

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA,  
TR-RCP MULTIPLEX EN TIEMPO REAL Y LUMINEX® EN LA  
DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS EN ADULTOS CON  
NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster  
en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Clínica y Memoria  
para optar al Título de Bioquímico por:

***YARA CAROLINA PRADES PÉREZ***

**Directora de Tesis: Dra. Vivian Luchsinger F.**

**Co-Directora de Tesis: Dra. Inés Contreras**

**Santiago-CHILE**

**Octubre 2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**YARA CAROLINA PRADES PÉREZ**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día 30 de Octubre de 2014.

**Director de Tesis:**

**Dra. Vivian Luchsinger F.** \_\_\_\_\_

**Co-director de Tesis:**

**Dra. Inés Contreras** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Carmen Romero O.** \_\_\_\_\_

**Dra. Daniela Seelenfreund** \_\_\_\_\_

**Dr. Aldo Gaggero G.** \_\_\_\_\_

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>Agradecimientos.</b> . . . . .	<b>4</b>
<b>Financiamiento.</b> . . . . .	<b>5</b>
<b>Índice de Figuras.</b> . . . . .	<b>6</b>
<b>Índice de Tablas.</b> . . . . .	<b>7</b>
<b>Índice de Anexos.</b> . . . . .	<b>8</b>
<b>Listado de Abreviaturas.</b> . . . . .	<b>9</b>
<b>Resumen.</b> . . . . .	<b>11</b>
<b>Abstract.</b> . . . . .	<b>13</b>
<b>Introducción.</b> . . . . .	<b>15</b>
<i>I.- Neumonía adquirida en la comunidad (NAC): Generalidades.</i> . . . . .	<b>15</b>
<i>II.- Etiología.</i> . . . . .	<b>15</b>
<i>III.- Métodos de detección y diagnóstico.</i> . . . . .	<b>20</b>
<b>Hipótesis.</b> . . . . .	<b>28</b>
<b>Objetivos.</b> . . . . .	<b>28</b>
<i>I.- Objetivo General.</i> . . . . .	<b>28</b>
<i>II.- Objetivos específicos.</i> . . . . .	<b>28</b>
<b>Materiales y Métodos.</b> . . . . .	<b>29</b>
<b>Resultados.</b> . . . . .	<b>37</b>
<b>Discusión.</b> . . . . .	<b>54</b>
<b>Conclusiones.</b> . . . . .	<b>63</b>
<b>Bibliografía.</b> . . . . .	<b>64</b>
<b>Anexos.</b> . . . . .	<b>68</b>

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a la Dra. Vivian Luchsinger, mi directora de tesis, quien me confió esta gran tarea de investigación, me guio a través de todo este proceso, alentó mis preguntas y mi curiosidad y me corrigió cuando fue necesario. También agradecer a mi co-directora, la Dra. Inés Contreras por confiar ciegamente en nuestro trabajo conjunto y por apoyar esta tesis como parte del claustro académico.

También agradezco a toda la gente del programa de virología, con especial mención al Dr. Fidel Avendaño, quien traspasó su gran conocimiento en inmunofluorescencia, al Sr. Cristian Moreno y a la Srta. Dina Silva, que junto a Rosita alegraron mis días de arduo trabajo, me enseñaron las técnicas usadas en esta tesis y más, y sobre todo la importancia del trabajo diligente y responsable, al Dr. Luis Lizama, quien supervisó pacientemente la técnica de Luminex<sup>®</sup> y siempre aclaró mis dudas, y a los alumnos tesistas que pasaron por el laboratorio durante este tiempo, María José Bruno, Matías Silva y Carolina Gatica.

Quiero agradecer a mis amigos, tanto de la carrera, del colegio y de la vida, que escucharon mi emoción por este tema con paciencia y comprensión, a pesar de que no entendieran nada de lo que decía. Quiero agradecer muy especialmente a mi pololo Christopher por apoyarme incondicionalmente, por acompañarme, luego de un arduo día de trabajo, con una dona, café, por llamarme y mandarme mensajes de ánimo y por hacer del fin de semana, el merecido descanso después de una larga semana de trabajo.

Finalmente quiero agradecer a mis padres, que a pesar de sus posibles prejuicios y aprehensiones, sin ellos habría sido imposible cursar toda esta carrera, su apoyo fue el soporte principal de que este camino haya resultado tan exitoso y que culmine en este escrito.

Muchas cosas cambiaron en este tiempo, entre ellas yo misma, y a estas personas que estuvieron en este proceso, les agradezco mucho su incondicionalidad y apoyo.

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Virus Respiratorios, Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Esta investigación fue financiada completamente con recursos del proyecto FONDECYT N°1121025.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.-** Esquema del procedimiento de la técnica Luminex<sup>®</sup>.

