causar neumonía viral primaria (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013) (Louie, y otros, 2009).

Exacerbaciones del Asma. A partir de mediados de la década de 1990, utilizando diagnósticos virales basados en PCR, se detectaron infecciones respiratorias virales en hasta el 85% de las exacerbaciones de asma en niños y en aproximadamente la mitad de las exacerbaciones en adultos. Además, aproximadamente dos tercios de las infecciones asociadas con las exacerbaciones del asma fueron causadas por RV (Gern J. , 2012).

La atopia es una condición común en el asma con rinitis alérgica que ocurre en hasta el 80% de los pacientes asmáticos. Los anticuerpos IgE elevados contra los alérgenos transportados por el aire son un marcador para los pacientes con mayor riesgo de síntomas del tracto respiratorio inferior con infecciones virales. Esta sensibilización alérgica con la exposición a alérgenos puede aumentar la probabilidad de infección por RV al aumentar la expresión de ICAM-1 en células epiteliales del tracto respiratorio. Además, en algunos sujetos con asma se ha observado una respuesta antiviral innata alterada, particularmente una reducción en la producción de IFN. Esta anomalía también se refleja en una reducción de la apoptosis de las células epiteliales en respuesta a la infección por RV, un deterioro de la actividad antiviral innata que da como resultado un aumento de la replicación del RV en las células epiteliales bronquiales. Estos defectos asociados con el asma conducirán a una eliminación deficiente del RV, infecciones más graves y una mayor persistencia de este virus en las vías respiratorias inferiores, lo que provoca una mayor inflamación de las vías respiratorias y conduce a disminución en el flujo espiratorio máximo, así como a síntomas del tracto respiratorio inferior más severos y duraderos (Kelly & Busse, 2008).

Por otra parte, las infecciones virales que se propagan en las vías respiratorias inferiores son el principal desencadenante de sibilancias episódicas en los niños.

Dado que tanto la sensibilización alérgica como las sibilancias inducidas por virus son factores de riesgo independientes para el desarrollo del asma y la combinación de estos dos factores aumenta significativamente la probabilidad de desarrollo de esta enfermedad (Jamieson, Warner, Leigh, & Proud, 2015).

Exacerbaciones de Enfermedad Obstructiva Crónica (EPOC) La gran mayoría de las exacerbaciones de EPOC tienen una etiología infecciosa. En el año 2011 en el Departamento de Medicina Respiratoria, Instituto Nacional del Corazón y los Pulmones, Imperial College London, Reino Unido desarrolló un modelo de exacerbación de la EPOC que apoya firmemente una relación causal entre la infección por RV y las exacerbaciones de la EPOC. La infección experimental por RV en sujetos con EPOC produjo síntomas como la obstrucción del flujo de aire e inflamación neutrofílica de gravedad y duración significativas. La carga viral en el esputo se correlacionó fuertemente con los marcadores inflamatorios y la producción de IFN- β por los macrófagos de las vías respiratorias se vio afectada en los pacientes con EPOC. Además, la infección experimental por RV en pacientes con EPOC condujo a un aumento en el nivel de IL-6 en el Lavado Broncoalveolar (BAL) La naturaleza de la respuesta inflamatoria en las exacerbaciones de la EPOC sigue siendo controvertida y no existe un único marcador inflamatorio celular o molecular que defina una exacerbación (Sykes, Mallia, & Johnston, 2007) (Mallia , y otros, 2011).

Exacerbaciones pulmonares en pacientes que padecen Fibrosis Quística (FQ). En pacientes con FQ, las manifestaciones pulmonares debido a la infección bacteriana crónica son la principal causa de morbilidad y mortalidad. Aunque la FQ es un trastorno genético hereditario, la infección crónica latente con *Pseudomonas aeruginosa* resulta en una pérdida progresiva y lenta de la función pulmonar. Además, los pacientes experimentan episodios de exacerbaciones agudas debido a la infección de nuevos agentes infecciosos. La infección por RV en pacientes con FQ ha demostrado aumentar los síntomas respiratorios inferiores, lo que a su vez requiere el uso prolongado de antibióticos intravenosos y hospitalización. Esto sugiere que RV puede sinergizar con la flora bacteriana existente para exacerbar la enfermedad. La infección bacteriana puede suprimir las respuestas inmunes innatas a la infección viral posterior, incluyendo la producción de INF- α e INF- β , particularmente en las células de FQ, que muestran un aumento del estrés oxidativo. Esto puede conducir a la persistencia viral y prolongar las respuestas inflamatorias, aumentando así la duración y la gravedad de la enfermedad pulmonar (Chattoraj, y otros, 2011).

1.7.4. Infecciones en pacientes inmunocomprometidos

Si bien la enfermedad del adulto con RV generalmente sigue un curso leve, los adultos inmunocomprometidos pueden desarrollar una enfermedad más grave, incluidas infecciones de las vías respiratorias inferiores y una mayor mortalidad. La gravedad de la infección es similar a la de la influenza A (pH1N1). Por otro lado, la infección por RV puede llegar a la cronicidad en pacientes receptores de trasplante de pulmón. Si la infección por RV afecta los resultados del trasplante, como el rechazo agudo y el desarrollo del síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS), no se comprende bien debido al pequeño número de pacientes en estudio (Kraft, y otros, 2012) (Kaiser, y otros, 2006) (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013).

El RV causa infecciones del tracto respiratorio superior e inferior en pacientes con neoplasias malignas hematológicas y receptores alogénicos de trasplante de células madre hematopoyéticas; sin embargo, la frecuencia relativa y la gravedad de la infección por RV en comparación con las de otros patógenos virales respiratorios aún no se han dilucidado. La progresión a neumonía por RV es poco común, pero se asocia con morbilidad y mortalidad sustanciales. En la mayoría de los casos reportados de RV en las vías respiratorias inferiores, la co-infección con uno o más co-patógenos bacterianos, virales y / o fúngicos está presente (Murali, y otros, 2009).

1.8. Diagnóstico

Debido a la superposición de síntomas entre virus, es necesario realizar pruebas para saber con certeza qué patógeno está causando la enfermedad. Aunque no son necesarias en todas las situaciones, las pruebas de detección de enfermedades respiratorias son necesarias cuando podrían afectar las decisiones de atención y tratamiento, el control de infecciones o la vigilancia epidemiológica.

1.8.1. Recolección y conservación de muestras

Las muestras deben recogerse para el diagnóstico de laboratorio tan pronto como sea posible después de la aparición de los síntomas. Los títulos de RV son más altos en el tracto respiratorio durante los primeros 2 días de presentación, aunque el virus puede aislarse desde el día 1 hasta 6 días después del inicio de los síntomas. Para la investigación de infecciones del

tracto respiratorio superior, se prefieren los hisopos nasofaríngeos (HNF) o aspirados nasofaríngeos (ANF) en lugar de los hisopos orofaríngeos. Las muestras de lavado nasal también son una buena fuente de virus para la detección de RV, aunque no son óptimas para otros virus respiratorios. Para las infecciones del tracto respiratorio inferior, las muestras pueden incluir aspirado traqueal o bronquial, líquido BAL o, con menos frecuencia, muestras de biopsia pulmonar. Los hisopos deben colocarse en un medio de transporte viral o solución fisiológica. Si las muestras son analizadas en el corto plazo pueden conservarse refrigeradas en heladera a 4°C, pero si el análisis va a realizarse pasadas las 72 horas de recolectada la muestra esta debe conservarse a -70°C (Versalovic, 2011) (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013) (National Center for Immunization and Respiratory Diseases Centers for Disease Control and Prevention, 2019).

1.8.2. Detección de antígenos y serología

Dado que no existe un antígeno común entre los más de 100 serotipos de RV descritos hasta el momento, los ensayos de detección de antígenos no se utilizan para la detección de rutina. Los anticuerpos se miden en las secreciones séricas y nasales mediante neutralización, reducción del aplanca, fijación del complemento y enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) en entornos de investigación. Sin embargo, al igual que con los ensayos de antígenos, la falta de un antígeno común en todas las cepas de RV hace que la detección de respuestas de anticuerpos no sea práctica a fines de diagnóstico. Además, los anticuerpos no son detectables durante una a tres semanas después de la infección. Por lo tanto, aunque la medición de anticuerpos es útil para estudios epidemiológicos, no es útil para diagnosticar infecciones agudas (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013) (Blomqvist S R. M., 2002) (BarclayW, 1988).

1.8.3. Cultivo virológico convencional

El aislamiento en cultivo celular es el método tradicional de detección de laboratorio para RV, crecen eficientemente sólo en líneas celulares derivadas de tejidos humanos o de otros primates, no en huevos embrionados o ratones lactantes. La susceptibilidad de las diferentes líneas celulares a los serotipos de RV varía considerablemente, y el aislamiento máximo se obtiene con combinaciones de células pulmonares embrionarias humanas (WI-38 o MRC-5) y células HeLa, que se seleccionan por la sobreexpresión de ICAM-1. Las condiciones

óptimas propuestas para el aislamiento de RV en cultivos celulares incluyen un medio de cultivo con un pH de 7,0-7,2, una temperatura de incubación de 33°C y una rotación lenta de los cultivos. Se ha demostrado que algunos prototipos de RV y cepas de tipo salvaje se replican tan eficientemente a 37 °C como a 33 °C, siendo la replicación de ciertas cepas de tipo salvaje incluso mejor a 37 °C. Se sabe que complementar los medios de cultivo con iones Mg²⁺ + aumenta la recuperación de algunos serotipos de RV (Blomqvist S, 2004) (Papadopoulos N G, 1999).

El crecimiento del virus en monocapas celulares se detecta por la manifestación de cambios característicos visibles en los cultivos a la observación directa con el microscopio óptico llamados efectos citopáticos (ECP). El ECP producido por los RV y los Enterovirus es tan similar que la diferenciación se logra analizando la sensibilidad al ácido de los aislados virales. La confirmación del efecto citopático de los virus aislados se puede realizar por neutralización, inmunofluorescencia o RT-PCR a partir del sobrenadante del cultivo (Blomqvist S, 2004) (Carballal & Oubiña, 2015).

El uso de esta metodología para diagnóstico de rutina de RV en los laboratorios de virología clínica no se ha implementado debido a la imposibilidad de algunas cepas para propagarse en cultivos celulares; la dificultad y el tiempo que demanda el aislamiento; la ineficacia del ensayo de labilidad ácida para diferenciar ciertas cepas de RV de Enterovirus; y la extrema variabilidad antigénica (Blomqvist S, 2004).

1.8.4. Métodos de cultivo rápido

A continuación, se mencionan algunos métodos de cultivo rápido para detectar RV que por diferentes inconvenientes metodológicos no se aplican en el diagnóstico de rutina:

Métodos que utilizan un portaobjetos multicámara con células HeLa susceptibles a RV combinadas con detección de antígenos virales mediante inmunofluorescencia a las 48 horas de la infección. A pesar de tener una sensibilidad de detección razonable la ausencia de un antígeno común dificulta el desarrollo de reactivos de inmunofluorescencia fiables y específicos ((Al-mulla W, 1994) (Landry M L, 2000) citados en (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013)) .

Cultivos mejorados por centrifugación se pueden teñir antes del desarrollo de EPC con algunos reactivos de detección de Enterovirus que reacciones de forma cruzada con RV; Sin embargo, los laboratorios se quedan sin un diagnóstico específico (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013).

Un gran estudio prospectivo informó el uso de un método de cultivo mejorado por centrifugación con células HuH7 en microplacas seguido de RT-PCR para RV en cultivos que fueron EPC positivos dentro de los 4 días. Este método había sido validado previamente para un gran número de genotipos de RV, así como muchos otros virus respiratorios. Sin embargo, los autores de ese estudio no informaron la sensibilidad de detección en comparación con la de la aplicación directa del ensayo RV RT-PCR a las muestras o cómo se comparó con el cultivo convencional con otras líneas celulares (FreymuthF, 2005) citados en (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013)).

1.8.5. Cultivo de órganos

Los primeros aislamientos de RV se realizaron mediante el cultivo de órganos de epitelios nasales o traqueales, en la actualidad se siguen usando estas técnicas sólo en ámbitos de investigación para el estudio de la patogénesis de RV, no así en laboratorios de diagnóstico clínico (Hoorh, 1965) (Bochkov, 2011) (JangYJ, 2005) citados en (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013)).

1.8.6. Amplificación de ácidos nucleicos mediante RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar selectivamente secuencias de ADN o ARN (luego de una transcripción reversa, RT) produciéndose grandes cantidades de ADN de longitud y secuencia definida a partir de ácidos nucleicos (secuencia blanco) presente en la muestra (Carballal & Oubiña, 2015).

A finales de la década de 1980 se comenzaron a desarrollar las primeras RT-PCR para detectar RV. Desde ese entonces la región 5'NCR ha sido la secuencia blanco utilizada, pero en los primeros ensayos se presentaba el inconveniente de que las regiones amplificadas también estaban presentes en otros Enterovirus. Si bien esta dificultad de ninguna manera resta valor a la importancia de respaldar la toma de decisiones clínicas utilizando estos ensayos, hace que no sean lo suficientemente específicos para caracterizar a los RV en

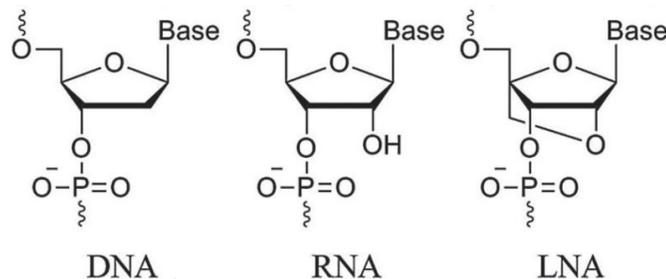
particular. Para sortear este obstáculo se requiere un procesamiento posterior a la amplificación mediante electroforesis en gel, hibridación por sonda, secuenciación o análisis de restricción. A partir del año 2008, gracias a la secuenciación una porción de la secuencia 5'NCR de todas las cepas prototipo de RV y de múltiples aislados de muestras clínicas circulantes, se desarrollaron ensayos de Q-RT-PCR específicos para RV. ((Gama, 1988) citado en (Mackay, 2014)) (Rudi, 2011) (Lu, 2008).

En 2019 el Laboratorio de Virus Respiratorios de la División de Enfermedades Virales del CDC, Atlanta, EEUU, desarrolló un protocolo actualizado para determinar Virus Respiratorios No influenza por ensayos de Q-RT-PCR entre los que se incluye RV (National Center for Immunization and Respiratory Diseases Centers for Disease Control and Prevention, 2019).

El protocolo mencionado utiliza oligonucleótidos que en su secuencia incluye Aptámeros. Los aptámeros son secuencias de ADN o ARN de cadena sencilla que adoptan la forma de estructuras tridimensionales únicas, lo cual les permite reconocer un blanco específico con gran afinidad. En este caso se emplea una modificación de nucleótidos llamada Ácido Nucleico Bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés, Locked Nucleic Acid). En los nucleótidos LNA, la ribosa está bloqueada por un enlace oximetileno que conecta los átomos de carbono C2' y C4', imponiendo una restricción conformacional (ver figura 6) (Ospina, 2020) (Karlsen & Wengel, 2012).

Figura 6

Estructura Química de Nucleótidos de ADN, ARN Y LNA



Fuente: (Karlsen & Wengel, 2012).

Los oligonucleótidos de LNA se han convertido en una herramienta importante en disciplinas bioquímicas como la investigación, el diagnóstico y el desarrollo terapéutico debido a su afinidad de unión sin precedentes hacia cadenas complementarias (Veedu & Wengel, 2009).

1.8.7. RT-PCR formato multiplex

Esta técnica combina targets para cada virus en una sola prueba lo cual permite poder distinguir entre diferentes patógenos respiratorios con mayor precisión y rapidez de manera tal que el médico pueda definir tratamientos y protocolos adecuados en beneficio del paciente. Entre las ventajas de estas nuevas tecnologías se destacan su capacidad para proporcionar alta sensibilidad y especificidad, tiempos de respuesta rápidos, alto rendimiento y la capacidad de detectar coinfecciones a partir de una sola muestra de paciente. Esta última ventaja es particularmente importante, ya que en varias publicaciones se menciona la elevada frecuencia de la detección de RV en presencia de otros virus respiratorios, siendo la combinación RV/RSV la más frecuente (Horemheb-Rubio, y otros, 2022). En Argentina se encuentran disponibles kits comerciales que se basan en esta tecnología como VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit (ANEXO A), CD Genomics Kit de Detección de Virus Respiratorios, entre otros.

1.8.8. Paneles de amplificación de ácidos nucleicos virales mediante “Microarrays”

Esta técnica consiste en la extracción de ARN de muestras biológicas. Luego se copia el ARN, mientras se incorporan nucleótidos fluorescentes o una etiqueta que luego se tiñe con fluorescencia. El ARN marcado se hibrida a una micromatriz durante un período de tiempo, después del cual el exceso se lava y la micromatriz se escanea bajo luz láser. Los microarrays pueden detectar miles de objetivos virales, pero son costosos para el uso rutinario y no son lo suficientemente sensibles como para evitar una amplificación por PCR previa a la hibridación cuando se utilizan muestras clínicas. Por otra parte, es posible que con este tipo de ensayo exista reactividad cruzada entre RV y EV por lo que deben notificarse como indistinguibles (Butte, 2002) (Mackay, 2014) (Pan, 2021).

1.8.9. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos por NASBA

La reacción de amplificación completa se realiza a la temperatura predefinida de 41 °C. Tres enzimas están involucradas en esta reacción isotérmica: la transcriptasa inversa (RT), la RNasaH y la T7 ARN polimerasa. La secuencia cíclica de esas actividades enzimáticas remeda la replicación de los retrovirus. Después de un breve período de incubación a 65°C para desnaturalizar el objetivo, un cebador directo específico se hibrida con el ARN. Este cebador no sólo posee una secuencia complementaria al ARN diana, sino que también incluye una secuencia 5' correspondiente al promotor de la T7 ARN Polimerasa. A los 41°C, el cebador se extiende por la actividad de la RT. Simultáneamente, el ARN del híbrido ARN-ADNc formado será degradado por la RNasaH. Esto permite la hibridación de un cebador inverso específico con el ADNc. La extensión de este cebador por la RT hasta el extremo 5' del ADNc da como resultado la formación de una secuencia promotora T7 de doble cadena el cual luego será utilizado por T7 ARN polimerasa para producir muchas moléculas de ARN nuevas que son complementarias al ARN objetivo. Después de esta fase de iniciación, NASBA ahora entra en la fase de amplificación(cíclica). Una evaluación clínica mostró un rendimiento comparable al de la RT-PCR y una sensibilidad superior a la del cultivo (Carballal & Oubiña, 2015) (Deiman, 2002) (Lorens, y otros, 2006) citado en (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013)).

1.8.10. Genotipado

Debido al alto número de RV y la alta frecuencia de infecciones, los métodos de genotipado se han convertido en un complemento esencial para comprender la epidemiología de RV. La secuenciación de nucleótidos de la VP1, 5'NCR junto con las regiones VP4 y VP2 (en adelante VP4/VP2) ha reemplazado a los métodos serológicos tradicionales, debido a su velocidad y necesidad de menos reactivos especializados. Debido a su menor longitud, mayor conservación de la secuencia y la posibilidad de utilizar el mismo conjunto de cebadores para la amplificación de las tres especies de RV, la región VP4/VP2 ha sido la más utilizada para la caracterización genética de la RV en muestras clínicas. La comparación de su valor predictivo en comparación con las asignaciones de tipo basadas en secuencias VP1 proporciona evidencia de su idoneidad para la identificación del tipo RV junto con algunas restricciones (McIntyre, Knowles, & Simmonds, 2013) (Mackay, 2014).

La utilidad de la caracterización genética de RV es principalmente determinar la fuente de brotes e investigación de parentesco a la aparición de una cepa no caracterizada previamente por lo que se relega mayoritariamente a las instancias de investigación. Debido a esto, los estudios de epidemiología molecular de RV tienden a ser más pequeños y enfocados en una enfermedad o pregunta de investigación específica (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013) (Mackay, 2014).