**Figura 2:** Detección de FLU A/B por IF clásica con distintas diluciones de anticuerpos monoclonales.

**Figura 3:** Curva de fluorescencia y  $C_t$  de la RCP en tiempo real de un adulto con NAC positivo para VRS.

**Figura 4:** Distribución bimensual del enrolamiento de adultos con NAC entre Julio de 2012 y Enero de 2014.

**Figura 5:** Detecciones virales, realizadas por la TR-RCP multiplex en tiempo real, de los 113 adultos con NAC.

**Figura 6:** Detecciones virales, realizadas por Luminex<sup>®</sup>, de los 113 adultos con NAC.

**Figura 7:** Detecciones de virus respiratorios por las técnicas de IF clásica, TR-RCP y Luminex<sup>®</sup> en 113 adultos con NAC.

**Figura 8:** Correlación entre la intensidad de fluorescencia media (MFI) de Luminex<sup>®</sup> y ciclo umbral de detección ( $C_t$ ) de la TR-RCP en detecciones coincidentes para el total de virus, para RVh y FLU A en adultos con NAC.

**Figura 9:** Curva ROC para la detección de casos positivos, del total de detecciones y por cada virus de las técnicas de Luminex<sup>®</sup> e IF clásica, en referencia a la TR-RCP, en adultos con NAC.

**Figura 10:** Parámetros demográficos, clínicos y de evolución significativamente diferentes entre 68 adultos con NAC y detección viral y 45 sin detección por las técnicas de TR-RCP y/o Luminex<sup>®</sup>.

**Figura 11:** Parámetros demográficos, clínicos y de evolución con diferencias significativas para 60 adultos con NAC con detección viral y 53 sin detección por la técnica de TR-RCP.

**Figura 12:** Parámetros demográficos, clínicos y de evolución con diferencias significativas para 60 adultos con NAC y detección viral y 53 sin detección por la técnica de Luminex<sup>®</sup>.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1:** Detección de antígenos de VRS, FLU A/B, AdV y PiV 1-3 mediante IF clásica utilizando diferentes diluciones de anticuerpos monoclonales en adultos con NAC.

**Tabla 2:** Detección de virus respiratorios por TR-RCP en casos con detección discordante por Luminex<sup>®</sup> (26 casos), utilizando distintas proporciones de volumen de solución TE, en adultos con NAC.

**Tabla 3:** Detecciones de virus respiratorios por la técnica de TR-RCP, ANF y TNF en 58 adultos con NAC.

**Tabla 4:** Detecciones virales totales obtenidos por las técnicas de IF rápida, IF clásica, TR-RCP y Luminex<sup>®</sup> en adultos con NAC.

**Tabla 5:** Sensibilidad, especificidad, VP y coeficiente kappa, de Luminex<sup>®</sup>, en comparación con la TR-PCR, para el total de casos positivos (n=113), detecciones totales (n=131) y por virus en 113 adultos con NAC.

**Tabla 6:** Sensibilidad, especificidad, VP y coeficiente kappa, de la IF clásica, en comparación con la TR-PCR, para el total de casos positivos (n=105), detecciones totales (n=131) y por virus en 113 adultos con NAC.

**Tabla 7:** Sensibilidad, 1-especificidad y área bajo la curva (AUC) para el total de casos, detección total y por cada virus para las técnicas de IF clásica y Luminex<sup>®</sup>, respecto de la TR-RCP, en adultos con NAC.

**Tabla 8:** Análisis de factores que influyen en la implementación de las técnicas de IF, TR-RCP y Luminex<sup>®</sup>.

**Tabla 9:** Tabulación de los parámetros que influyen en la implementación de las técnicas de IF, TR-RCP y Luminex<sup>®</sup> en la detección de virus respiratorios en adultos con NAC.

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Anexo 1.** Certificado de aprobación del comité de bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, del Servicio de Salud Metropolitano Sur y Oriente y consentimiento informado.

**Anexo 2.** Criterio de estratificación de la gravedad de los pacientes.

**Anexo 3.** Criterios de Análisis para IF.

**Anexo 4.** Parámetros de programación y análisis de TR-RCP en tiempo real multiplex.

**Anexo 5.** Parámetros de programación y análisis del Luminex<sup>®</sup>.

**Anexo 6.** Clasificación de los datos demográficos, clínicos y de evolución obtenidos de las fichas clínicas para cada paciente.



## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>AdV</b>	Adenovirus
<b>ANF</b>	Aspirado Nasofaríngeo
<b>AUC</b>	<i>Area under curve</i> (Área bajo la curva)
<b>BoVh/hBoV</b>	Bocavirus humano/ <i>Human Bocavirus</i>
<b>CoVh /hCoV</b>	Coronavirus humano/ <i>Human coronavirus</i>
<b>CSM</b>	Clínica Santa María
<b>C<sub>t</sub></b>	<i>Cycle Threshold</i> (Ciclo umbral)
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
<b>FLU</b>	Virus influenza/ <i>Influenza virus</i>
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HCUCH</b>	Hospital Clínico de la Universidad de Chile
<b>HLC</b>	Hospital de Infecciosos Dr. Lucio Córdova
<b>IF/IFA</b>	Inmunofluorescencia/ <i>Immunofluorescence assay</i>
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>IC</b>	Control interno de RNA
<b>MFI</b>	<i>Median fluorescence intensity</i> (Intensidad de fluorescencia media)
<b>MPVh/hMPV</b>	Metapneumovirus humano/ <i>Human metapneumovirus</i>
<b>NA</b>	Neuraminidasa
<b>NAC/CAP</b>	Neumonía adquirida en la comunidad/ <i>Community acquired pneumonia</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampón fosfato salino)
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva
<b>PiV</b>	Virus Parainfluenza/ <i>Parainfluenza virus</i>
<b>PSI</b>	<i>Pneumonia Severity Index</i> (Índice de gravedad de la neumonía)
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleico)
<b>ROC</b>	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (Característica Operativa del Receptor)
<b>RVh/hRV</b>	Rinovirus humano/ <i>Human Rinovirus</i>
<b>RVP</b>	<i>Respiratory Viral Panel</i> (Panel de virus respiratorios)

<b>SAPE</b>	<i>Streptavidine-R-Phycoerythrin</i> (Streptavidina-R-Ficoeritrina)
<b>TNF</b>	Torulado Nasofaríngeo
<b>TR</b>	Transcripción reversa
<b>TR-RCP/RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa/ <i>Polymerase chain reaction with reverse transcription</i>
<b>TSPE</b>	<i>Target-Specific Primer Extension</i> (Extensión de partidores blanco específica)
<b>UTM</b>	<i>Universal Transport Media</i> (Medio de transporte universal)
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VRS/RSV</b>	Virus respiratorio sincicial/ <i>Respiratory Sincitial virus</i>

## RESUMEN

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es una inflamación del epitelio respiratorio que afecta mayormente a menores de 5 años y mayores de 75 años. En el mundo es la 3° causa de muerte con un 6,7% de mortalidad y en Chile representa el 20% de la mortalidad en la población general, constituyendo un problema de salud pública. En adultos los agentes etiológicos más frecuentes son bacterianos; sin embargo, en los últimos años se ha reconocido a los virus respiratorios como causa frecuente de NAC, siendo los más comunes el virus influenza (FLU), respiratorio sincicial (VRS), parainfluenza (PiV) y adenovirus (AdV). Los adultos presentan una menor excreción viral, por lo que se requieren técnicas de mayor sensibilidad. Existen diversos métodos para el diagnóstico, incluyendo la detección de antígenos por inmunofluorescencia (IF), de genoma por la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (TR-RCP) en tiempo real y la más reciente Luminex<sup>®</sup>, de la cual existen pocas publicaciones que avalen su efectividad y no se dispone de información en nuestro país, a pesar de su gran potencialidad. En este trabajo se comparó la efectividad de las técnicas de IF, TR-RCP en tiempo real y Luminex<sup>®</sup>, en la detección de virus respiratorios, en muestras de adultos con NAC, analizando su rendimiento, complejidad de ejecución y costos de implementación.

Se estudiaron 113 pacientes mayores de 18 años hospitalizados por NAC. De cada uno se registraron los antecedentes clínicos y se obtuvo una muestra respiratoria para detectar virus por IF clásica (FLU A/B, VRS, PiV 1-3, AdV con Sigma<sup>®</sup> y Metapneumovirus (MPVh) con Hybrid Diagnostics<sup>®</sup>) y rápida (Hybrid Diagnostics<sup>®</sup>); por TR-RCP en tiempo real con el sistema comercial multiplex para virus respiratorios (Sacace Biotechnologies<sup>®</sup>) y por Luminex<sup>®</sup> (xTAG<sup>®</sup> RVP). Se analizó el rendimiento de las técnicas con características demográficas y clínicas de los pacientes mediante las pruebas estadísticas: Z, t y de correlación de Pearson con un  $p < 0.05$  como significativo. Se determinó la sensibilidad, especificidad, valores predictivos, coeficiente de concordancia Kappa ( $\kappa$ ), la curva ROC y las áreas bajo la curva (AUC) con el programa estadístico GraphPad Prism<sup>®</sup>.