1.8.11. Secuenciación del genoma completo

Con la creciente disponibilidad de técnicas para la secuenciación del genoma completo, es factible que más laboratorios puedan realizar estos métodos en aislados clínicos de RV. El aumento del volumen de datos ayudará a identificar regiones genómicas adicionales para el análisis. Además, podría proporcionar una mejor comprensión de los cambios evolutivos, incluida la recombinación. Mediante esta tecnología se detectaron varias secuencias similares a RV previamente desconocidas en pacientes con enfermedades similares a la influenza asociadas con compromiso respiratorio severo no cultivables in vitro con lo que se pudo identificar la especie RV-C y así como también permitió graficar el árbol filogenético de RV (Palmenberg, y otros, 2009) (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013).

Como los costos de secuenciación se han reducido drásticamente, en algunos laboratorios la secuenciación ahora es una rutina. La secuenciación no solo descubrió el RV-C, sino que permite el estudio de la similitud filogenética de las infecciones por RV en una persona a lo largo del tiempo; también es una herramienta increíblemente poderosa para comprender la rotación viral dentro de la comunidad (Gregory & Oliver, 2019).

1.9. Fundamentación

Los RV muestran un gran potencial como posibles agentes etiológicos de enfermedades respiratorias. La implementación de técnicas de diagnóstico, rápidas y de alta sensibilidad, facilitan su detección y caracterización a nivel local. La ciudad de Río Gallegos es la Capital de la Provincia de Santa Cruz, se encuentra ubicada a 2500 km de Buenos Aires, tiene una población de 129.378 habitantes de los cuales 30.732 son menores de 15 años (Dirección Provincial de Estadística y Censos). Además, por su ubicación geográfica, esta ciudad recibe un importante afluente de turistas provenientes de todas partes del mundo durante todo el año, lo que permitiría la introducción por importación de nuevas cepas que se sumarían a la circulación local. Se espera que la información generada en este trabajo represente un aporte al diagnóstico y la prevención de las enfermedades asociadas a estos virus.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Generales

Implementar la técnica de Q-RT-PCR para diagnóstico de RV, en muestras clínicas de pacientes menores de 15 años, con IRA alta o baja internados en las Salas de Neonatología y Pediatría en el HRRG.

2.2. Objetivos Específicos

- 1.** Adaptar, estandarizar y evaluar el protocolo de Q-RT-PCR desarrollada por el Laboratorio de Virus Respiratorios de la División de Enfermedades Virales del CDC, Atlanta, EEUU para diagnóstico de RV.
- 2.** Evaluar la distribución de la detección de RV por grupo etario y sexo en la población estudiada.
- 3.** Analizar el porcentaje de positividad de RV y la incidencia acumulada por SE de IRA debido a RV en la población objetivo.
- 4.** Describir los síntomas clínicos con que se manifestaron en los pacientes a los con RV.
- 5.** Evaluar la frecuencia de la detección de RV en relación a otros VR detectados en los pacientes estudiados.
- 6.** Comparar los resultados obtenidos con los de otras regiones del país, a fin de establecer concordancia o ausencia de ella en patrones de comportamiento viral previamente observados, en relación a condiciones climáticas similares o no.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Universo y ubicación del estudio

Este trabajo de tesis se basó en un protocolo de amplificación de ácidos nucleicos propuesto por el Laboratorio de Virus Respiratorios de la División de Enfermedades Virales del CDC, Atlanta, EEUU. El mismo fue adaptado modificando la secuencia de oligonucleótidos original.

Una vez estandarizado y verificado el método, se realizó un estudio descriptivo observacional sobre una serie de casos cuya unidad de análisis son cada una de las muestras analizadas durante el período de tiempo comprendido entre octubre de 2021 y septiembre de 2022 en la ciudad de Río Gallegos, provincia de Santa Cruz, Argentina. Se estudiaron muestras clínicas (HNF y ANF) de pacientes menores de 15 años de edad, con diagnóstico clínico de IRA, internados en las salas de neonatología, pediatría y terapia intensiva Pediátrica del Hospital Regional Río Gallegos, a los cuales se les había solicitado previamente el diagnóstico por laboratorio de virus respiratorios aplicando el protocolo de vigilancia epidemiológica desarrollado por la Red Nacional De Virus Respiratorios, de la cual el laboratorio del Hospital Regional Río Gallegos forma parte. Dicho protocolo consiste en llevar a cabo el diagnóstico Inicial de Sars-Cov-2 por Q-RT-PCR, y por inmunofluorescencia para VSR, FLU A, FLU B, Parainfluenza 1, 2 y 3 (P1, P2, P3), y AD y posteriormente, las muestras que resultan ser no detectables para los virus mencionados son estudiadas para FLU A, FLU B y VSR por Q-RT-PCR.

Este estudio fue aprobado por el Comité Central de Ética en investigación del Ministerio de Salud de la provincia de Santa Cruz, según el dictamen N° 04 CCEI/2022 (ANEXO B) para lo cual fue necesario obtener el consentimiento informado del padre o tutor legal de cada participante (ANEXO C).

3.2. Extracción de ARN Viral

La extracción de material genético se realizó manualmente, a partir de 400 µL del sobrenadante de muestras, utilizando kits de columnas de sílica Quick-RNATM Viral Kit Zymo Research respetando las indicaciones del fabricante (ANEXO D).

3.3. Detección de RV por Q-RT-PCR

Para la detección de RV, se adaptó el protocolo de determinación de Virus Respiratorios No Influenza mediante ensayos de Q-RT-PCR. Este protocolo fue desarrollado por el Laboratorio de Virus Respiratorios de la División de Enfermedades Virales del CDC, en Atlanta, EEUU, en el año 2019 amplificando como objetivo la secuencia 5'NCR para lo cual utiliza los oligonucleótidos detallados en la tabla 1.

Tabla 1

Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de Q-RT-PCR desarrollados por CDC

Oligonucleótidos	Secuencia 5'>3'	Concentración de Trabajo
Primer Reverse	5' GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA	50 µM
Primer Forward 1	5' CY[A] GCC [T]GC GTG GC	50 µM
Primer Forward 2	5' CY[A] GCC [T]GC GTG GT	50 µM
Sonda	5'FAM TCC TCC GGC CCC TGA ATG YGG C BHQ1	5 µM

Con respecto al protocolo adaptado, se conservaron el primer reverse y la sonda; y se reemplazaron los dos primers forward por un único primer que incluyó bases degeneradas y no contaba con los análogos de ácidos nucleicos bloqueados. La secuencia del primer forward se muestra en la tabla 2 (ANEXO E)

Tabla 2

Secuencia de Primer Forward con las modificaciones introducidas

Oligonucleótido	Secuencia 5'>3'	Concentración de Trabajo
Primer Forward	5'CYAGCCTGCGTGGY	50 µM

Para la preparación de la mezcla de reacción se utilizó el kit qScript™ One-Step qRT-PCR Kit. Se siguió la proporción de reactivos indicada en el protocolo desarrollado por CDC. También se respetaron los volúmenes de eluato y mezcla de reacción propuesta por dicho protocolo.

La amplificación se realizó en el equipo CFX 96™ Real-Time System de la marca BIORAD. Las condiciones de ciclado del protocolo se optimizaron con respecto al protocolo original del CDC y se expresan en la tabla 3 (ANEXO E). El análisis de los resultados de las Q-RT-PCR se realizó mediante el software del equipo de PCR Real Time.

Tabla 3

Programa de Ciclado de Q-RT-PCR

Step	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Transcripción Reversa	1	50°C	10 min.
Activación de Polimerasa	1	95°C	7 min 30 seg.
		95°C	15 seg.
Amplificación	45	95°C	15 seg.
		55°C	1 min.

Volumen total: 25 µl Detector: FAM

Como control negativo de amplificación se utilizó agua libre de Nucleasas.

Para descartar una posible contaminación durante el proceso de extracción de material genético en cada corrida se incluyó además un control negativo de extracción, el cual consiste en realizar el procedimiento regular en una columna de sílica, pero la muestra se reemplaza por 400 µl de agua libre de nucleasas.

Se consideró el resultado de la q-RT-PCR Multiplex para Sars-Cov-2 Logix Smart TM Coronavirus Disease 2019 que amplifica el gen humano RNAsaP como control positivo de extracción de material genético para asegurar la integridad de la muestra clínica.

Como control positivo de amplificación de RNA viral se utilizó RNA de RV que muy amablemente fue cedido por Laboratorio de Virus Respiratorios del Instituto Carlos G. Malbrán. Este RNA se extrajo de una cepa patrón de RV especie A, serotipo 14, que a su vez fue amplificado años atrás en células HEP.

Una vez que se verificó que todos los controles han funcionado correctamente, se procedió a analizar cada objetivo.

3.4. Interpretación de Resultados

Se consideró detectables a las muestras que produjeron curvas de amplificación en las que se pudo apreciar las fases: exponencial, lineal y de meseta, mientras que una línea plana o errante indicó que no hubo amplificación y se consideró a esa muestra no detectable.

3.5. Validación Analítica

La validación analítica consistió en analizar por Q-RT-PCR para RV un número determinado de repeticiones para diferentes diluciones seleccionadas del RNA liofilizado de RV purificado Amplium® RHINOVIRUS RNA CONTROL cuya concentración una vez reconstituido con 50 µl de agua libre de nucleasas fue de $1,6 \times 10^4$ copias (ANEXO F).

Las repeticiones, se clasificaron como RV detectables o RV no detectables según el criterio descrito en el apartado interpretación de resultados.

Para estimar la sensibilidad de la Q-RT-PCR se calculó el Límite de Detección (LoD) con un intervalo de confianza del 95% a través de un análisis PROBIT con el complemento Analyze-it del software Microsoft Excel.

El LoD calculado para el método desarrollado en este estudio se comparó con los valores informados por varios Kits comerciales disponibles, dado que el protocolo de referencia no informa este valor y además aclara que este ensayo es exclusivo para investigación. Cabe destacar que algunos de estos kits informan sus LoDs en copias /reacción mientras que otros utilizan copias/ μ l como unidades de medición. Para estandarizar y poder comparar los valores de LoDs, se adoptó como unidad de medida las copias/ μ l. Para ello, se consideró la cantidad de eluato a agregar según las indicaciones de cada técnica.

3.6. Validación Clínica

Para llevar a cabo la validación clínica de este ensayo, se analizó, un panel de 35 muestras respiratorias, con diagnóstico de laboratorio definido (10 RV detectables y 25 RV no detectables), cedidas gentilmente por la sección virología del Laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Emilio Coni”. Las mismas se conservaron utilizando el medio de transporte DNA/RNA Shield™ en una proporción 1:4, siguiendo las recomendaciones del fabricante y se transportaron a temperatura ambiente, en envase de bioseguridad apropiado para muestras biológicas (triple envase).

El análisis de estas muestras se realizó utilizando el protocolo estandarizado en la validación analítica, incluyendo los mismos controles de calidad, diseñado para las muestras respiratorias de los pacientes estudiados.

Para salvar el hecho de que se dispuso solamente de 10 muestras clínicas RV detectables, estas se analizaron por duplicado.

3.7. Evaluación de la Precisión

Para evaluar la precisión del método evaluado, se registró el valor de Ct del control positivo de amplificación en cada ensayo, expresados como \log_{10} . Luego, se calcularon los parámetros estadísticos de Media (\bar{X}) y desviación estándar (Sd) con sus respectivos intervalos

de confianza (IC) del 95%. Con estos datos, se elaboró un gráfico de Levey-Jennings al que se aplicaron las reglas de Westgard.

3.8. Toma de muestras

Una vez estandarizada la técnica, se aplicó en un total de 145 muestras respiratorias, 59 ANF y 86 HNF. Estas, pertenecían a 129 pacientes, ya que a 16 de estos se les solicitó diagnóstico de laboratorio de virus respiratorios en más de una ocasión. Además de llevar a cabo la detección de RV, a todas las muestras estudiadas se realizó el diagnóstico de otros virus respiratorios: VSR, FLU A, FLU B, P1, P2, P3, y AD utilizando Inmunofluorescencia. Los resultados negativos de FLU A, FLU B y VSR se confirmaron por Q-RT-PCR.

Las muestras respiratorias fueron recolectadas en 1,5 a 2 ml de solución fisiológica estéril en tubos cónicos estériles a partir de los pacientes internados que cumplían con los criterios previamente mencionados. Luego fueron remitidas al laboratorio acompañadas de sus respectivas fichas epidemiológicas (ANEXO G). Dichas muestras fueron conservadas en heladera a 4°C hasta el momento de su procesamiento siempre y cuando fueran analizadas dentro de las siguientes 72 horas. Cuando el tiempo transcurrido hasta su procesamiento fue mayor a 72 horas se mantuvieron a -80 °C.

3.9. Cálculo de parámetros estadísticos para variables demográficas y clínicas

El análisis de los resultados de las muestras de pacientes, se realizó mediante el cálculo de parámetros estadísticos descriptivos para variables demográficas y clínicas: se estimaron medianas para variables continuas y frecuencias absolutas, proporciones y sus (IC) 95% para variables categóricas.

Se realizó la prueba de hipótesis de Chi-Cuadrado Pearson (χ^2) utilizando el software InfoStat para estimar si RV afecta a algún sexo de manera significativa.

Se graficó la incidencia acumulada (IA) por semana epidemiológica (SE) siguiendo las siguientes fórmulas:

IA= número de casos nuevos en la SE / población total en riesgo al inicio de la SE.

Población total en riesgo = población total pediátrica - casos nuevos de la SE anterior.

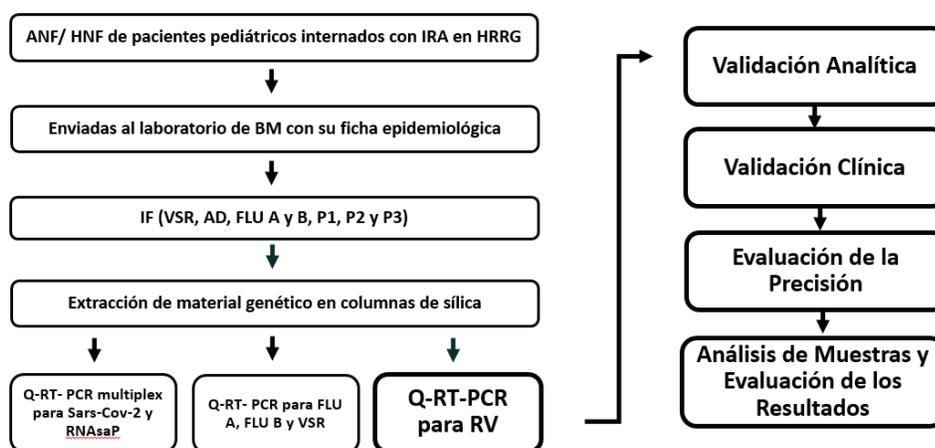
Para conocer número total de habitantes menores a 2 y 15 años en la Ciudad de Río Gallegos (2,089 y 30.732 respectivamente), se consultó a la Dirección de Estadística de la Provincia de Santa Cruz, quien compartió los datos recabados en Encuesta Permanente de Hogares del tercer trimestre 2023 realizada por el Instituto Nacional De Estadísticas y Censos (INDEC), (A. Troncoso, comunicación personal, 7 de marzo de 2024) (A. Troncoso, comunicación personal, 6 de mayo de 2024). El uso de esta fuente de datos se debe a que, a la fecha de realización de este estudio, el INDEC aún no publicó los datos demográficos por grupo etario de la ciudad de Río Gallegos recabados en el Censo Nacional de Poblaciones y Viviendas 2022 y las proyecciones del mismo del año 2010 no alcanzan a nivel local.

Para facilitar la visualización de los datos se construyeron gráficos con la ayuda del software Microsoft Excel.

Se realizó una búsqueda bibliográfica sistemática con el fin de recopilar datos sobre la frecuencia de detección de rinovirus en distintas regiones del país. Las fuentes de información consultadas incluyeron bases de datos científicas como PubMed, Scielo, y Google Scholar, así como repositorios nacionales de publicaciones médicas. Se emplearon términos de búsqueda específicos, como "rinovirus", "frecuencia de detección", "epidemiología viral", y los nombres de las regiones bajo estudio.

La figura 7 resume el algoritmo de trabajo.

Figura 7
Algoritmo de Trabajo



4. RESULTADOS

4.1. Validación Analítica

Inicialmente se analizaron concentraciones de 32, 3,2 y 0,32 Copias/ μ l de RNA liofilizado de RV purificado Amplium® RHINOVIRUS RNA CONTROL (ANEXO F) Cada dilución fue analizada en 10 repeticiones cada una. Posteriormente, al detectarse RNA viral en todas las repeticiones ensayadas, se decidió agregar diluciones mayores con concentraciones finales de 0,16 Copias/ μ l y 0,032 Copias/ μ l. Cada una de estas diluciones se repitió 20 veces. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

Resultados del análisis de las distintas diluciones de RNA liofilizado de RV

Repetición	32 Copias/ μ l.	3,2 Copias/ μ l.	0,32 Copias/ μ l.	0,16 Copias/ μ l.	0,032 Copias/ μ l.
Repeticiones	12	12	20	20	20
RV Detectable	12	12	20	16	1
RV No Detectable	0	0	0	4	19
Hit Rate	12/12	12/12	20/20	16/20	1/20

El análisis estadístico de estos resultados se llevó a cabo mediante un análisis PROBIT con el complemento Analyze-it del software Microsoft Excel, con el que se estimó el LOD con su respectivo intervalo de confianza:

LoD = 0,2397 (IC 95% = 0,1593 – 0,3605) copias / μ l (ANEXO H)

Búsqueda de Información de LoDs de Kits Comerciales y conversión de unidades:

VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit. Informa un LoD mayor o igual a 10 copias/reacción. Al utilizar 5 µl eluato de extracción en cada reacción de PCR se calcula un LoD mayor o igual a 2 copias/µl (ANEXO A)

VIASURE Rhinovirus + Enterovirus Real Time PCR Detection Kit. informa un LoD mayor o igual a 10 copias/reacción. Al utilizar 5 µl eluato de extracción en cada reacción de PCR se calcula un LoD mayor o igual a 2 copias/µl (ANEXO I)

Altona RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0. 1,25 copias/µl. (ANEXO J)

genesig® Human Rhinovirus all subtypes (generic). reporta un LoD mayor a 100 copias/reacción. Al utilizar 5 µl de eluato de extracción en cada reacción de PCR se calcula un LoD mayor a 20 copias/µl. (ANEXO K)

4.2. Validación Clínica

Al comparar los resultados informados como detectables/no detectables por el Instituto “Dr. Emilio Coni” con los obtenidos mediante la aplicación del protocolo evaluado se observó que:

Muestras detectables se obtuvo un resultado coincidente en 20/20 muestras (concordancia 100%).

Muestras no detectables se obtuvo un resultado coincidente en 24/25 muestras (concordancia 97%); en 1 de ellas se detectó RV.

4.3. Evaluación de la Precisión

Con los datos de Ct registrados (expresados como log 10) al analizar el control positivo de amplificación por Q-RT-PCR en cada ensayo se calcularon los parámetros estadísticos necesarios para construir un gráfico de Levey-Jennings (gráfico 1):

$$\bar{X} = 1,48 \text{ (IC 95\% = 1,474 – 1,485)}$$

$$Sd = 0,02 \text{ (IC 95\% = 0,017 – 0,023)}$$

Gráfico 1

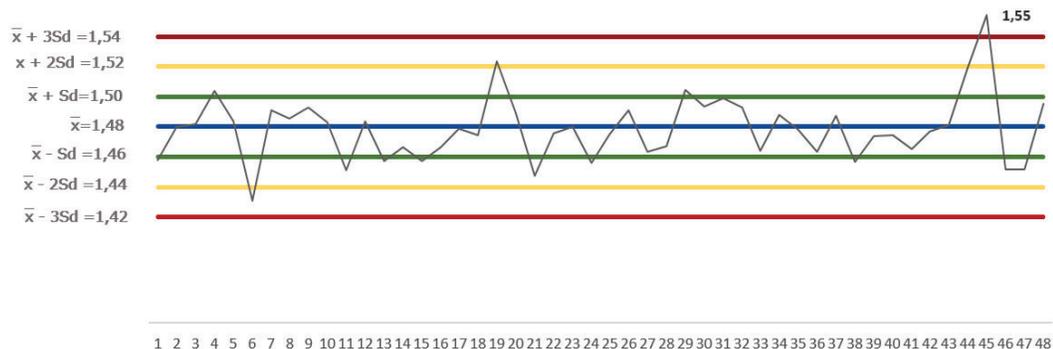


Gráfico de Levey-Jennings de los ensayos. Los valores de Ct obtenidos de analizar el control positivo de amplificación se expresan como log10.

Al aplicar las reglas de Westgard a los datos graficados previamente se observó que en el ensayo número 45 no se cumplió la regla 1-3s. Esta regla indica que si el control evaluado excede el límite de $\bar{X} + 3 Sd$ el error aleatorio es inaceptable. Debido a este inconveniente, se volvieron a analizar las muestras con una nueva alícuota de oligonucleótidos. Como se puede ver en el gráfico 5, los resultados fueron satisfactorios.

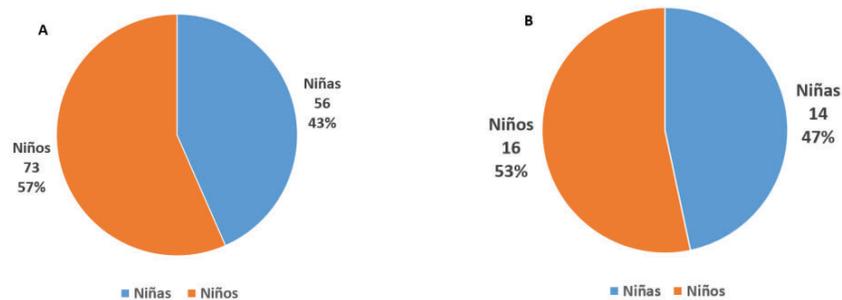
4.4. Análisis de características demográficas, clínicas y de detección viral

Durante el período de estudio, 241 pacientes con sintomatología respiratoria fueron internados en las salas de pediatría, terapia intensiva pediátrica y neonatología del Hospital Regional Río Gallegos. Sin embargo, solo se solicitó diagnóstico por laboratorio de virus respiratorios a 129 pacientes. A 16 de estos pacientes se le tomó más de una muestra, totalizando 145 muestras clínicas estudiadas. A partir de las 145 muestras clínicas estudiadas, se detectó RV en 30 de ellas, representando un porcentaje de positividad de un 21%. Con respecto a los pacientes a los cuales se les tomó más de una muestra, a 2 de ellos se les detectó RV en más de una oportunidad. En base a la bibliografía consultada, solo 1 de las 2 detecciones fue considerada como un evento nuevo ya que habían transcurrido más de 6 semanas entre la toma de la primera y segunda muestra. Por otro lado, en 7 de las muestras analizadas se detectó más de un VR.

4.4.1. Distribución por sexo y grupos etarios

De los 129 pacientes estudiados, 73 fueron niños y 56 niñas, en los que se detectó 16 (22%) y 14 (25%) RV respectivamente. Se aplicó La distribución por sexo de los pacientes estudiados y en los que se detectó RV se puede apreciar en el gráfico 2. La prueba de hipótesis χ^2 de Pearson no pudo comprobar una afectación mayor de algún sexo en particular.

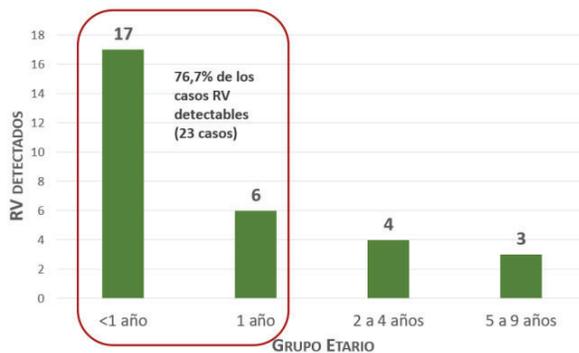
Gráfico 2



A-Distribución por sexo de los pacientes estudiados (n=129). B- Distribución por sexo de pacientes a los que se les detectó RV (n=30).

La mediana de edad de los pacientes a los que se les detectó RV fue de 10 meses (rango intercuartilico: 1- 21 meses) y la distribución de la detección de RV por grupo etario se muestra en el Gráfico 3.

Gráfico 3



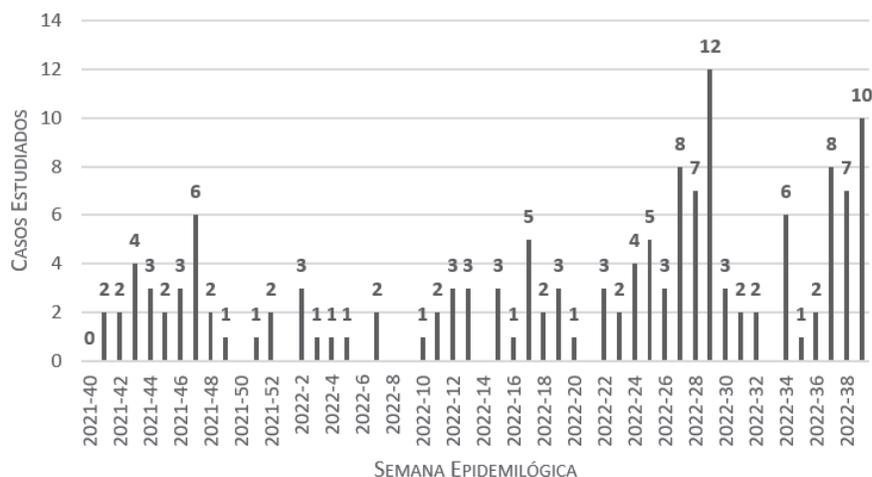
Distribución RV detectados y muestras por grupo etario. El número en negrita representa el total de RV detectados para cada grupo.

RV se detectó mayormente en las edades más tempranas, siendo los niños menores a 1 año los más afectados, seguido por los niños de un año. Como se observa en el gráfico 3, el 76,7% de los casos RV detectados se concentra en estos grupos etarios. A medida que avanzamos en la edad de los niños estudiados va decreciendo el total de positivos para RV llegando a no detectarse en el grupo de 10 a 14 años.

4.4.2. Muestras analizadas y RV detectados por semana epidemiológica (SE)

La distribución de las muestras clínicas por SE en el período de estudio se muestra en el gráfico 5.

Gráfico 4

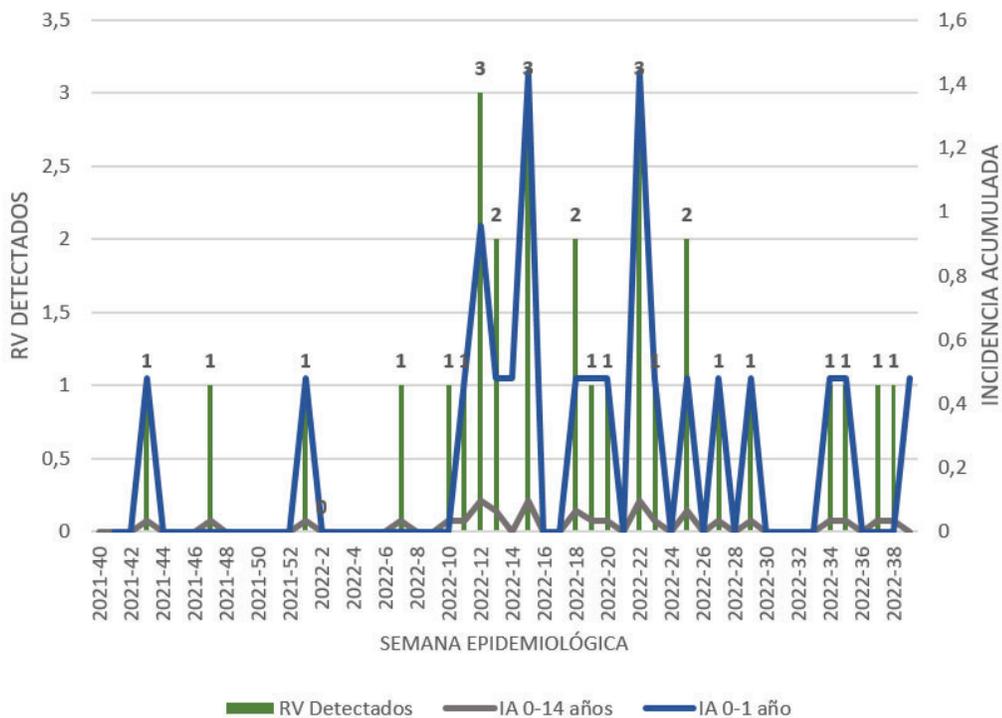


Distribución de muestras analizadas por SE. El número en negrita representa el total de muestras analizadas por SE.

Se observa una mayor cantidad de muestras analizadas entre las semanas 27 y 30 y entre las semanas 37 y 39 del año 2022.

El gráfico 6 muestra la distribución total de los RV detectados y la incidencia acumulada cada mil habitantes menores a 2 y a 15 años por SE.

Gráfico 5



Distribución de RV detectados e incidencia acumulada cada mil habitantes menores a 2 y 14 años por SE. El número en negrita representa el total de RV detectados por SE.

En relación a la distribución en el año, se detectó RV a lo largo de todo el período de estudio, salvo en el mes de diciembre. Se puede ver una mayor detección de RV en las semanas 12, 15 y 22 (con una IA cada mil habitantes menores a 15 años por SE de 0,1). Esta distribución se evidencia mejor si calculamos los mismos parámetros para menores de 2 años (con IA cada mil habitantes de 0,96 para la semana 12 y de 1,44 para las semanas 15 y 22). Estos picos coinciden con el otoño.

4.4.3. Síntomas clínicos que presentaron los pacientes a los que se les detectó RV

Los síntomas clínicos que presentaron los pacientes RV detectables se clasificaron en 3 grupos: síntomas respiratorios, síntomas digestivos y síntomas generales ver tabla 5 y gráfico 4.

Gráfico 6



Distribución de Síntomas (agrupados) de Pacientes a los cuales se les detectó RV.

Tabla 5

Síntomas observados en pacientes a los que se les detectó RV.

Síntomas Respiratorios		Síntomas Generales		Síntomas Digestivos	
Tos	19	Fiebre	14	Vómitos	6
Bronquiolitis	15	Taquipnea	3	Rechazo al alimento	2
Coriza	8	Laringitis	1	diarrea	2
Neumonía	6	Conjuntivitis	1		
Disnea	6	Odinofagia	1		
Tiraje	4				
Broncoespasmos	2				
Infiltrado bilateral	2				
Asma	1				

Dos pacientes de los pacientes RV detectables presentaron comorbilidades: uno de ellos nació prematuramente (menos de 28 semanas de gestación) y el otro padecía una enfermedad renal. Además, 2 pacientes estuvieron internados en terapia intensiva pediátrica (UCI), siendo RV el único patógeno detectado.

4.4.4. Detección de RV en relación a otros VR

Sobre las 145 muestras se detectaron 79 VR totales (54%). La distribución absoluta de los resultados obtenidos para todos los VR se aprecia en la tabla 6

Tabla 6

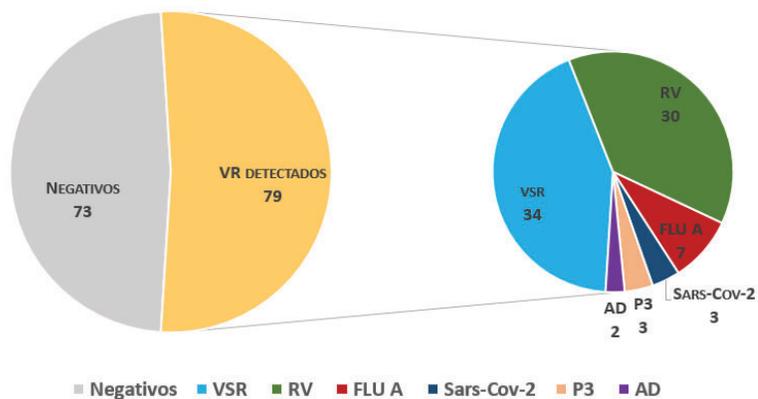
VR detectados en las muestras analizadas

VR detectado	Total
Negativos	72
VSR	34
RV	30
FLU A	7
P3	3
SARS-COV-2	3
AD	2

VR más frecuentemente detectado es el VSR (23%) seguido por el RV (21%) y luego, en menor proporción, le siguieron: FLU A (5%), P3 (2%), SARS-COV-2 (2%) y AD (1%).

El gráfico 7 muestra la distribución absoluta de los VR detectados.

Gráfico 7



Distribución absoluta de los resultados obtenidos (n=145).

La Tabla 7 muestra el resultado de las codetecciones de VR antes mencionadas que representan un 5% de las muestras analizadas.

Tabla 7

VR detectados simultáneamente en la misma muestra

Virus Codetectados	Total
RV + VSR	3
RV + P3	1
FLU A + SARS-COV-2	1
FLU A + VSR	1
VSR + AD	1

La asociación más frecuente de VR detectados fue la de RV y VSR, seguida en igual proporción por RV y P3, FLU A y SARS-COV-2, FLU A Y VSR y VSR Y AD.

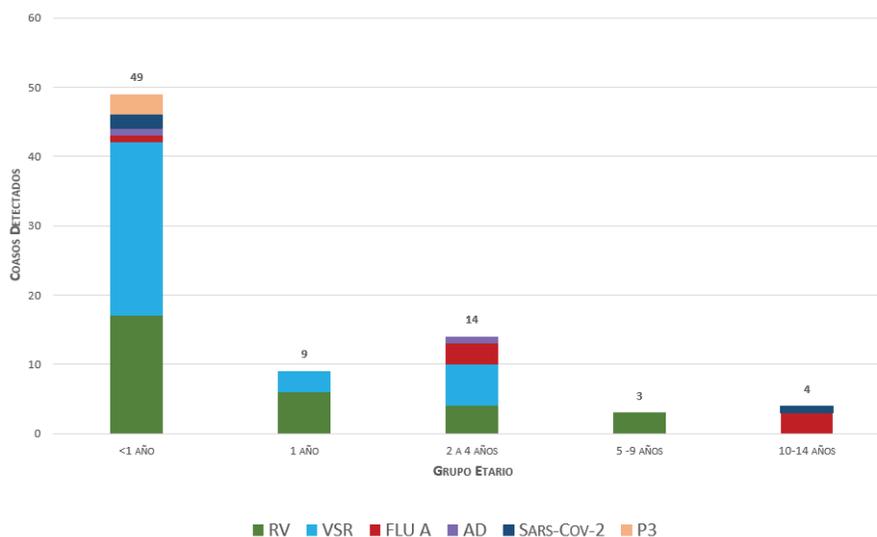
La distribución absoluta de las muestras respiratorias analizadas y los VR detectados se pueden apreciar en la tabla 8 y gráfico 8.

Tabla 8

Distribución absoluta de muestras analizadas y VR detectados por grupo etario.

Grupo Etario	Muestras estudiadas	RV	VSR	FLU A	AD	P3	SARS-COV-2	Total VR detectados
<1 año	79	17	25	1	1	3	2	49
1 año	16	6	3	0	0	0	0	9
De 2 a 4 años	31	4	6	3	1	0	0	14
De 5 a 9 años	16	3	0	0	0	0	0	3
De 10 a 14 años	3	0	0	3	0	0	1	4

Gráfico 8

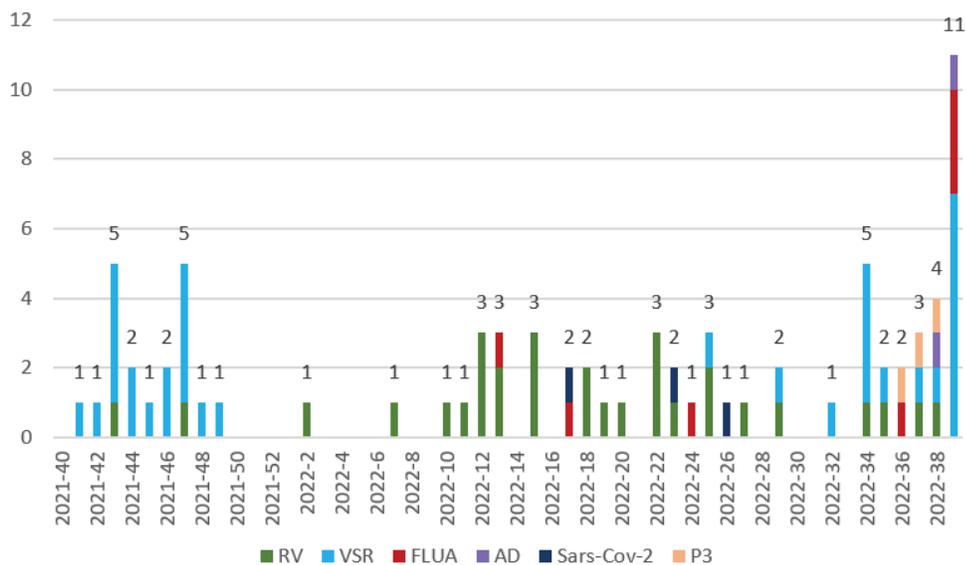


Distribución VR detectados y muestras por grupo etario. El número en negrita representa el total de VR detectados para cada grupo.

Dentro de los grupos etarios, se puede ver que dentro los niños menores de un año se detecta la mayor cantidad de VR (49), presentando además la mayor variedad de VR detectados (es el único grupo etario en el cual se detecta P3). Considerando el número total de positivos, este grupo es seguido por el grupo etario comprendido entre 2 y 4 años (14). Coincidentemente estos son los grupos etarios con mayor cantidad de muestras estudiadas. Esta distribución también se evidenció en la detección de VSR, siendo este virus el que más positivos aportó a los VR totales detectados.

Por último, en el gráfico 9 se puede ver la distribución por SE del total de VR detectados y proporción de la detección de cada uno de ellos.

Gráfico 9



Distribución de VR detectados por semana epidemiológica. El número en negrita representa el número total de VR detectados por SE.

El mayor pico de VR se registró en las semanas 47 del año 2021 y en las semanas 34 y 39 del año 2022. En estas semanas predominó la detección de VSR. En las semanas 12, 15 y 22 del año 2022, se detectó RV de forma exclusiva a la totalidad de muestras estudiadas. Estas semanas también coinciden con el mayor registro de detección de RV.

5. DISCUSIÓN

El actual contexto epidemiológico caracterizado por una menor gravedad y letalidad de los casos de COVID-19 y el retorno de la circulación de RSV, influenza y otros VR post-pandemia, refuerzan la necesidad de mantener una vigilancia fortalecida que integre los componentes epidemiológicos, clínico y de laboratorio. Contar en el laboratorio con la infraestructura y el equipamiento necesario para implementar técnicas moleculares que permiten la detección de patógenos virales y/o bacterianos resulta de gran utilidad, no solo para ampliar las capacidades diagnósticas a nivel local sino también para generar información que aporte a la vigilancia epidemiológica nacional y regional.

En este estudio se logró adaptar, estandarizar y validar una técnica de Q-RT-PCR para la detección de RV en pacientes pediátricos internados con diagnóstico clínico de IRA. En Argentina, están disponibles diferentes equipos comerciales para llevar a cabo la detección de este patógeno mediante la técnica de Q-RT-PCR en tiempo real en formato monoplex o multiplex. La puesta a punto e implementación de la metodología propuesta en este trabajo de tesis basándose en un protocolo de referencia cedido por el CDC, implica poder contar con una técnica confiable y robusta, facilitando el proceso de compra y permitiendo estudiar un número mayor de muestras a menor costo. Al comparar la sensibilidad analítica de esta técnica con la de 4 equipos comerciales disponibles en el mercado, se observó que el valor de LoD obtenido (0,2397 copias / μ l; IC 95% = 0,1593 – 0,3605) era aceptable e incluso menor, demostrando que la técnica propuesta presenta una sensibilidad comparable a los equipos comerciales analizados. Si bien este método mostró valores aceptables de concordancia durante la validación clínica (muestras no detectables 97%, muestras detectables 100%), una sugerencia para robustecer el método sería ampliar el número de muestras estudiadas detectables y no detectables, analizadas previamente, o bien poner en práctica este método utilizando paneles de proficiencia que incluyan la detección de RV en altas y bajas concentraciones.

Este es el primer estudio realizado en la Provincia de Santa Cruz que aporta conocimiento en cuanto al comportamiento del RV como agente detectado en pacientes pediátricos internados con infección respiratoria aguda moderada a grave. Previo al inicio de este estudio, no se contaba con una técnica para diagnosticar RV en el Hospital Regional Río Gallegos, por lo que se desconocían datos de la circulación de este patógeno y su relación con

la información clínica y epidemiológica en este grupo de pacientes. La implementación de la técnica de Q-RT-PCR permitió no sólo identificar RV a lo largo de un período de 1 año de estudio sino también inferir una posible relación con la clínica en este grupo de pacientes, la frecuencia y el aporte de este patógeno en las codetecciones.

El análisis de 145 muestras clínicas permitió detectar un porcentaje de positividad del 21%. Trabajos publicados previamente a partir de estudios realizados en el centro del país reportaron porcentajes de positividad de 38,1 % (Marcone, y otros, 2013), 51,5% (Rudi, 2011) (Rudi, y otros, 2015) y 56 % (Zamora , y otros, 2016), la diferencia podría deberse a diferentes factores como ser la ubicación geográfica o bien al número de muestras estudiadas (los estudios de la zona centro del país analizaron un número de muestras mayor). Además, es importante tener en cuenta que este estudio se llevó a cabo durante el período de la pandemia de SARS-CoV-2, ya que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró su comienzo el 11 de marzo de 2020 y su finalización el 5 de mayo de 2023. Durante este tiempo, quedó demostrado que el aislamiento social obligatorio, acompañado de restricciones en el transporte público y medidas de higiene intensificadas generaron un patrón de distribución atípico de VR no solo en Argentina sino también en el mundo, incluyendo al RV (Lución, y otros, 2022) (OPS, 2023)

En este estudio se detectó circulación de RV a lo largo de todo período de estudio, con excepción del mes de diciembre de 2021, cuando también fue mínimo el número de muestras recolectadas para diagnóstico por laboratorio de VR. Se obtuvo una IA cada mil habitantes notablemente mayor durante el otoño tanto para menores de 2 años como para menores 15 años. Debido al limitado número de casos no se puede asegurar que esta sea la dinámica viral en la Provincia de Santa Cruz, probablemente se requiera estudiar un período de tiempo más prolongado y un mayor número de muestras a nivel local para poder llegar a una conclusión válida al respecto. Otros estudios citan un aumento de circulación en otoño y primavera (Blomqvist S, 2004) (Bertino, 2002) (Marcone, y otros, 2013) (Rudi, y otros, 2015) (Lerman , Navarro Albarracin, Figari, Macías Láinez, & Uez, 2023)

Al evaluar los resultados en relación a los datos de los pacientes disponibles, si bien, al igual que en la bibliografía consultada, no se observaron diferencias significativas en los casos detectables en cuanto al sexo (53,33 % fueron niños y 47,67 % fueron niñas) (Rudi, 2011). Sin embargo, al analizar por grupo de edad, se determinó que la mediana de edad de los casos

detectables fue de 10 meses (rango intercuartilico: 1- 21 meses), lo que indica que los menores de 2 años serían los más vulnerables a la infección por este patógeno. El notable aumento de la IA por SE cada 1000 habitantes menores a 2 años en comparación con los pacientes pediátricos en general respaldan este hallazgo. Este resultado coincide con otros estudios realizados en el país, que señalan que el grupo más afectado son los niños menores a 2 años, y que la detección disminuye a medida que aumenta la edad. Esto probablemente se deba a la mayor exposición de los adultos a este virus y a la generación previa de anticuerpos en respuesta a infecciones previas (Rudi, 2011) (Zamora , y otros, 2016) (Lerman , Navarro Albarracin, Figari, Macías Láinez, & Uez, 2023).

Como se describió en el apartado de resultados, de los tres grupos analizados, los síntomas respiratorios fueron los que se asociaron más frecuentemente con pacientes en los cuales se detectó RV. Los síntomas respiratorios altos no fueron de gran relevancia, esto probablemente se deba a que la población estudiada se limitó a pacientes internados. Entre los pocos síntomas respiratorios altos que se observaron, coriza y odinofagia fueron los más destacados (Rudi, 2011) (Mackay, 2014) (Jacobs, Lamson, St. George, & Walsh, 2013). Al igual que otros estudios descritos, los síntomas respiratorios bajos predominaron en los pacientes con RV detectable. Entre estos la bronquiolitis fue la más relevante, seguida por la neumonía y la disnea (Kelvin , Cyril, & Kwok-Yung , 2017) (Mallia, y otros, 2012) (Blomqvist S, 2004) (Zamora , y otros, 2016). Estos resultados representan un aporte al nuevo enfoque que se ha estado dando en los últimos años con respecto a la sintomatología y afecciones que podría causar RV, con un importante registro de afecciones bajas por sobre las altas. (Ljubin-Sternak S. , Meštrović, Lukšić, Mijač, & Vraneš, 2021). Analizando los registros disponibles en el hospital, durante el período de estudio, solo a 1 de 10 niños internados con diagnóstico de asma se le solicitó el diagnóstico de VR y resultó ser RV detectable; esto explicaría la baja frecuencia de exacerbaciones asmáticas en los pacientes positivos en relación a lo descrito en la bibliografía. Dentro de los síntomas generales se destaca la fiebre, tal como manifiestan varios estudios realizados previamente (Papadopoulos, y otros, 2002) (Calvo Rey, y otros, 2006) (Vidaurreta, y otros, 2011) (Como hallazgo adicional un pequeño grupo de pacientes presentó sintomatología digestiva).

Al analizar el porcentaje de positividad de VR totales (54%) obtenido en este grupo de pacientes, el resultado es menor al intervalo de 70% y 83% reportado por otros autores para la misma población de estudio (Vidaurreta, y otros, 2011) (Lerman , Navarro Albarracin, Figari,

Macías Láinez, & Uez, 2023) (Marccone, y otros, 2013). Esto podría ser consecuencia de la diferencia observada en la circulación de los VR durante la pandemia, tal como se describió previamente y al limitado número de muestras estudiadas. Los RV fueron el segundo agente detectado luego de VSR (23%) tal como enuncian algunos estudios realizados (Calvo Rey, y otros, 2006) (Rudi, 2011) (Zamora, y otros, 2019). También existen estudios que postulan a RV como el virus más frecuentemente detectado en pacientes pediátricos internados con diagnóstico clínico de IRA, seguido por VSR (Marccone, y otros, 2013) (Vidaurreta, y otros, 2011). Esta variabilidad podría deberse al método de detección utilizado, su sensibilidad e incluso a variaciones en la distribución viral en distintas zonas geográficas y en diferentes momentos del año. La proporción de codetecciones encontrada en este estudio (5%) fue menor reportada por otros estudios realizados en el país (entre 12% y 13 %), sin embargo, se mantiene la asociación de HRV y VSR como la más frecuente (Marccone, y otros, 2013) (Vidaurreta, y otros, 2011). Dicha asociación era de esperar ya que ambos virus suelen detectarse con mayor frecuencia en pacientes pediátricos internados debido a afecciones respiratorias. El hecho de que RV haya sido el único patógeno detectado en dos pacientes internados en UCI coincide con el cambio de paradigma en el cual se está comenzando a vincular a RV con enfermedad respiratoria moderada a severa ya que se vio que es capaz de tener efecto en las vías respiratorias inferiores.

Hasta el momento, la detección de RV no es considerada de notificación obligatoria en el Sistema Nacional de Vigilancia, por lo tanto, no fue posible comparar los resultados obtenidos en este trabajo de tesis con la situación a nivel nacional. Al no contar con datos publicados de la región patagónica, se consultó con distintos laboratorios que realizan diagnóstico virológico en esta región. Se obtuvieron cifras no publicadas de la ciudad de Neuquén para un período de tres meses, comprendido entre junio y septiembre del año 2023, muestran una positividad de 27% sobre un total de 74 muestras pediátricas analizadas. Aunque el período de tiempo es limitado, estos datos se acercan más a los hallados en este estudio que los de otras regiones del país (C. Rastellini, comunicación personal, 10 de abril de 2024).

Las limitaciones de este estudio implicarían una subestimación de los indicadores epidemiológicos debido a que:

- El estudio incluyó solo pacientes internados, no se incluyeron pacientes ambulatorios
- No se le solicitó el diagnóstico virológico a la totalidad de los pacientes internados con síntomas respiratorios

A partir de los resultados obtenidos, se espera reforzar la importancia de solicitar el diagnóstico virológico de VR en pacientes que presentan IRA para la aportación y tratamiento del cuadro clínico.

La fortaleza de este estudio radica en ser el primero en evaluar la epidemiología de RV en la Provincia de Santa Cruz y así comenzar a entender la implicancia que este virus tiene en las infecciones respiratorias que afectan a los niños de esta región. Aplicar esta técnica permitió complementar el diagnóstico de muchos pacientes que, sin ella, no habrían contado con un resultado conclusivo. Conocer el comportamiento de los VR permite, no solo planificar los requerimientos de insumos de manera más efectiva y de personal médico que fueran necesarios para dar respuesta a las necesidades de los pacientes que concurren a un determinado centro de salud, sino también aporta información relevante para diseñar estrategias que apunten a prevenir, controlar y así reducir el impacto de las enfermedades causadas por estos patógenos en la salud pública

6. CONCLUSIONES

1) Se implementó el diagnóstico de RV en pacientes pediátricos con diagnóstico clínico de IRA internados en el HRRG.

- a) Se optimizó la técnica desarrollada por el Laboratorio de Virus Respiratorios de la División de Enfermedades Virales del CDC para la determinación de Virus Respiratorios No Influenza mediante ensayos de Q-RT-PCR que amplifica como objetivo la secuencia 5'NCR.
- b) La modificación introducida reemplazó los dos Primers Forward que incluyen en sus secuencias LNA, por un único primer Forward (sin LNA) para que resulte accesible.
- c) La evaluación luego de la estandarización de la técnica adaptada en este estudio, dio resultados de mayor sensibilidad analítica mayor a la reportada en los kits comerciales y la validación clínica arrojó un resultado satisfactorio en cuanto a la especificidad y sensibilidad del método.

2) El porcentaje de detección de VR totales aumenta un 21% gracias a la implementación de la detección de RV por Q-RT-PCR en los pacientes estudiados.

- a) Es el segundo VR más detectado.
- b) Se detectó RV durante casi todo el año y se observa un pico de mayor circulación durante el otoño.
- c) El grupo etario más afectado fueron los niños menores a dos años, y su detección decrece con la edad.
- d) No se observó que haya una diferencia significativa en cuanto al sexo de los pacientes afectados.

3) El porcentaje de positividad de RV hallado en este estudio es menor a los publicados por estudios realizados en las regiones centro y noroeste del país, pero se asemeja más a los resultados obtenidos por la provincia de Neuquén en la región patagónica.

- a) La frecuencia de detección de RV en relación a los VR detectados, se encuentra al igual que en las regiones centro y noroeste dentro de los dos virus más detectados junto con el VSR.
- b) El porcentaje de codetecciones de RV con otro VR es menor en este estudio que a los reportados en la región centro y se mantiene en todos los casos la asociación más frecuente de RV-VSR.
- c) Hubo una concordancia con estudios realizados en las regiones centro y noroeste del país en cuanto a que la edad más afectada por RV son los niños menores de dos años, sin observarse diferencias significativas por sexo.

4) Perspectivas a Futuro:

- a) Desafiar el método usando paneles de proficiencia o intercambiando periódicamente muestras previamente caracterizadas con otros laboratorios a modo de control externo de calidad.
- b) Sumar secuenciación de genoma completo para profundizar la caracterización de RV.
- c) Aumentar el número de muestras analizadas, de manera continua, a nivel local extendiendo este estudio en el tiempo para evaluar la frecuencia y la dinámica de RV en un contexto no pandémico y así evaluar las discrepancias con estudios realizados en otras regiones del país.
- d) Exponer la información y conclusiones de este estudio en ateneos hospitalarios para incrementar la sensibilización del equipo médico ante casos de exacerbaciones asmáticas.
- e) Dar a conocer los resultados de este estudio a personal jerárquico de la administración hospitalaria para la provisión de insumos necesarios para diagnóstico y tratamiento de los pacientes que lo requieran.
- f) Publicar los resultados de este estudio en una revista científica con referato.

7. BIBLIOGRAFIA

- Al-mulla W, E. M.-N. (1994). Prueba inmunofluorescente amplificada por cultivo rápido para la detección de rinovirus humanos en muestras clínicas: evidencia de un epítipo común en cultivo. *Revista de Virología Médica*, 42, 182-187.
- Al-Romaihi, H., Smatti, M., Al-Khatib, H., Coyle, P., Ganesan, N., Nadeem, S., . . . Hadi, M. (2020). Molecular epidemiology of influenza, RSV, and other respiratory infections among children in Qatar: A six years report (2012–2017). *International Journal of Infectious Diseases*, 95, 133-141. doi:10.1016/j.ijid.2020.04.008.
- Andrews, T. C. (1953). Propagación del virus del resfriado común en cultivos de tejidos. *The Lancet*, 546.
- Argentina., M. d. (2024). *Boletín Epidemiológico Nacional N° 686*.
- Avendaño Carvajal, L., & Perret Pérez, C. (2020). Epidemiología de las infecciones respiratorias. doi:doi.org/10.1007/978-3-030-26961-6_28
- BarclayW, C. K.-N. (1988). Evaluación de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas que mide anticuerpos específicos de rinovirus en sueros humanos y secreciones nasales. *Revista de virología médica*, 25, 475-482.
- Basnet, S., Palmenberg, A. C., & Gern, J. E. (2019). Rinovirus y sus receptores. *Chest*, 155(5), 1018-1025. doi:10.1016/j.chest.2018.12.012
- Bender, R. G., Sirota, S. B., Swetschinski, L. R., Domínguez, R. M., Novotney, A., & Wool, E. E. (2024). Carga de incidencia y mortalidad mundial, regional y nacional de infecciones y etiologías de las vías respiratorias inferiores no relacionadas con la COVID-19, 1990-2021: un análisis sistemático del Estudio de la carga mundial de morbilidad 2021. (T. L. Infeciosas., Ed.) doi:10.1016/S1473-3099(24)00176-2
- Bertino, J. S. (2002). Cost burden of viral respiratory infections: issues for formulary decision makers. *The American journal of medicine*, 112(6), 42-49. doi:/10.1016/S0002-9343(01)01063-4

- Blomqvist S. (2004). EPIDEMIOLOGY OF HUMAN RHINOVIRUSES. Helsinki, Finland.: Publications of the National Public Health Institute.
- Blomqvist S, R. M. (2002). Análisis virológico y serológico de infecciones por rinovirus durante los dos primeros años de vida en una cohorte de niños. *Revista de virología médica*, 66, 263-268.
- Bochkov, Y. P. (2011). Modelado molecular, cultivo de órganos y genética inversa para un rinovirus humano recientemente identificado. *Nature Medicine*, 17, 627-632. doi:<https://doi.org/10.1038/nm.2358>
- Butte, A. (2002). El uso y análisis de datos de microarrays. *Nat Rev Drug Discov*, 951-960. doi:10.1038/nrd961
- Calvo Rey, C., García García , M. L., Casas Flecha, I., Sánchez Mateos, M., Rodrigo García, G., de Cea Crespo, J. M., & Pérez-Breña, P. (2006). Papel del rinovirus en las infecciones respiratorias en niños hospitalizados Papel del rinovirus en las infecciones respiratorias en niños hospitalizados. *Anales de Pediatría*, 65(3). doi:10.1157/13092155
- Carballal, G., & Oubiña, J. R. (2015). *Virología Médica* (4 ed.). Ciudad Autonoma de Buenos Aires, Argentina: Corpus Libros Médicos y Científicos.
- Chattoraj, S. S., Ganesan, S., Faris, A., Comstock, A., Lee, W.-M., & Sajjan, U. S. (2011). Pseudomonas aeruginosa suprime la respuesta del interferón a la infección por rinovirus en la fibrosis quística, pero no en las células epiteliales bronquiales normales. *Sociedad Americana de Microbiología*, 79(10), 4131 - 4145. doi:10.1128/IAI.05120-11
- Chirinos-Saire, Y., Reyna-García, R., Aguilar-Huauya, E., & Santillán-Salas, C. (2021). Virus respiratorios y características clínico-epidemiológicas en los episodios de infección respiratoria aguda. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. doi:10.17843/rpmesp.2021.381.6346
- Crouzier, L., Dubois, C., Edwards, S. L., Lauridsen, L. H., Wengel, J., & Rakesh, R. N. (2012). Transcripción inversa eficiente utilizando nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados hacia la evolución de aptámeros de ARN resistentes a nucleasas. *Plos One*, 7(4). doi:10.1371/journal.pone.0035990

- Deiman, B. v. (2002). Características y aplicaciones de la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA). *Mol Biotechnol*, 20, 163-179. doi:10.1385/MB:20:2:163
- Fields, B. N. (2007). *Fields Virology* (Quinta ed., Vol. I). Philadelphia, USA.: Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- Francisco González, L., & Calvo Rey, C. (2023). Infecciones respiratorias virales. 2, 139-149.
- FreytmuthF, V. A. (2005). Replicación de virus respiratorios, particularmente virus de la influenza, rinovirus y coronavirus en la línea celular de hepatocarcinoma HuH7. *Revista de Virología Médica*, 77(2), 295-301.
- Fuchs, R., & Blaas, D. (2010). Uncoating of human rhinoviruses. *Reviews in medical virology*, 20(5), 281-297. doi:10.1002/rmv.654
- Gama, R. E. (1988). Amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa de ácidos nucleicos de rinovirus a partir de material clínico. *Investigación sobre ácidos nucleicos*, 16(19). doi:10.1093/nar/16.19.9346
- Gern , J. (2012). El ABC de los rinovirus, las sibilancias y el asma. *Jornal of Virology*, 84(15). doi:10.1128/JVI.02290-09
- Gern, J. E. (2009). Rinovirus y el inicio del asma. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 1, 73-78. doi:doi.org/10.1097/ACI.0b013e32831f8f1b
- Gómez Perosanz, M. (2023). *Tesis Doctoral: Identificación y caracterización de epítomos del Rinovirus Humano*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- González Valdés , J., & Abreu Suárez , G. (1998). Infecciones respiratorias en la fibrosis quística. *Acta Médica 2000*.
- Gregory, B., & Oliver, G. (2019). Infecciones por rinovirus. Repensar el impacto en la salud humana y la enfermedad. In N. Bartlett, P. Wark, & D. Caballero (Eds.), *Infecciones por rinovirus Repensar el impacto en la salud humana y la enfermedad*. (pp. 265-283). Academic Press Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-816417-4.00010-X

- Hoorh, B. T. (1965). SOBRE EL CRECIMIENTO DE CIERTOS VIRUS RESPIRATORIOS "MÁS NUEVOS" EN CULTIVOS DE ÓRGANOS. *Revista británica de patología experimental*, 46(2), 109-118.
- Horemheb-Rubio, G., Eggeling, R., Schmeißer, N., Pfeifer, N., Lengauer, T., Gärtner, B., . . . Bossart, W. (2022). Dinámica e interacciones de los virus respiratorios: diez años de vigilancia en Europa central. *BMC Salud Pública* , 22(1). doi:10.1186/s12889-022-13555-5
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2024). Informe de Circulación de Virus Respiratorios 2024 SE17.
- Jacobs, S. E., Lamson, D. M., St. George, K., & Walsh, T. J. (2013). Rinovirus humanos. *Clinical Microbiology Reviews*, 135-162. doi:10.1128/CMR.00077-12
- Jamieson, K. C., Warner, S. M., Leigh, R., & Proud, D. (2015). Rinovirus en la patogénesis y el curso clínico del asma. *Chest*, 148(6), 1508-1516. doi:10.1378/chest.15-1335
- JangYJ, L. S.-J.-S.-J. (2005). Desarrollo del modelo de estudio de rinovirus utilizando cultivo de órganos de mucosa de cornetes. *revista de Métodos Viroológicos* , 125(1), 41-47. doi:10.1016/j.jviromet.2004.12.004
- Jartti, T., Jartti, L., Peltola, V., Waris, M., & Ruuskanen, O. (2008). Identification of Respiratory Viruses in Asymptomatic Subjects: Asymptomatic Respiratory Viral Infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(12), 1103-1107. doi:10.1097/INF.0b013e31817e695d
- Kaiser, L., Aubert, J. D., Pache, J. C., Deffernez, C., Rochat, T., Garbino ,, J., . . . Soccà, P. M. (2006). Infección rinoviral crónica en receptores de trasplante de pulmón. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* , 174(12). doi:10.1164/rccm.200604-489OC
- Karlsen, K. K., & Wengel, J. (2012). Ácido nucleico bloqueado y aptámeros. *Nucleic acid therapeutics*, 22(6), 366-370. doi:10.1089/nat.2012.0382

- Kelly, J. T., & Busse, W. W. (2008). Host immune responses to rhinovirus: mechanisms in asthma. (J. A. Joshua A. Boyce, F. Finkelman, W. T. Shearer, & D. Vercelli, Edits.) *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(4), 671-682.
- Kelvin , K. W., Cyril, C., & Kwok-Yung , Y. (2017). Rinovirus – Del banco a la cabecera. *Journal of the Formosan Medical Association*, 116(7), 496-504. doi:10.1016/j.jfma.2017.04.009
- Kennedy, J. L., Turner, R. B., Braciale, T., Heymann, P. W., & Borish, L. (2012). Pathogenesis of Rhinovirus Infection. *Current opinion in virology*, 2(3), 287-293. doi:10.1016/j.coviro.2012.03.008
- Kerr, S.-L., Mathew, C., & Ghildyal, R. (2012). Rinovirus y muerte celular. *Virus*, 13(4). doi:10.3390/v13040629
- Kraft, C. S., Jacob, J. T., Sears, M. H., Burd, E. M., Caliendo, A. M., & Lyon, G. M. (2012). La gravedad de la infección por rinovirus humano en adultos inmunocomprometidos es similar a la de la influenza H2009N1 1. *Revista de Microbiología Clínica*, 50(3). doi:10.1128/JCM.06579-11
- Landry M L, F. D. (2000). SimulFluor Respiratory Screen para la detección rápida de múltiples virus respiratorios en muestras clínicas mediante tinción de inmunofluorescencia. *revista de Microbiología Clínica*, 38(2), 708-711.
- Lerman , A. S., Navarro Albarracin, L. F., Figari, A. B., Macías Láinez, V., & Uez, O. C. (2023). Rinovirus y metapneumovirus en pacientes con. *ARCHIVOS ARGENTINOS DE PEDIATRIA*, 121(3). doi:202202605
- Li, Z.-J., Zhang, H.-Y., Ren, L.-L., Lu, Q.-B., Ren, X., Zhang, C.-H., . . . Equipo de Estudio de Vigilancia de la Etiología de, I. e. (2021). Características etiológicas y epidemiológicas de las infecciones respiratorias agudas en China. *Nature Communications*, 12(1). doi:.1038/s41467-021-25120-6
- Ljubin-Sternak, S., Meštrović, T., Lukšić, I., Mijač , M., & Vraneš, J. (2021). Coronavirus estacionales y otros virus respiratorios desatendidos: una perspectiva global y una instantánea local. *Frontiers in Public Health*, 9. doi:/10.3389/fpubh.2021.691163

- Lorens, K., H, G., H, F. L., Oudshoorn, P., Pattyn, S., Sillekens, P., & M, L. (2006). Detección de rinovirus mediante cultivo de tejidos y dos técnicas de amplificación independientes, amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos y PCR con transcripción inversa, en niños con infecciones respiratorias agudas durante una temporada d. *revista de Microbiología Clínica*, 44(1), 166-171. doi:10.1128/JCM.44.1.166-171.2006
- Louie, J. K., Burman, R., Guardia-LaBar, L., Boston, E. J., Kiang, D., Padilla, T., . . . Schnurr, D. P. (2009). Rinovirus Asociado con infecciones graves de las vías respiratorias inferiores en niños. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 24(4), 337-339. doi:10.1097/INF.0b013e31818ffc1b
- Lu, X. H. (2008). Ensayo de PCR con transcripción inversa en tiempo real para la detección exhaustiva de rinovirus humanos. *Revista de microbiología clínica*, 46(2), 533-539. doi:10.1128/JCM.01739-07
- Lución, M. F., Juarez, M. D., Pejito, M. N., Orqueda, A. S., Romero Bollón, L., Mistchenko, A. S., & Gentile, Á. (2022). Impacto del COVID-19 en la circulación de virus respiratorios en un hospital infantil: una ausencia esperada. *Arch Argent Pediatr*, 120(2), 99-105.
- Mackay, I. M. (2014). Rhinoviruses. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control. Nature Public Health Emergency Collection*, 675-712. doi:10.1007/978-1-4899-7448-8_29
- Mallia , P., Message , S. D., Gielen , V., Contoli, M., Gray, K., Keadze, T., . . . Johnston, S. (2011). Infección experimental por rinovirus como modelo humano de exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Revista Americana de Medicina Respiratoria y de Cuidados Críticos*, 183(6), 734-742. doi:10.1164/rccm.201006-0833OC.
- Mallia, P., Footitt, J., Sotero, R., Jepson, A., Trujillo, M., Trujillo Torralbo, M., . . . Johnston, S. (2012). La infección por rinovirus induce la degradación de péptidos antimicrobianos y la infección bacteriana secundaria en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Revista Americana de Medicina Respiratoria y de Cuidados Críticos*, 186(11). doi:/10.1164/rccm.201205-0806OC

- Marcone, D. N., Ellis, A., Videla, C., Ekstrom, J., Ricarte, C., Carballal, G., . . . Echavarría, M. (2013). Etiología viral de infecciones respiratorias agudas en niños hospitalizados y ambulatorios en Buenos Aires, Argentina. *Pediatr Infect Dis J*, 32(3), 105-110. doi:10.1097/INF.0b013e31827cd06f
- McIntyre, C. L., Knowles, N. J., & Simmonds, P. (2013). Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. *Journal of general virology*, 94(8). doi:10.1099/vir.0.053686-0
- Ministerio de Salud Argentina. (2023). *Guía para la vigilancia epidemiológica y recomendaciones para la prevención y control de las infecciones respiratorias agudas*.
- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. (2016). *Boletín Integrado de Vigilancia*. From <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n296-se05-11022016>
- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. (2017). *Boletín Integrado de Vigilancia*. From <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n346-se-5-10022017>
- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. (2018). *Boletín Integrado de Vigilancia*. From <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n395-se03-22012018>
- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. (2019). *Boletín Integrado de Vigilancia*. From <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n435-se2-17012019>
- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. (n.d.). *Boletín Integrado de Vigilancia*. 2020. From <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n481-se02-2020>
- Ministerio de Salud de la República Argentina. (2022). *Boletín Epidemiológico Nacional N°583*.
- Ministerio de Salud de la República Argentina. (2023). *Boletín Epidemiológico Nacional 635*.
- Ministerio de Salud de la República Argentina. (2024). *Boletín Epidemiológico Nacional N°686*.

- Murali, S., Langston, A., Nolte, F. S., Banks, G., Martin, R., & Caliendo, A. m. (2009). Detección de virus respiratorios con un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa multiplex (MultiCode-PLx Respiratory Virus Panel) en pacientes con neoplasias hematológicas. *Leukemia & Lymphoma*, *50*(4), 619-624. doi:10.1080/10428190902777665
- National Center for Immunization and Respiratory Diseases Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Respiratory Virus Diagnostics Team, Respiratory Viruses Branch, Division of Viral Disease. Real-Time RT-PCR Assays for Non-Influenza Respiratory Viruses.
- OPS. (2023). *Organizacion Panamericana de la Salud* . From Se acaba emergencia por pandemia pero covid 19 continua: <https://www.paho.org/es/noticias/6-5-2023-se-acaba-emergencia-por-pandemia-pero-covid-19-continua>
- Organización Mundial de la Salud. (2014). *Prevención y control de las infecciones respiratorias agudas con tendencia epidémica y pandémica durante la atención sanitaria. Directrices de la Organización Mundial de la Salud* . Organización Mundial De La Salud. From <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2014-cha-prevencion-control-atencion-sanitaria.pdf>
- Organización Panamericana de la Salud. (2023). Reporte Semanal de Virus Respiratorios. (46).
- Ospina, J. D. (2020). Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, *40*(1), 148-165. doi:10.7705/biomedica.4765
- Palmenberg, A. C. (2010). Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. (M. F. Joshua A. Boyce, Ed.) *Journal of allergy and clinical immunology*, *125*(6), 1190-1199. doi:10.1016/j.jaci.2010.04.010
- Palmenberg, A. C., Espiro, D., Kuzmickas, R., Wang, S., Djikeng, A., Rathe, J. A., . . . Liggett, E. B. (2009). La secuenciación y los análisis de todos los genomas de rinovirus humanos conocidos revelan la estructura y la evolución. *Science*, *324*(55). doi:10.1126/science.1165557

- Pan, F. W. (2021). La aplicación clínica del panel respiratorio Filmarray en niños, especialmente con infecciones graves del tracto respiratorio. *BMC enfermedades infecciosas*, 21(1), 230. doi:10.1186/s12879-0
- Papadopoulos N G, S. G. (1999). Los rinovirus se replican con eficacia a temperaturas más bajas de las vías respiratorias. *Revista de virología médica*, 58, 100-104.
- Papadopoulos, N. G., & Johnston, S. L. (2001). The rhinovirus—not such an innocent? *QJM: An International Journal of Medicine*, 94(1), 1-3. doi:10.1093/qjmed/94.1.1
- Papadopoulos, N. G., Moustaki, M., Tsoia, M., Bossios, A., Astra, E., Prezerakou, A., . . . Kafetzis, D. (2002). Asociación de la infección por rinovirus con el aumento de la gravedad de la enfermedad en la bronquiolitis aguda. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165(9). doi:10.1164/rccm.200112-118BC
- Pelon, W. M. (1957). Un agente citopatogénico aislado de. *Actas de la Sociedad de Biología Experimental y Medicina*. doi:10.3181/00379727-94-22915
- Prince WH. (1956). El aislamiento de un nuevo virus asociado a enfermedad clínica respiratoria en humanos. *National Acad Sciences*.
- Racaniello, V. (2001). Picornaviridae: los virus y su replicación. In B. N. Fields, & D. K. Howley (Ed.), *Fields' virology* (4ta ed., pp. 685-722).
- Rudi, J. M. (2011). Tesis de Maestría en Biología Molecular Médica : Rol del Rinovirus en niños hospitalizados con infección respiratoria aguda.
- Rudi, J. M., Molina, F., Díaz, R., Bonet, V., Ortellao, L., Cantarutti, D., . . . Kuszniertz, G. (2015). El papel del rinovirus en niños hospitalizados por enfermedad respiratoria aguda, Santa Fe, Argentina. *J Med Virol.*, 87(12), 2027-2032. doi:10.1002/JMV.24266.
- Simmonds, P., Gorbalenya, A., Harvala, H., Hovi, T., Knowles, N. J., Lindberg, A., . . . Zell, R. (2020). Recomendaciones para la nomenclatura de enterovirus y rinovirus. *Archivos de virología*, 165(3), 793–797. doi:10.1007/s00705-019-04520-6

- Stobart, C. C., Nosek, J. M., & Moore, M. L. (2017). Biología del rinovirus, diversidad antigénica y avances en el diseño de una vacuna contra el rinovirus humano. *Fronteras en Microbiología*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02412
- Sykes, A., Mallia, P., & Johnston, S. (2007). Diagnóstico de patógenos en exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Actas de la Sociedad Torácica Americana*, 4(8).
- Troncoso, A. (2024, Marzo 07). Correo electrónico Dirección Provincial de Estadística y Censos Secretaría de Estado de Planeamiento Estratégico Jefatura de Gabinete de Ministros.
- Turner, R. B. (1997). Epidemiología, patogenia y tratamiento del resfriado común. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 78, 531-540.
- Veedu, R. N., & Wengel, J. (2009). Trifosfatos y polimerasas de nucleósidos de ácidos nucleicos bloqueados: en. *Molecular BioSystems*, 5(8), 587-592. doi:10.1039/b905513b
- Versalovic, J. (2011). *Manual de microbiología clínica* (Vol. 1). American Society for Microbiology Press.
- Vidaurreta, S. M., Marcone, D. N., Ellis, A., Ekstrom, J., Cukier, D., Videla, C. M., . . . Echavarría, M. (2011). Infección respiratoria aguda viral en niños menores de 5 años: Estudio epidemiológico en dos centros de Buenos Aires, Argentina. *Archivos argentinos de pediatría*.
- Zamora, A. M., Salmerón, M., Ruiz de Huidobro, C. G., Costas, D., Sanchez, S. M., Leva, R., . . . Lopez de Caillou, S. (2016). Deteccion de Rinovirus en niños hospitalizados con infeccion respiratoria aguda baja. Tucuman Marzo Diciembre. 2015., (p. 14). Buenos Aires.
- Zamora, A. M., Ruiz de Hudibro, C. G., Costas, D., Medina, M. S., Salmerón, M. B., Palazon, E. G., & Lopez de Caillou, M. S. (2019). Detección de Rinovirus Humanos en Niños Internados con Infección Respiratoria Aguda. Tucumán 2018. *XV Congreso Argentino de Microbiología* (p. 327). Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología .
- Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, E., Hovi, T., Rey, A., Knowles, N., . . . Consorcio de Informes ICTV. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *Journal of General Virology*, 98(10). doi:10.1099/jgv.0.000911

8. ANEXOS

ANEXO A

Paneles

VIASURE
Real Time PCR Detection Kits

VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit

La tira de 8 pocillos **VIASURE Respiratory Panel I** contiene en cada pocillo de reacción las siguientes mezclas de reacción para la detección de las dianas específicas:

- Flu A, Flu B & RSV
- Rhinovirus + Enterovirus
- Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus
- MERS Coronavirus 1
- MERS Coronavirus 2
- Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1
- Parainfluenza 1+3
- Parainfluenza 2+4



Paciente #1

► Sensibilidad analítica

VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para Flu A, Flu B y RSV; RVH y EVH; AdV, MPV y BoV; MERS-CoV; CoV cepas 229E, NL63, HKU1 y OC43 y virus Parainfluenzas.

► Referencias:

VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-RP0212L
VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-RP0212H

CerTest
BIOTEC

CerTest Biotec, S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
Tel. (+34) 976 520 354 · Fax (+34) 976 106 268
certest@certest.es | viasure@certest.es
www.certest.es

Para más información y procedimiento de uso,
consultar las instrucciones de uso incluidas en este producto.

VIASURE/VS02-0822ES

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.
The products, services and data set out in this document may suffer changes and/or variations on the texts and pictures shown.

ANEXO B

*Comité Central de Ética en Investigación
Ministerio de Salud y Ambiente.
Provincia de Santa Cruz*

DICTAMEN N° 04 CCEI/2022

Plan de tesis "DIAGNOSTICO MOLECULAR DE HRV EN NIÑOS CON IRA INTERNADOS EN EL HOSPITAL REGIONAL RIO GALLEGOS MEDIANTE Q-RT-PCR"

Investigadora: Bioq. Pamela Victoria Reynares

Por la presente, se informa que ha sido evaluada la siguiente documentación enviada:

- Plan de estudio "DIAGNOSTICO MOLECULAR DE HRV EN NIÑOS CON IRA INTERNADOS EN EL HOSPITAL REGIONAL RIO GALLEGOS MEDIANTE Q-RT-PCR"

Dictamen: En función de la documentación recibida este Comité considera pertinente y relevante la continuidad del mismo.

A su vez, teniendo en consideración que se estipula la realización de un examen complementario, la investigadora deberá presentar antes del inicio del estudio modelo de Consentimiento Informado acorde.



Lic. Celina Pejkoš



Bioq. Verónica Álvarez

Río Gallegos, de 01 de julio de 2022.
Comité Central de Ética en Investigación
Ministerio de Salud y Ambiente.
Provincia de Santa Cruz

ANEXO C

Consentimiento Informado

Estimados Padres y/o Tutores:

Su hijo/a ha sido seleccionado para participar en el estudio titulado **“Diagnóstico Molecular de RV en Niños con IRA internados en el Hospital Regional Río Gallegos mediante Q-RT-PCR”**, dirigido por la Bioquímica Pamela Victoria Reynares, en Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Regional Río Gallegos.

El personal correspondiente hablará con usted acerca de esta información y usted es libre de hacer preguntas en cualquier momento. Si usted está de acuerdo en que su hijo/a participe de este estudio, se le pedirá que firme este formulario de consentimiento y se le dará una copia para que la guarde.

El propósito de este estudio **“Diagnóstico Molecular de RV en Niños con IRA internados en el Hospital regional Río Gallegos mediante Q-RT-PCR”** es implementar el diagnóstico de RV por la técnica de Q-RT-PCR en pacientes pediátricos con diagnóstico clínico de IRA internados en el HRRG y realizar un análisis epidemiológico de los contagios a lo largo de las diferentes estaciones climáticas del año, agrupándolos según edad, sexo del paciente.

Su participación consistirá en autorizar el uso de la muestra respiratoria oportunamente recolectada para la determinación de otros virus respiratorios, para la determinación de RV mediante métodos moleculares y la inclusión de los resultados obtenidos en el análisis estadístico-epidemiológico posterior.

La participación en este estudio no conlleva riesgos para la salud del niño/a ni su persona.

La participación es totalmente confidencial, ni el nombre, DNI, número de historia clínica o ningún tipo de información que pueda identificar al niño/a aparecerán en los registros del estudio, ya que se utilizarán códigos. El almacenamiento de los códigos estará a cargo del investigador responsable y serán resguardados en formato digital en la PC1 del Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Regional Río Gallegos hasta 2 años después de culminado el estudio.

Este estudio no tiene costos para usted y no se beneficiará de permitir la participación del niño/a en este estudio, sin embargo, la información que pueda obtenerse a partir de su participación será de utilidad para contribuir al conocimiento del comportamiento del virus en esta región y así obtener una mejora en la atención en la comunidad. Si Ud. desea, se le entregará un informe con los resultados de los exámenes realizados para que lo comparta con su médico tratante.

Ud. puede negarse a participar en cualquier momento, lo cual no la perjudicará ni tendrá consecuencias para el niño/a, ni tampoco le afectará en su atención médica. El retirarse del estudio no le representará ninguna penalidad o pérdida de beneficios a los que tiene derecho.

Las muestras recolectadas serán almacenadas en el Laboratorio de Biología Molecular, ubicado en el Hospital Regional Río Gallegos. Si usted lo autoriza, estas muestras podrán ser utilizadas con posterioridad en estudios científicos realizados por el mismo investigador y para los mismos propósitos. Para ello, el investigador le contactará nuevamente para solicitar su autorización y firma de un nuevo consentimiento informado para re-utilizar las muestras almacenadas. Si usted no desea que las muestras sean almacenadas, sus muestras serán destruidas al finalizar este estudio. Sin perjuicio de lo anterior, Ud. puede solicitar en el futuro que sus muestras almacenadas sean destruidas si cambia de parecer, para lo cual debe contactar al investigador responsable de este estudio.

Si tiene dudas o consultas respecto de su participación en este estudio puede contactar a la investigadora responsable de este estudio, Bioq. Pamela Victoria Reynares, quien trabaja en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Regional Río Gallegos situado en la calle José Ingenieros 98, teléfono 2966 422550 / 421072 / 425411 interno 2394 de 9 a 14 horas, o al correo electrónico: pamelareynares@gmail.com

Quedando claro los objetivos del estudio, las garantías de confidencialidad y la aclaración de la información, acepto voluntariamente participación de mí hijo/a _____ DNI _____ en este estudio.

Fecha	Tipo de muestra	Si	No

Las muestras donadas podrán ser utilizadas con posterioridad en estudios científicos:

Investigador Responsable: Pamela Victoria Reynares/ Matricula BQ-326/Firma: _____

Padre, Madre o Tutor _____ DNI _____ - Firma

ANEXO D



Quick-RNA™ Viral Kit

Viral RNA from any biological sample

Highlights

- Quick, spin-column purification of viral RNA from plasma, serum, urine, cell culture media, blood, saliva, cellular suspensions, swab, fecal and biopsy samples
- High-quality RNA is ready for Next-Gen sequencing, RT-qPCR, hybridization, etc.
- DNA/RNA Shield is included for sample collection, inactivation, storage and preservation.

Cataloga Nombres:

R1034, R1035



Scan with your smart-phone camera to view the online protocol/video.



tech@zymoresearch.com



www.zymoresearch.com



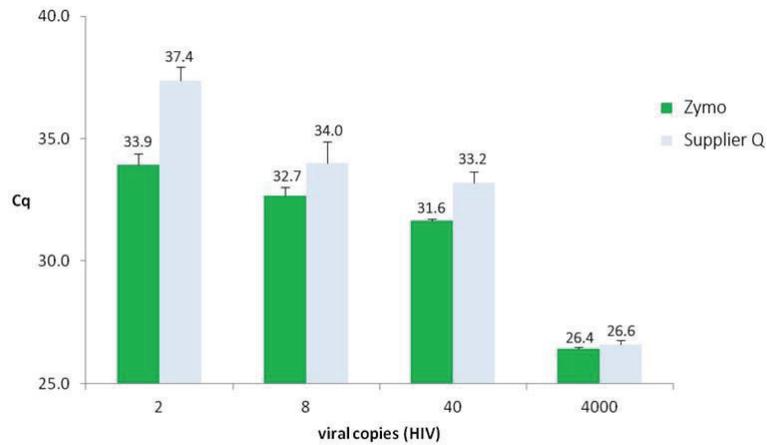
Toll Free: (888) 882-9682

Product Description

The **Quick-RNA™ Viral Kit** is a quick, purification of viral RNA from plasma, serum, urine, cell culture media, blood, saliva, cellular suspensions, biopsies, swab and fecal samples stored in **DNA/RNA Shield™** (for sample collection, nucleic acid preservation and inactivation of pathogens).

The kit also features a buffer system that facilitates complete viral particle lysis for efficient nucleic acid isolation. Small (> 50 nt) and large (> 200 kb) DNA and RNA are bound to the column, washed and eluted.

The isolated high-quality, total RNA is ready for all downstream applications such as Next-Gen sequencing, hybridization-based and RTqPCR detection.



The **Quick-RNA™ Viral Kit** from Zymo Research ensures high sensitivity viral detection compared to that of Supplier Q. Viral RNA was isolated from plasma samples. Data shows the mean (+/- SD) of triplicate RT-qPCR measurements.

Protocol

The protocol consists of: (I) Buffer Preparation, (II) Sample Preparation and (III) RNA Purification.

(I) Buffer Preparation

- Add beta-mercaptoethanol (user provided) to 0.5% (v/v) i.e., add 250 µl or 500 µl β-Me per 50 ml or 100 ml **Viral RNA Buffer**.
- Add 24 ml of 100% ethanol (26 ml of 95% ethanol) to the 6 ml **Viral Wash Buffer** concentrate (R1034) or 192 ml of 100% ethanol (204 ml of 95% ethanol) to the 48 ml **Viral Wash Buffer** concentrate (R1035).

(II) Sample Preparation

- Perform all steps at room temperature (20-30°C).
- Depending on sample type, up to 400 µl can be processed per prep (see below).

Samples in DNA/RNA Shield™^{1,2} collection devices (swabs, saliva, etc.) Transfer up to 400 µl and proceed directly with purification, page 6.

Swabs (UTM®/VTM®, PBS, saline, etc.)

Transfer up to 400 µl and proceed directly with purification, page 6.

Optional - To inactivate, store and preserve samples at room temperature prior to further processing, add **DNA/RNA Shield™**. See **Liquids**, below.

Liquids (plasma², serum², CSF, blood, saliva, urine, cell suspension, cell culture media) Add 200 µl of DNA/RNA Shield™ (2X concentrate) to 200 µl liquid sample (1:1) and mix well. Transfer up to 400 µl of the mixture and proceed with purification, page 6.

Tissue² (LCM, needle biopsy)

Add 400 µl **DNA/RNA Shield™** (1X) to a tissue sample (up to 5 mg) and mix well. Proceed with purification, page 6.

Optional - **Proteinase K treatment**³ (protein-rich samples e.g., plasma, serum, saliva, sputum, tissue, can be treated). Materials sold separately

Add 1% **Proteinase K** (v/v) at 20 mg/ml directly to a liquid sample. Mix well and incubate at room temperature for 15 minutes. Note: Up to 5% Proteinase K can be added (e.g., tissue). For example: Add 4-20 µl Proteinase K to each 400 µl sample.

(III) RNA Purification

- Perform all steps at room temperature and centrifugation at 10,000-16,000 x g.
- The sample input can be scaled up or down, proportionally.

1. Add 800 µl **Viral RNA Buffer** to each 400 µl sample¹ (2:1) and mix well.
2. Transfer the mixture into a **Zymo-Spin™ IC Column**² in a **Collection Tube** and centrifuge for 2 minutes. Transfer the column into a **new** collection tube.

Optional: At this point, DNase I treatment can be performed (see Appendices, page 7).

3. Add 500 µl **Viral Wash Buffer** to the column, centrifuge for 30 seconds and discard the flow-through. Repeat this step.
4. Add 500 µl ethanol (95-100%) to the column and centrifuge for 1 minute to ensure complete removal of the wash buffer. Carefully, transfer the column into a nuclease-free tube (not provided).
5. To elute RNA, add 15 µl **DNase/RNase-Free Water** directly to the column matrix and centrifuge for 30 seconds.

Alternatively, for highly concentrated RNA use ≥ 6 µl elution.

The eluted RNA³ can be used immediately or stored frozen.

ANEXO E

Q-RT-PCR implementada en este estudio.

Secuencia de Oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótidos	Secuencia 5'>3'	Concentración de Trabajo
Primer Reverse	5' GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA	50 µM
Primer Forward	5'CYAGCCTGCGTGGY	50 µM
Sonda	5'FAM TCC GGC CCC TGA ATG YGG C BHQ1	5 µM

Preparación de la mezcla de reacción.

Se utilizó el kit *qScript™ One-Step qRT-PCR Kit* en la siguiente proporción:

Concentración de Reactivos	Volumen
2X One-Step Master Mix	N x 12.5 μ l
50X qScript One-Step RT	N x 0.5 μ l
Primer Forward 50 μ M	N x 0.5 μ l
Primer Reverse 50 μ M	N x 0.5 μ l
Sonda 5 μ M	N x 0.5 μ l
Agua Libre de Nucleasas	N x 5.5 μ l
Volumen Total	N x 20 μl

Volumen total: 25 μ l

Amplificación de Ácidos Nucleicos

La amplificación se realizó en el equipo CFX 96TM Real-Time System de la marca BIORAD.

Ciclado de Q-RT-PCR

Step	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Transcripción Reversa	1	50°C	10 min.
Activación de Polimerasa	1	95°C	7 min 30 seg.
Amplificación	45	95°C	15 seg.
		55°C	1 min.

Detector: FAM

ANEXO F

Vircell MICROBIOLOGISTS

AMPLIRUN@ RHINOVIRUS RNA CONTROL

For in vitro diagnostic use

MBG091: Purified RNA of rhinovirus to be used to control in vitro diagnosis techniques based in nucleic acids amplification.

INTRODUCTION:

Rhinoviruses are nonenveloped, icosahedral, single stranded RNA (+) virus of small size (30 nm) belonging to the Picornaviridae family. There are more than 100 serotypes explaining why protective immunity has proved so elusive. It is estimated that about two thirds of common colds are caused by rhinovirus infections.

CHARACTERISTICS:

The lyophilized nucleic acid is included in a thermo-sealed foil pouch containing a silica gel bag. It is necessary to reconstitute it before use (refer to "Preparation of reagents").

Preparation: Grown in MRC-5 infected cells

Extract preparation: Commercial genomic RNA extraction method.

KIT CONTENTS:

[1] VIRCELL RHI RNA CONTROL: 1 vial with lyophilized RNA of rhinovirus, (1059 strain), (12500-20000 copies/ μ l once reconstituted (see Table 1)). RNA quantification has been performed by real-time PCR.

[2] VIRCELL CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION: 500 μ l of molecular biology grade water, DNase, RNase free.

Lot number	22MBC091001-C	
Concentration	copies/ μ l	16000

Table 1.

Materials required but not supplied: Additional diagnosis kit.

STORAGE REQUIREMENTS:

Special transport conditions not required. Store the lyophilized vial at 2-8 $^{\circ}$ C inside the foil pouch. Once the pouch is opened, reconstitute the lyophilized vial immediately and store between -70 $^{\circ}$ C and -90 $^{\circ}$ C after reconstitution (temperature indicated on the label).

STABILITY AND HANDLING OF REAGENTS:

Handle reagents in aseptic conditions to avoid microbial contaminations.

Use only the amount of reagent required for the test.

After control resuspension RNA solution should be aliquoted in order to avoid multiple freeze-thaw cycles. The product is stable until the expiry date indicated in the label, if the instructions for use are followed.

VIRCELL, S.L. does not accept responsibility for the mishandling of the reagents included in the kit.

RECOMMENDATIONS AND PRECAUTION

- 1) This product is for in vitro diagnosis use only and for professional qualified staff.
- 2) Sterile tips with aerosol barrier are essential to prevent contamination.
- 3) Specimens should be handled as in the case of infectious samples using safety laboratory procedures.

Thoroughly clean and disinfect all work surfaces with a freshly prepared solution of 0.5% sodium hypochlorite in deionized or distilled water.

4) In order to perform the test it is essential to have separate working areas.

5) Dispose of unused reagents and waste in accordance with all applicable regulations.

6) The component VIRCELL RNA CONTROL could include genetic material or substances of animal and/or human origin. VIRCELL RNA CONTROL contains purified nucleic acids. VIRCELL RNA CONTROL contains purified nucleic acids obtained from inactivated microorganism, nevertheless, it should be considered potentially infectious and handled with care. No present method can offer complete assurance that these or other infectious agents are absent. All materials should be handled and disposed as of potentially infectious. Observe the local regulations for clinical waste disposal.

7) Dilutions below 1000 copies/ μ l should be made immediately before use. Freezing of product dilutions containing less than 1000 copies/ μ l is not recommended as partial RNA degradation might occur.

PREPARATION OF THE REAGENTS:

1. Tear the foil pouch containing VIRCELL RNA CONTROL [1].

2. Centrifuge VIRCELL RNA CONTROL) 1 minute at 1000 g.

3. Add 50 μ l of VIRCELL CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION and mix until completely reconstituted. The concentration will be 12500-20000 copies/ μ l once reconstituted (see Table 1).

4. Shake with vortex for 30 seconds to dissolve and homogenize completely.

5. It is recommended to prepare VIRCELL RNA CONTROL aliquots. In case dilutions were to be prepared use VIRCELL CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION [2] for this purpose.

TEST PROCEDURE: Once nucleic acid is reconstituted, use it according to indications of additional diagnosis kit. Use resuspended VIRCELL CONTROL as an extracted clinical sample adding it directly to amplification reagents.

INTERNAL QUALITY CONTROL:

Each batch is subjected to internal quality control testing before releasing. Quality control analysis is performed by realtime PCR. Final quality control results for each particular lot are available.

INTERPRETATION OF RESULTS AND VALIDATION

PROTOCOL FOR USERS:

Refer to indications of additional diagnosis kit.

LIMITATIONS OF METHOD:

This reagent is intended to be used with methods of human diagnosis. This test has not been verified with other methods.

The user of this kit is advised to read carefully and understand the package insert. Strict adherence to the protocol is necessary to obtain reliable test results.

ANEXO G

Dirección de Epidemiología



Ministerio de Salud Argentina

SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA DE LA SALUD

FICHA EPIDEMIOLÓGICA INTERNADO Y/O FALLECIDO POR COVID-19 o IRA¹

ACTUALIZACIÓN 09/06/2023

Definición de Caso INTERNADO Y/O FALLECIDO POR COVID-19 o IRA: Caso sospechoso de COVID-19 con requerimiento clínico de internación y/o fallecido y/o toda persona con una infección respiratoria aguda con requerimiento de internación y/o fallecida.

Los casos que constituyen eventos respiratorios inusuales deben notificarse al Evento "Sospecho de virus emergente" y las muestras deben derivarse al Centro Nacional de Influenza. definición disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/guia-de-vigilancia-ira-2023>

IDENTIFICACIÓN DE LA INSTITUCIÓN

Establecimiento notificador: Provincia: Departamento:

Fecha de notificación: / / Apellido y nombre del notificador/a:

Teléfono: Correo electrónico:

IDENTIFICACIÓN DEL CASO

Tipo de documento: D.N.I. D.E. IND. Nº Apellido y Nombre:

Teléfono: Fecha de nacimiento: / / Embarazada: SI NO

Lugar de residencia: Provincia: Departamento: Localidad:

Domicilio: Calle / Manzana: Nº Piso: Depto.: Cód. Postal:

INFORMACIÓN CLÍNICA

Fecha de primera consulta: / / Fecha de inicio de 1º síntomas (FIS): / /

Fiebre < 38 °C	Dolor garganta	Tos	Dificultad respiratoria	Cefalea	Mialgias
Fiebre ≥ 38 °C	Vómitos	Rinitis/Congestión nasal	Anosmia de reciente aparición	Disgeusia de reciente aparición	Diarrea
Astenia					

Caso de (consignar en la sección Diagnóstico referido o constatado).

Bronquiolitis Neumonía IRAG Otro:

Presenta enfermedades previas, factores de riesgo, comorbilidades: SI NO

Asma	Diálisis crónica	Insuficiencia renal crónica	Fumador/a	Tuberculosis
Bajo peso al nacer	Embarazo y/o puerperio	Obesidad (IMC 30-39,9)	Insuficiencia cardíaca	Obesidad mórbida (IMC >39,9)
Bronquiolitis previa	Hepatopatía crónica	Inmunosupresión congénita o adquirida	Hipertensión arterial	Otras:
Diabetes	Enfermedad neurológica crónica	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	Neumonía aguda de la comunidad previa	
Diálisis aguda	Enfermedad oncológica	Ex fumador/a	Prematuridad	

Tratamiento de oseltamivir administrado: SI NO

Internado: SI / NO Fecha: / / UTI: SI / NO Fecha: / / ARM: SI / NO

Fallecido: SI / NO Fecha: / /

ANTECEDENTES EPIDEMIOLÓGICOS / VACUNACIÓN

Antecedente de viaje los últimos 14 días: SI NO Fecha: / / Lugar:

Vacunación COVID-19: SI NO Fecha última dosis: / /

Vacunación antigripal: SI NO Fecha última dosis: / /

¹ IRA: Infección Respiratoria Aguda

LABORATORIO

Tipo de muestra tomada:

Hisopado nasofaríngeo para test de Ag Hisopado nasofaríngeo para métodos moleculares Hisopado nasal Saliva

Otros: Fecha de toma de muestra: ____ / ____ / ____

No fue posible tomar muestra de laboratorio Por qué?.....

.....(consignar en observaciones)

Derivado para Influenza y OVR: SI NO Fecha de derivación ____ / ____ / ____

Establecimiento al que se deriva la muestra:

CLASIFICACIÓN DE CASO

En estudio	Influenza A - Positivo	
Virus sincicial respiratorio (VSR) Positivo	Influenza B - Positivo	
SARS-COV-2 por test de Ag	SARS-COV-2 positivo por métodos moleculares	
OVR (No SARS-COV-2, Influenza ni VSR) Positivo	Co-detección de virus respiratorios	
Negativo para SARS COV 2 y OVR	SARS COV 2 negativo por pruebas moleculares	

Firma y aclaración notificador/a:

ANEXO H

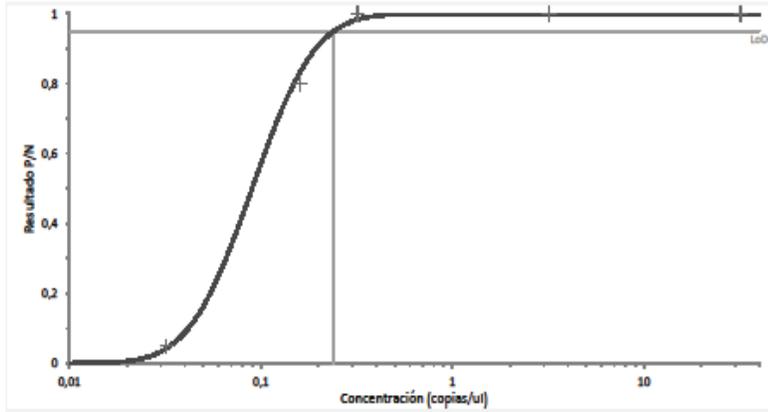
Fit: Resultado P/N

= *Analyse-It* 4.8.3.4

LoD 2 A1:C85

Filter: No filter

Last updated 16 Julio 2023 at 11:53 by Nadia Buono



Fit Probit

N	84
Resultado P/N=0	23
Resultado P/N=1	61

Equation: $\text{probit}(\text{Resultado P/N}) = 4,039 + 3,859 \log_{10} \text{Concentración}$

Parameter	Estimate	Wald 95% CI	SE
Constant	4,039	2,587 to 5,490	0,74066
\log_{10} Concentración	3,859	2,409 to 5,308	0,73946

Predict X given Probability

	Probability	Predicted Concentración	95% CI
LoD	0,950	0,2397	0,1593 to 0,3605

Effect of Model

Source	-log Likelihood	DF	Likelihood ratio X ² statistic	p
Difference	34,903	1	69,81	<0,0001 ¹
Fitted model	14,405	82		
Null model	49,309	83		

H0: $g(x) = \beta_0$

The model is no better than a null model $Y=r$.

H1: $g(x) = \beta_0 + \beta_1 x$

The model is better than the null model.

¹ Reject the null hypothesis in favour of the alternative hypothesis at the 5% significance level.

Rhinovirus + Enterovirus Real Time PCR Detection Kit

Patógeno. Descripción

Los rinovirus humanos (RVH) y los enterovirus infecciones en personas de todo el mundo. Son miembros del género *Enterovirus* de la familia de virus *Picornaviridae*. Son virus pequeños (30 nm de diámetro) con un genoma de RNA monocatenario de 7.000 a 7.500 nucleótidos encerrados en una cápside icosaédrica. Los RVH incluyen 153 tipos conocidos actualmente divididos en tres especies (A, B y C), mientras que los EVH consisten en 104 tipos que pertenecen a cuatro especies (A, B, C y D). Tradicionalmente, los enterovirus humanos se clasifican en poliovirus y no enterovirus (coxsackievirus, echovirus y enterovirus numerados).

Los RVH son la causa habitual del resfriado común, pero también se encuentran con frecuencia en infecciones de otitis media, sinusitis, bronquitis, neumonía y en las exacerbaciones del asma. Por lo tanto, debido a que están muy localizados en el tracto respiratorio, el modo de transmisión es principalmente a través de aerosoles de gotitas respiratorias y de fómites (superficies contaminadas), incluido el contacto directo de persona a persona. Actualmente no existe un tratamiento antiviral específico para la infección por rinovirus.

A diferencia de los RVH, la replicación de EVH no está restringida al tracto respiratorio, sino que también puede tener lugar en el intestino delgado y diseminarse a varios órganos diana. Se transmiten fácilmente de persona a persona a través del aire y / o vía fecal-oral, o incluso a través de objetos contaminados. La mayoría de las infecciones por EVH son asintomáticas o manifiestan síntomas comunes similares a los del resfriado. Sin embargo, las infecciones por EVH

pueden ser más graves, causando poliomielitis, meningitis, encefalitis, miocarditis, exantema conjuntivitis hemorrágica aguda e infecciones generalizadas graves en recién nacidos. Por lo tanto, la recolección de muestras para el diagnóstico de EVH debe realizarse de disponibilidad de medicamentos antivirales específicos. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos han reemplazado el aislamiento de virus en cultivos celulares como el método de elección para la detección de picornavirus, en parte debido a la notable sensibilidad, especificidad y rapidez de tales técnicas. Los RVH de la especie C, recientemente identificados, no se pueden cultivar en líneas celulares estándar, pero se pueden amplificar mediante PCR de transcripción reversa (RT). Tanto los RVH como los EVH conservan regiones 5' no codificantes (NCR) y algunos motivos de secuencia casi idénticos, lo que permite el diseño de cebadores universales para su amplificación en RT-qPCR. Se ha demostrado que la RT-PCR es mucho más sensible que el cultivo celular para la detección de estos virus.

VIASURE *Rhinovirus + Enterovirus* Real Time PCR

Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *Rhinovirus* y/o *Enterovirus* en muestras clínicas. La detección se realiza a través de la retrotranscripción en un solo paso y posterior amplificación a tiempo real de la secuencia diana, produciéndose ambas reacciones en el mismo pocillo. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Posteriormente la identificación de Rinovirus y Enterovirus se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada del gen 5'UTR.

Sensibilidad analítica

VIASURE Rhinovirus + Enterovirus Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA por reacción para Rhinovirus y Enterovirus (figuras 1 y 2).

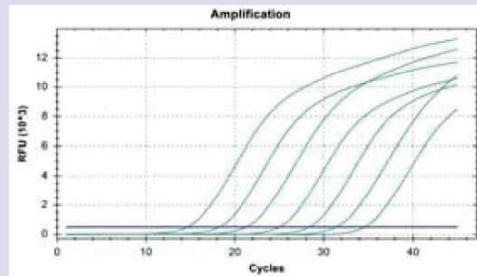
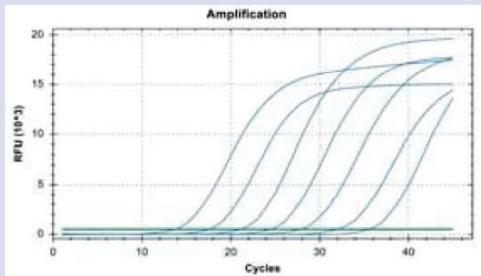


Figura 1. Diluciones seriadas de Rhinovirus (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar de Enterovirus (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal HEX).

Componentes

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Rhinovirus + Enterovirus 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
Rhinovirus + Enterovirus Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative Control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 x tiras de 8 tapones

Referencias

Referencia	Descripción
VS-RHE106L	Viasure <i>Rhinovirus + Enterovirus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile
VS-RHE106H	Viasure <i>Rhinovirus + Enterovirus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile
VS-RHE112L	Viasure <i>Rhinovirus + Enterovirus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile
VS-RHE112H	Viasure <i>Rhinovirus + Enterovirus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile
VS-RHE113L	Viasure <i>Rhinovirus + Enterovirus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile
VS-RHE113H	Viasure <i>Rhinovirus + Enterovirus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile

Metodología

Rehidratación de los pocillos y adición del DNA extraído



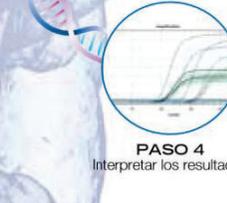
PASO 1
Reconstituir cada pocillo con 15 µl del tampón de rehidratación



PASO 2
Añadir 5 µl de la muestra de DNA / control positivo / control negativo



PASO 3
Colocar las tiras en el termociclador e iniciar el protocolo específico



PASO 4
Interpretar los resultados



CERTEST BIOTEC, S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (ESPAÑA)
www.certest.es





ANEXO J

altona

DIAGNOSTICS

Instrucciones de uso

RealStar[®]

Enterovirus RT-PCR Kit 1.0

03/2018 ES

RealStar[®]

RealStar[®]

Enterovirus RT-PCR Kit 1.0

Para utilizar con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



571013



96 03 2018



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Uso indicado

El RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa del ARN específico de enterovirus y rinovirus.

Componentes del kit

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen [µl/vial]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rojo	Positive Control	1	250
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control (IC) = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

Almacenamiento

- El RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deben llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C tras su llegada.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento del producto. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.
- El almacenamiento entre +2 y +8 °C no debe superar un período de dos horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

Material y dispositivos necesarios, pero no proporcionados

- Instrumento adecuado de PCR en tiempo real (ver capítulo 6.1. Instrumentos de PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico adecuados (ver capítulo 8.1 Preparación de la Master Mix)
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Centrífuga con rotor para placas de micro titulación, si se utilizan placas de reacción de 96 pocillos
- Agitador vortex
- Placas de reacción de 96 pocillos adecuadas o tubos de reacción con el material de cierre (óptico) correspondiente
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipetas con filtro (desechables)
- Guantes sin talco (desechables)

NOTA



Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se instalen, se calibren, se comprueben y se mantengan conforme a las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

NOTA



Se recomienda encarecidamente utilizar el rotor de 72 pocillos con los tubos de reacción de 0,1 ml adecuados, si se utiliza el Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o el Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

Información general

El género *Enterovirus* pertenece a la familia *picornaviridae* con genomas de ARN monocatenario positivo de entre 7000 y 8500 nucleótidos. Este género incluye 12 especies distintas (9 especies de *enterovirus* [EV] y 3 de *rhinovirus* [RV]), entre ellas las especies de *enterovirus* patógenos humanos A-D y las especies de *rhinovirus* A-C. Las 9 especies de *enterovirus* incluyen 68 subtipos mientras que las 3 especies de *rhinovirus* cuentan con 100 subtipos conocidos. [1].

En función del tipo de virus, los *enterovirus* se transmiten por vía fecal-oral (directamente de un humano a otro o indirectamente a través de objetos cotidianos, agua o comida). La transmisión vírica, especialmente en el caso de los *rhinovirus*, también es posible por medio de secreciones respiratorias [2, 3]. Las personas pueden contraer infecciones causadas por especies de *enterovirus* y de *rhinovirus*

en todo el mundo y en cualquier época del año. No existe un patrón para predecir cuándo van a circular estos virus y provocar infecciones y brotes. Los síntomas clínicos dependen del tipo de virus. Las infecciones por *rhinovirus* suelen limitarse al tracto respiratorio, con síntomas similares a los de un resfriado común, pero pueden conllevar enfermedades más graves como neumonía. Las infecciones por *enterovirus* no polio a menudo son estacionales y suelen asociarse con síntomas respiratorios y cardíacos, con infecciones cutáneas y de la mucosa, con sepsis neonatal o con meningitis vírica y encefalitis. El grupo *poliovirus* se suele asociar más con poliomielitis, una enfermedad infecciosa que causa parálisis y que puede llevar a la invalidez permanente y, generalmente, a la muerte. Los síntomas clínicos suelen ser vagos, lo que conlleva que las infecciones causadas por *enterovirus* resulten difíciles de distinguir de aquellas causadas por otros agentes infecciosos [2, 3].

[1] Lauber C, Gorbalenya AE. 2012. Toward genetics-based virus taxonomy: comparative analysis of a genetics-based classification and the taxonomy of picornaviruses. *Journal of Virology*, vol. 86 no. 7, 3905-3915. doi:10.1128/JVI.07174-11.

[2] https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/Enteroviren/Enteroviren_node.html (access: 18.12.2017)

[3] <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/index.html> (access: 18.12.2017)

NOTA



Debido a la evolución molecular relativamente rápida de los virus de ARN, hay un riesgo inherente para cualquier sistema de análisis basado en RT-PCR de que la acumulación de mutaciones con el tiempo pueda provocar resultados de falsos negativos.

Descripción del producto

El RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa del ARN específico de enterovirus y rinovirus.

El test incluye un sistema de amplificación heterólogo (Control interno) para identificar una posible inhibición de RT-PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

La tecnología de RT-PCR utiliza la transcriptasa inversa (RT) para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias diana específicas y sondas específicas para detectar el ADN amplificado. Las sondas están marcadas con fluorocromos (reporter) y captadores de fluorescencia (quencher).

Las sondas específicas para el ARN de EV y/o RV están marcadas con el fluorocromo FAM™. La sonda específica para el Control interno está marcada con el fluorocromo JOE™.

El uso de sondas unidas a diferentes fluorocromos permite la detección paralela del ARN específico de EV y/o RV y del Control interno en los canales de detección correspondientes del instrumento de PCR en tiempo real.

El test consta de tres procesos en un solo tubo:

- Transcripción inversa del ARN diana y del Control interno en ADNc
- Amplificación de PCR de objetivo y Control interno en ADNc
- Detección simultánea de amplicones de PCR mediante sondas marcadas con fluoróforos

El RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 se compone de:

- Dos reactivos Master (Master A y Master B)
- Control interno (IC)
- Control positivo
- Agua indicada para PCR

Master A y Master B contienen todos los componentes (tampón de PCR, transcriptasa inversa, ADN polimerasa, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir transcriptasa inversa, la amplificación mediante la PCR y la detección del ARN específico de EV y/o RV, y el Control interno en una configuración de reacción.

Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 se desarrolló y se validó para su uso con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Advertencias y precauciones

Lea las instrucciones de uso detenidamente antes de utilizar el producto.

- Antes del primer uso, compruebe los siguientes puntos respecto al producto y sus componentes:
 - Integridad
 - Si está completo en cuanto a número, tipo y volumen (ver capítulo 2. Componentes del kit)
 - Etiquetaje correcto
 - Si está congelado al llegar
- El uso de este producto se limita a personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras deben tratarse siempre como si fueran infecciosas o biopeligrosas conforme a los procedimientos de seguridad en el laboratorio.
- Utilice guantes protectores desechables sin talco, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (ADNasas/ARNasas) de la muestra y de los componentes del kit.
- Utilice siempre puntas de pipetas desechables libres de ADNasas/ARNasas con barreras de aerosol.
- Utilice siempre guantes protectores desechables sin talco cuando manipule los componentes del kit.
- Utilice áreas de trabajo separadas para (i) la preparación de las muestras, (ii) la configuración de reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de manera unidireccional. Utilice siempre guantes desechables en cada área y cámbieselos antes de acceder a un área distinta.
- Utilice suministros y equipamiento en cada área de trabajo separada y no los traslade de un área a otra.
- Almacene el material positivo o presuntamente positivo separadamente de todos los demás componentes del kit.
- No abra los tubos o placas de reacción después de la amplificación, para evitar la contaminación con amplicones.
- Pueden utilizarse controles adicionales utilizando de acuerdo con las pautas o requisitos de las regulaciones locales, estatales y/o federales, o de organizaciones de acreditación.
- No esterilice en la autoclave los tubos de reacción después de la PCR, ya que no degradará el ácido nucleico amplificado y conllevará el riesgo de contaminar la zona del laboratorio.
- No utilice componentes del kit cuya fecha de caducidad.
- Descarte muestras y residuos del test conforme a las regulaciones locales de seguridad.

Procedimiento

Preparación de las muestras

El ARN extraído es el material inicial para el RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0.

La calidad del ARN extraído tiene una repercusión fundamental en el rendimiento del test. Debe garantizarse que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico sea compatible con la tecnología de PCR en tiempo real. Los siguientes kits y sistemas son adecuados para la extracción de ácido nucleico:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

También pueden resultar adecuados sistemas alternativos de extracción de ácido nucleico. La idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico para su uso con el RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 debe validarla el usuario.

Si utiliza un procedimiento de preparación de muestras basado en centrifugación (spin column, en inglés) que incluya tampones de lavado que contengan etanol, se recomienda encarecidamente seguir un paso de centrifugación adicional durante 10 minutos a aproximadamente 17 000 x g (~13 000 rpm), utilizando un tubo de recogida nuevo, antes de la elución del ácido nucleico.

PRECAUCIÓN



Si su sistema de preparación de pruebas utiliza tampones de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor de la PCR en tiempo real.

PRECAUCIÓN



El uso de ARN portador es crucial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.

Si necesita más información o asistencia técnica en relación con el pretratamiento y la preparación de muestras, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

Preparación de la Master Mix

Todos los reactivos y muestras deben descongelarse completamente, mezclarse (pipeteando o aplicando un vortex suave) y centrifugarse brevemente antes de su uso.

El RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 contiene un Control interno heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de RT-PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de RT-PCR.

- ▶ Si se utiliza el Control interno como control de inhibición de RT-PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de muestras, prepare la Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (Control interno)	1 µl	12 µl
Volumen de Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Si se utiliza el Control interno como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de RT-PCR, añada el Control interno durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Sin importar que método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el Control interno **no debe** añadirse directamente a la muestra. El Control interno debe añadirse siempre a la mezcla de muestra y tampón de lisis. El volumen del Control interno que debe añadirse dependerá siempre y únicamente del volumen de la elución. Representa el 10 % del volumen de la elución. Por ejemplo, si se va a eluir el ácido nucleico en 60 µl de tampón de elución o agua, deberán añadirse 6 µl de Control interno por muestra a la mezcla de muestra/tampón de lisis.
- ▶ Si se añadió el Control interno durante el procedimiento de preparación de muestras, configure la Master Mix conforme al siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
--------------------------------	---	----

Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volumen de Master Mix	20 µl	240 µl

PRECAUCIÓN



Si se añadió el Control interno durante el procedimiento de preparación, al menos el control negativo debe incluir el Control interno.

PRECAUCIÓN



Sin importar que método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el Control interno directamente a la muestra.

Preparación de la reacción

- ▶ Pipetee 20 µl de la Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos o un tubo de reacción óptica.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl de los controles (control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	20 µl
Muestra o control	10 µl
Volumen total	30 µl

- ▶ Asegúrese de que al menos un Positivo y al menos uno negativo por serie.
- ▶ Mezcle a fondo las muestras y los controles con la Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una lámina adhesiva óptica y los tubos de reacción con las tapas adecuadas.

- ▶ Centrifugue la placa de 96 pocillos en una centrifuga con un rotor de placa de microtitulación durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real

Para obtener información básica sobre la preparación y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para obtener instrucciones detalladas para la programación en relación con el uso del RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 en instrumentos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

Configuración

- ▶ Defina la siguiente configuración:

Configuraciones	
Volumen de reacción	30 µl
Ramp Rate	Predeterminado
Referencia pasiva	Ninguno

Detectores de fluorescencia

- ▶ Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre de detector	Reporter	Quencher
ARN específico de EV y/o RV	EV y/o RV	FAM™	(Ninguno)
Internal Control (Control interno)	IC	JOE™	(Ninguno)

Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

- ▶ Defina el perfil de temperatura y la detección de fluorescencia:

	Fase	Repeticiones de ciclo	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:sec]

Transcripción inversa	Retención	1	-	55	20:00
Desnaturalización	Retención	1	-	95	02:00
Amplificación	Ciclo	45	-	95	00:15
			sí	55	00:45
			-	72	00:15

Análisis de datos

Para ver información básica en relación con el análisis de datos en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones sobre el análisis de los datos generados con el RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 en diferentes instrumentos específicos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14.

Servicio técnico).

Validez de las series de pruebas diagnósticas

Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una serie de pruebas diagnósticas **cualitativa** es **válida** si se cumplen las siguientes condiciones de control:

Id. de control	Canal de detección	
	FAM™	JOE™
Control positivo	+	+/-*
Control negativo	-	+

* La presencia o ausencia de una señal en el canal JOE™ no es relevante para la validez de la prueba.

Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una serie de pruebas diagnósticas **cualitativa** es **no válida** (i) si la serie no se ha completado o (ii) si no se cumple cualquiera de las condiciones de control para una serie de pruebas diagnósticas **válida**.

En caso de que obtenga una serie de pruebas diagnósticas **no válida**, repita las pruebas utilizando el resto de ácidos nucleicos purificados o empiece de nuevo con las muestras originales.

Interpretación de los resultados

Análisis cualitativo

Canal de detección		Interpretación del resultado
FAM™	JOE™	
+	+*	Se ha detectado ARN específico de EV y/o RV
-	+	No se ha detectado ARN específico de EV y/o RV. La muestra no contiene cantidades detectables de ARN específico de EV y/o RV.
-	-	Inhibición de la RT-PCR o fallo del reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja y someta a pruebas una nueva muestra.

* La detección del Control interno en el canal de detección JOE™ no es necesaria para resultados positivos en el canal de detección FAM™. Una carga alta de ARN de EV y/o RV en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

Evaluación de rendimiento

La evaluación de rendimiento del RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 se realizó utilizando ARN cuantificado transcripciones *in vitro* (IVT) bem como ARN genómico de enterovirus e rinovirus.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 se define como la concentración (copias/μl del eluido) de moléculas de ARN específico de enterovirus A71 y rinovirus 72 que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de la serie de diluciones de transcripciones *in vitro* (IVT) específicas de enterovirus A71 y rinovirus 72 de una concentración conocida.

Tabla 1: Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ARN de enterovirus A71

Conc. de entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,622	24	24	100,0
10,000	24	24	100,0
3,162	24	23	95,8
1,000	24	17	70,8
0,316	24	7	29,2
0,100	24	4	16,7
0,032	24	0	0,0
0,010	24	0	0,0
0,003	24	1	4,2

Tabla 2: Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ARN de rinovirus 72

Conc. de entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,622	24	24	100,0
10,000	24	24	100,0
3,162	24	24	100,0
1,000	24	21	87,5
0,316	24	18	75,0
0,100	24	13	54,2
0,032	24	1	4,2
0,010	24	1	4,2
0,003	24	1	4,2

La sensibilidad analítica del RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de ARN específico de enterovirus A71, la sensibilidad analítica es 3,40 copias/μl [95% de intervalo de confianza (CI): 2,03 - 7,68 copias/μl]
- Para la detección de ARN específico de rinovirus 72, la sensibilidad analítica es 1,25 copias/μl [95% de intervalo de confianza (CI): 0,71 - 3,01 copias/μl]

Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 se garantiza mediante la selección exhaustiva de los oligonucleótidos (cebadores y sondas). Los oligonucleótidos se comprobaron mediante un análisis de comparación con secuencias disponibles públicamente para asegurar que se detectarán todos los genotipos relevantes de EV y RV.

El RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Astrovirus
- Coronavirus 229E
- Herpes simplex virus 1
- Herpes simplex virus 2
- Adenovirus humano
- Virus parainfluenza humano
- Virus sincitial respiratorio humano
- Virus de la influenza A
- Virus de la influenza B
- Virus del sarampión
- Norovirus
- Parechovirus
- Rotavirus
- Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
- Virus de la varicela zoster

La especificidad analítica del RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0, con respecto a la detección de las diferentes cepas de enterovirus y rinovirus fue evaluada, analizando el ARN genómico extraído de diferentes patógenos humanos de las cepas de enterovirus y rinovirus.

La especificidad del RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 fue testada usando los siguientes patógenos humanos de las especies (serotipos) de enterovirus y rinovirus:

- Enterovirus A (Enterovirus A71)
- Enterovirus B (Echovirus 11)
- Enterovirus C (Coxsackie virus A24, Poliovirus Sabin 1, 2, 3)
- Enterovirus D (Enterovirus D68)
- Rhinovirus A (Rhinovirus A16)
- Rhinovirus B (Rhinovirus 72)
- Rhinovirus C (serotipo desconocido)

Precisión

La precisión para el RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 se determinó como variabilidad de intratest (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad de intertest (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). La variabilidad total se calculó combinando los tres análisis.

Tabla 3: Datos de precisión para la detección específica del ARN de enterovirus A71 and rhinovirus 72

Enterovirus A71 y rhinovirus 72		Ciclo de umbral medio (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	Enterovirus A71	31,68	0,18	0,57
	Rhinovirus 72	32,59	0,15	0,45
Variabilidad intertest	Enterovirus A71	31,24	0,08	0,26
	Rhinovirus 72	32,76	0,08	0,23
Variabilidad interlote	Enterovirus A71	31,44	0,29	0,91
	Rhinovirus 72	32,66	0,13	0,41
Variabilidad total	Enterovirus A71	31,38	0,25	0,79
	Rhinovirus 72	32,70	0,13	0,39

Tabla 4: Datos de precisión para la detección del Control interno

Controle interno	Ciclo de umbral medio (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	28,64	0,08	0,28
Variabilidad intertest	29,30	0,05	0,18
Variabilidad interlote	28,96	0,34	1,16
Variabilidad total	29,08	0,32	1,11

Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se limita a personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que esta test tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.
- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que esta prueba tenga un rendimiento óptimo.
- Esta el test no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben llevarse a cabo métodos adecuados de extracción de ácido nucleico antes de utilizar esta prueba de valoración.
- La presencia de inhibidores de la RT-PCR (p.ej. heparina) puede provocar falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del genoma de EV y/o RV cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar fallos al detectar la presencia del patógeno
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

Control de calidad

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO 13485 de altona Diagnostics GmbH, cada lote del RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

Servicio técnico

Si necesita asesoramiento técnico, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico:

E-mail: support@altona-diagnostics.com

Teléfono: +49-(0)40-5480676-0

Bibliografía

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

Marcas comerciales e información legal

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); RotorGene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

No debe considerarse que los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso aunque no se marquen específicamente como tales, carecen de protección legal.

El RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme a la directiva europea de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC.

Producto sin licencia con Health Canada y sin autorización ni aprobación de la FDA No disponible en todos los países.

© 2018 altona Diagnostics GmbH; reservados todos los derechos.

Primerdesign Ltd™

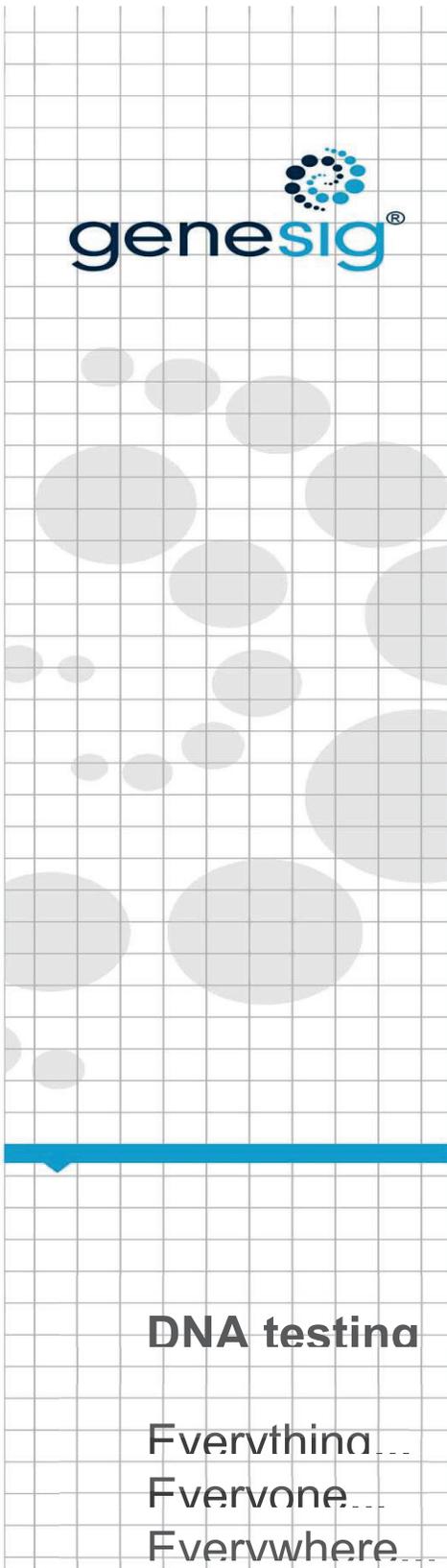
Human Rhinovirus all subtypes (generic)

5' non coding region (5'NCR)

genesig Advanced Kit®

150 tests

For general laboratory and research use only



DNA testing

Everything...
Everyone...
Everywhere...

Introduction to Human Rhinovirus all subtypes

(generic)

Rhinovirus is a genus of the Picornaviridae family of viruses. Rhinoviruses are the most common viral infective agents in humans, and a causative agent of the common cold. There are over 105 serologic virus types that cause cold symptoms, and rhinoviruses are responsible for approximately 50% of all cases.

Rhinoviruses have single-stranded positive sense RNA genomes of between 7.2 and 8.5kb in length. At the 5' end of the genome is a virus-encoded protein, and like mammalian mRNA, there is a 3' poly-A tail. Structural proteins are encoded in the 5' region of the genome and non structural at the end. This is the same for all picornaviruses. The viral particles themselves are not enveloped and are icosahedral in structure.

Rhinoviruses are composed of a capsid that contains four viral proteins VP1, VP2, VP3 and VP4. VP1, VP2, and VP3 form the major part of the protein capsid. The much smaller VP4 protein has a more extended structure and lies at interface between the capsid and the RNA genome. There are 60 copies of each of these proteins assembled as an icosahedron. Antibodies are a major defense against infection with the epitopes lying on the exterior regions of VP1-VP3.

Rhinoviruses have two main modes of transmission: In the past it was obvious that these viruses were transmitted directly from person-to-person via aerosols of respiratory droplets. However, now they are known to be transmitted indirectly via respiratory droplets that are deposited on the hands and then transported by fingers to the nose or eyes.

Rhinoviruses occur worldwide causing disease especially at schools for example which enhance transmission during fall and winter. They show symptoms such as fever, cough, and nasal congestion. The frequency of colds is high in childhood and decreases during adulthood most probably because of the possession of immunity.

Specificity

The Primerdesign™ genesig® Kit for Human Rhinovirus all subtypes (generic) (HRVsp) genomes is designed for the in vitro quantification of HRVsp genomes. The kit is designed to have the broadest detection profile possible whilst remaining specific to the HRVsp genome.

The primers and probe sequences in this kit have 100% homology with a broad range of HRVsp sequences based on a comprehensive bioinformatics analysis.

The primers have broad homology with a large range of serotypes included in the NCBI database. However, due to the inherent instability of RNA viral genomes, it is not possible to guarantee quantification of all clinical isolates.

If you require further information, or have a specific question about the detection profile of this kit then please send an e.mail to enquiry@primerdesign.co.uk and our bioinformatics team will answer your question.

Kit Contents

- HRVsp specific primer/probe mix (150 reactions **BROWN**) FAM labelled
- HRVsp positive control template (for Standard curve **RED**)
- Internal extraction control primer/probe mix (150 reactions **BROWN**) VIC labelled as standard
- Internal extraction control RNA (150 reactions **BLUE**)
- Endogenous control primer/probe mix (150 reactions **BROWN**) FAM labelled
- HRVsp/Internal extraction control/endogenous control RT primer mix (150 reactions **GREEN**)

Required for two step protocol only

- RNase/DNase free water (**WHITE**)
for resuspension of primer/probe mixes and internal extraction control RNA
- Template preparation buffer (**YELLOW**)
for resuspension of positive control template and standard curve preparation

Reagents and equipment to be supplied by the user

Real-Time PCR Instrument

RNA extraction kit

This kit is recommended for use with genesig EASY DNA/RNA Extraction kit. However, it is designed to work well with all processes that yield high quality RNA with minimal PCR inhibitors.

oasig™ Lyophilised OneStep or Precision™ OneStep 2x qRT-PCR MasterMix Contains complete one step qRT-PCR MasterMix

Pipettors and Tips

Vortex and centrifuge

1.5 ml tubes

Kit storage and stability

This kit is stable at room temperature but should be stored at -20°C on arrival. PrimerDesign does not recommend using the kit after the expiry date stated on the pack. Once the lyophilized components have been re-suspended, unnecessary repeated freeze/thawing should be avoided. The kit is stable for six months from the date of resuspension under these circumstances.

If a standard curve dilution series is prepared this can be stored frozen for an extended period. If you see any degradation in this serial dilution a fresh standard curve can be prepared from the positive control.

Suitable sample material

All kinds of sample material suited for PCR amplification can be used. Please ensure the samples are suitable in terms of purity, concentration, and RNA/DNA integrity (An internal PCR control is supplied to test for non specific PCR inhibitors). Always run at least one negative control with the samples. To prepare a negative-control, replace the template RNA sample with RNase/DNase free water.

Dynamic range of test

Under optimal PCR conditions genesig® HRVsp detection kits have very high priming efficiencies of >95% and can detect less than 100 copies of target template.

Notices and disclaimers

This product is developed, designed and sold for research purposes only. It is not intended for human diagnostic or drug purposes or to be administered to humans unless clearly expressed for that purpose by the Food and Drug Administration in the USA or the appropriate regulatory authorities in the country of use. During the warranty period Primerdesign genesig® detection kits allow precise and reproducible data recovery combined with excellent sensitivity. For data obtained by violation to the general GLP guidelines and the manufacturer's recommendations the right to claim under guarantee is expired. PCR is a proprietary technology covered by several US and foreign patents. These patents are owned by Roche Molecular Systems Inc. and have been sub-licensed by PE Corporation in certain fields. Depending on your specific application you may need a license from Roche or PE to practice PCR. Additional information on purchasing licenses to practice the PCR process may be obtained by contacting the Director of Licensing at Roche Molecular Systems, 1145 Atlantic Avenue, Alameda, CA 94501 or Applied Biosystems business group of the Applied Biosystems Corporation, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404. In addition, the 5' nuclease assay and other homogeneous amplification methods used in connection with the PCR process may be covered by U.S. Patents 5,210,015 and 5,487,972, owned by Roche Molecular Systems, Inc, and by U.S. Patent 5,538,848, owned by The Perkin-Elmer Corporation.

Trademarks

PrimerDesign™ is a trademark of Primerdesign Ltd.

genesig® is a registered trademark of Primerdesign Ltd.

The PCR process is covered by US Patents 4,683,195, and 4,683,202 and foreign equivalents owned by Hoffmann-La Roche AG. BI, ABI PRISM® GeneAmp® and MicroAmp® are registered trademarks of the Applied Biosystems Corporation). BIOMEK® is a registered trademark of Beckman Instruments, Inc.; iCycler™ is a registered trademark of Bio-Rad Laboratories, Rotor-Gene is a trademark of Corbett Research. LightCycler™ is a registered trademark of the Idaho Technology Inc. GeneAmp®, TaqMan® and AmpliTaqGold® are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc., The purchase of the Primerdesign™ reagents cannot be construed as an authorization or implicit license to practice PCR under any patents held by HoffmannLaRoche Inc.

Principles of the test

Real-time PCR

A HRVsp specific primer and probe mix is provided and this can be detected through the FAM channel.

The primer and probe mix provided exploits the so-called TaqMan® principle. During PCR amplification, forward and reverse primers hybridize to the HRVsp cDNA. A fluorogenic probe is included in the same reaction mixture which consists of a DNA probe labeled with a 5'-dye and a 3'-quencher. During PCR amplification, the probe is cleaved and the reporter dye and quencher are separated. The resulting increase in fluorescence can be detected on a range of real-time PCR platforms.

One Step vs. Two step real-time PCR

When detecting/quantifying the presence of a target with an RNA genome Primerdesign recommend the use of a one step qRT-PCR protocol. One step qRT-PCR combines the reverse transcription and real-time PCR reaction in a simple closed tube protocol. This saves significant bench time but also reduces errors. The sensitivity of a one step protocol is also greater than a two step because the entire biological sample is available to the PCR without dilution. This kit will also work well with a two step approach (Precision™ nanoScript2 reverse transcription kit and PrecisionPLUS™ MasterMix) if required but the use of oasig™ Onestep or Precision™ OneStep MasterMix is the preferred method.

Positive control

For copy number determination and as a positive control for the PCR set up, the kit contains a positive control template.

This can be used to generate a standard curve of HRVsp copy number / CT value. Alternatively the positive control can be used at a single dilution where full quantitative analysis of the samples is not required. Each time the kit is used, at least one positive control reaction must be included in the run. A positive result indicates that the primers and probes for detecting the target HRVsp gene worked properly in that particular experimental scenario. If a negative result is obtained the test results are invalid and must be repeated. Care should be taken to ensure that the positive control does not contaminate any other kit component which would lead to false-positive results. This can be achieved by handling this component in a Post PCR environment. Care should also be taken to avoid cross-contamination of other samples when adding the positive control to the run. This can be avoided by sealing all other samples and negative controls before pipetting the positive control into the positive control well.

Negative control

To validate any positive findings a negative control reaction should be included every time the kit is used. For this reaction the RNase/DNase free water should be used instead of template. A negative result indicates that the reagents have not become contaminated while setting up the run. If a positive result is obtained the results should be ignored and the test samples repeated. Possible sources of contamination should first be explored and removed.

Internal RNA extraction control

When performing RNA extraction, it is often advantageous to have an exogenous source of RNA template that is spiked into the lysis buffer. This control RNA is then co-purified with the sample RNA and can be detected as a positive control for the extraction process. Successful co-purification and real-time PCR for the control RNA also indicates that PCR inhibitors are not present at a high concentration.

A separate RT primer mix and a real-time PCR primer/probe mix are supplied with this kit to detect the exogenous RNA using real-time PCR. The PCR primers are present at PCR limiting concentrations which allows multiplexing with the target sequence primers. Amplification of the control cDNA does not interfere with detection of the HRVsp target cDNA even when present at low copy number. The Internal control is detected through the VIC channel and gives a CT value of 28+/-3 depending on the level of sample dilution.

Endogenous control

To confirm extraction of a valid biological template, a primer and probe mix is included to detect an endogenous gene. Detection of the endogenous control is through the FAM channel and it is NOT therefore possible to perform a multiplex with the HRVsp primers. A poor endogenous control signal may indicate that the sample did not contain sufficient biological material.

Carry-over prevention using UNG (unsuitable for onestep procedure and optional for two step procedure)

Carry over contamination between PCR reactions can be prevented by including uracilN-glycosylase (UNG) in the reaction mix. Some commercial mastermix preparations contain UNG or alternatively it can be added as a separate component. UNG can only prevent carry over from PCR reactions that include deoxyuridine triphosphate (dUTP) in the original PCR reaction. Primerdesign recommend the application of 0.2U UNG per assay with a 15 minute incubation step at 37°C prior to amplification. The heat-labile UNG is then inactivated during the Taq polymerase activation step.

Reconstitution Protocol

To minimize the risk of contamination with foreign DNA, we recommend that all pipetting be performed in a PCR clean environment. Ideally this would be a designated PCR lab or

PCR cabinet. Filter tips are recommended for all pipetting steps.

1. Pulse-spin each tube in a centrifuge before opening.

This will ensure lyophilised primer and probe mix is in the base of the tube and is not spilt upon opening the tube.

2. Reconstitute the kit components in the RNase/DNase free water supplied, according to the table below:

To ensure complete resuspension, vortex each tube thoroughly.

Component - resuspend in water	Volume
Pre-PCR pack	
HRVsp primer/probe mix (BROWN)	165 µl
Internal extraction control primer/probe mix (BROWN)	165 µl
RT primer mix (GREEN)	165 µl
Endogenous control primer/probe mix (BROWN)	165 µl
Pre-PCR heat-sealed foil	
Internal extraction control RNA (BLUE)	600 µl

3. Reconstitute the positive control template in the template preparation buffer supplied, according to the table below:

To ensure complete resuspension, vortex the tube thoroughly.

Component - resuspend in template preparation buffer	Volume
Post-PCR heat-sealed foil	
Positive Control Template (RED) *	500 µl

* This component contains high copy number template and is a VERY significant contamination risk. It must be opened and handled in a separate laboratory environment, away from the other components.

RNA extraction

The internal extraction control RNA can be added either to the RNA lysis/extraction buffer or to the RNA sample once it has been resuspended in lysis buffer.

DO NOT add the internal extraction control RNA directly to the unprocessed biological sample as this will lead to degradation and a loss in signal.

1. Add 4µl of the Internal extraction control RNA (BLUE) to each sample in RNA lysis/extraction buffer per sample.
2. Complete RNA extraction according to the manufacturers protocols.

One Step RT-PCR detection protocol

A one step approach combining the reverse transcription and amplification in a single closed tube is the preferred method. If however, a two step approach is required see page 11.

For optimum performance and sensitivity.

All pipetting steps and experimental plate set up should be performed on ice. After the plate is poured proceed immediately to the One Step amplification protocol. Prolonged incubation of reaction mixes at room temperature can lead to PCR artifacts that reduce the sensitivity of detection.

1. **For each RNA sample prepare a reaction mix according to the table below:** Include sufficient reactions for positive and negative controls.

Component	Volume
oasig™ OneStep or Precision™ OneStep 2x qRT-PCR MasterMix	10 µl
HRVsp primer/probe mix (BROWN)	1 µl
Internal extraction control primer/probe mix (BROWN)	1 µl
RNase/DNase free water (WHITE)	3 µl
Final Volume	15 µl

2. **For each RNA sample prepare an endogenous control reaction according to the table below (optional):**

This control reaction will provide crucial information regarding the quality of the biological sample.

Component	Volume
oasig™ OneStep or Precision™ OneStep 2x qRT-PCR MasterMix	10 µl
Endogenous control primer/probe mix (BROWN)	1 µl
RNase/DNase free water (WHITE)	4 µl
Final Volume	15 µl

3. **Pipette 15µl of these mixes into each well according to your real-time PCR experimental plate set up.**
4. **Pipette 5µl of RNA template into each well, according to your experimental plate set up.**

For negative control wells use 5µl of RNase/DNase free water. The final volume in each well is 20µl.

5. **If a standard curve is included for quantitative analysis prepare a reaction mix according to the table below:**

Component	Volume
oasig™ OneStep or Precision™ OneStep 2x qRT-PCR MasterMix	10 µl
HRVsp primer/probe mix (BROWN)	1 µl
RNase/DNase free water (WHITE)	4 µl
Final Volume	15 µl

6. **Preparation of standard curve dilution series.**

- 1) Pipette 90µl of template preparation buffer into 5 tubes and label 2-6
- 2) Pipette 10µl of Positive Control Template (RED) into tube 2
- 3) Vortex thoroughly
- 4) Change pipette tip and pipette 10 µl from tube 2 into tube 3
- 5) Vortex thoroughly

Repeat steps 4 and 5 to complete the dilution series

Standard Curve	Copy Number
Tube 1 Positive control (RED)	2×10^5 per μl
Tube 2	2×10^4 per μl
Tube 3	2×10^3 per μl
Tube 4	2×10^2 per μl
Tube 5	20 per μl
Tube 6	2 per μl

7. **Pipette 5 μl of standard template into each well for the standard curve according to your plate set-up**

The final volume in each well is 20 μl .

One Step Amplification Protocol

Amplification conditions using oasig™ OneStep 2x RT-qPCR MasterMix.

	Step	Time	Temp
	Reverse Transcription	10 mins	42 °C
	Enzyme activation	2 mins	95 °C
50 Cycles	Denaturation	10 secs	95 °C
	DATA COLLECTION *	60 secs	60 °C

* Fluorogenic data should be collected during this step through the FAM and VIC channels Amplification conditions using Precision™ OneStep 2x RT-qPCR MasterMix.

	Step	Time	Temp
	Reverse Transcription	10 mins	55 °C
	Enzyme activation	8 mins	95 °C
50 Cycles	Denaturation	10 secs	95 °C
	DATA COLLECTION *	60 secs	60 °C

* Fluorogenic data should be collected during this step through the FAM and VIC channels

Alternative two step reverse transcription/real-time PCR protocol

Reverse Transcription

If you need to perform separate reverse transcription and amplification (two step Real Time PCR) then we recommend the Primerdesign Precision™ nanoScript2 Reverse Transcription kit. A reverse transcription primer (**GREEN**) is included and is designed for use with the Precision™ nanoScript2 reverse transcription kit. A protocol for this product is available at www.primerdesign.co.uk

1. **After reverse transcription, prepare a reaction mix according to the table below for each cDNA sample**

Component	Volume
PrecisionPLUS™ 2x qPCR MasterMix	10 µl
HRVsp primer/probe mix (BROWN)	1 µl
Internal extraction control primer/probe mix (BROWN)	1 µl
RNAse/DNAse free water (WHITE)	3 µl
Final Volume	15 µl

2. **Pipette 15µl of this mix into each well according to your real-time PCR experimental plate set up.**
3. **Prepare sample cDNA templates for each of your samples by diluting the RT reaction mix 1:5 in RNAse/DNAse free water.**
4. **Pipette 5µl of cDNA template into each well, according to your experimental plate setup.**

The final volume in each well is 20µl. For negative control wells use 5µl of RNAse/DNAse free water.

Alternative two step amplification protocol

Amplification conditions using PrecisionPLUS™ 2x qPCR MasterMix.

Standard Curve	Step	Time	Copy NumberTemp
	UNG treatment (if required) **	15 mins	37 °C
	Enzyme activation (if required)	2 mins	95 °C
50 Cycles	Denaturation	10s	95 °C
	DATA COLLECTION *	60s	60 °C

* Fluorogenic data should be collected during this step through the FAM and VIC channels

** Required if your Mastermix includes UNG to prevent PCR carryover contamination

Interpretation of Results

Target	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+ive	+ive	-ive	+ive	+ive
+ive	-ive	-ive	+ive	+ive
-ive	+ive	-ive	+ive	-ive
-ive	-ive	-ive	-ive	Experiment fail
+ive	+ive	+ive	+ive	Experiment fail

Internal PCR control

The CT value obtained with the internal control will vary significantly depending on the extraction efficiency, the quantity of RNA added to the RT and PCR reaction and the individual machine settings. CT values of 28 ± 3 are within the normal range. When amplifying a HRVsp sample with a high genome copy number, the internal extraction control may not produce an amplification plot. This does not invalidate the test and should be interpreted as a positive experimental result.

Endogenous control

The signal obtained from the endogenous control primer and probe set will vary according to the amount of biological material present in a given sample. An early signal indicates the presence of a good yield of biological material. A late signal suggests that little biological material is present in the sample.