El rendimiento de la RT-RCP (49,6%) y de Luminex<sup>®</sup> (53,1%) fue similar ( $p=0,6$ ) y ambos fueron significativamente mayores que la IF clásica (2,7%) y rápida (0%) ( $p=0$ ). Rinovirus

(RVh, 31,8%) y FLU A/B (14,2%) fueron los agentes detectados con mayor frecuencia. Luminex<sup>®</sup> coincidió con la TR-RCP en todas las detecciones de VRS (4,4%) y MPVh (1,8%) y fue el único que detectó Coronavirus (CoVh, 1,8%). La IF clásica solo detectó 1 caso de VRS (1%) y 2 de FLU A/B (1,9%). Respecto a la TR-RCP, la sensibilidad, especificidad, coeficiente  $\kappa$  y la AUC de Luminex<sup>®</sup> fue 89,9%, 82,5%, 0,7 y 0,86 y de la IF clásica fue 11,5%, 100%, 0,2 y 0,53 respectivamente. Se estableció una relación inversamente proporcional entre la fluorescencia (MFI) de Luminex<sup>®</sup> y el  $C_t$  de la TR-RCP para las detecciones coincidentes del total de muestras y las de RVh ( $p < 0,0001$ ). No se encontraron diferencias significativas en los datos demográficos, clínicos y de evolución entre los pacientes con detección viral por Luminex<sup>®</sup> y por RT-RCP. Luminex<sup>®</sup> permitió estudiar simultáneamente un mayor número de virus y de muestras, pero su costo y tiempo de procesamiento son más altos que las otras técnicas.

En conclusión, Luminex<sup>®</sup> posee una buena sensibilidad y especificidad para detectar virus respiratorios en adultos con NAC, en comparación a la TR-RCP, por lo que esta técnica es una opción apropiada para el diagnóstico viral de estos pacientes aunque su implementación en la rutina de un laboratorio puede estar dificultado por su aun alto costo. Por el contrario, la IF no debiera usarse en la detección de virus respiratorios en adultos.

## ABSTRACT

### **“Comparison between immunofluorescence assays, real time multiplex RT-PCR and Luminex® in the detection of respiratory viruses in adults with community acquired pneumonia”**

Community acquired pneumonia (CAP) is an inflammation of the respiratory epithelium. It affects mostly children younger than 5 and adults older than 75 years. It's the third cause of death worldwide, with a 6.7% mortality rate and represents a 20% mortality in general population in Chile, becoming a public health problem. In adults, the most frequent etiologic agents are bacteria; but in the last few years, respiratory viruses were acknowledged as frequent causes of CAP; influenza virus (FLU), respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza virus (PiV) and adenovirus (AdV) being the most common. Adults present low viral excretion, for it is required techniques with great sensibility. There are various diagnostics methods, including antigen detection by immunofluorescence assay (IFA), genome detection by real time polymerase chain reaction with retrotranscription (RT-PCR) and the most novel Luminex®, of which are few papers that prove its effectivity and there is no information for our country, despite its great potential. In this work, the performance of IFA, real time RT-PCR and Luminex® was compared in the detection of respiratory viruses in adults with CAP, analyzing performance, execution complexity and mounting costs.

113 patients above 18 years hospitalized with CAP were enrolled. For each one, clinical data were registered and a respiratory sample was obtained for detecting respiratory viruses by classic IFA (FLU A/B, PiV 1-3, RSV, AdV, Sigma®; human Metapneumovirus (hMPV), Hybrid Diagnostics®), fast IFA (Hybrid Diagnostics®), multiplex real time RT-PCR for respiratory virus (Sacace Biotechnologies®) and by Luminex® (xTAG® RVP). Performance of each technique and demographic and clinical data were analyzed by statistical tests: Z, t and Pearson correlation with a  $p < 0.05$  as significant. Sensitivity, specificity, predictive values, Kappa ( $\kappa$ ) value, ROC curve and area under curve (AUC) were calculated using GraphPad Prism® statistical software.

In respiratory virus detection, the performance of RT-PCR (49.6%) and Luminex<sup>®</sup> (53.1%) were similar ( $p=0.6$ ) and both were significantly higher than classic (2.7%) and rapid IFA (0%) ( $p=0$ ). Human rhinovirus (hRV, 31.8%) and FLU A/B (14.2%) were the most frequently detected agents. Luminex<sup>®</sup> presented the same detections as RT-PCR for RSV (4.4%) and hMPV (1.8%) and was the only one able to detect human coronavirus (hCoV, 1.8%). Classic IFA only detected 1 case of RSV (1%) and 2 of FLU A/B (1.9%). In comparison to the RT-PCR, sensibility, specificity, Kappa value and AUC obtained by Luminex<sup>®</sup> was 89.9%, 82.5%, 0.7 and 0.86 and the values obtained by classic IFA was 11.5%, 100%, 0.2 and 0.53. An inverse proportional relation was established between Luminex<sup>®</sup> fluorescence (MFI) and RT-PCR  $C_t$  values for coincident detection in all samples and for hRV detection ( $p<0.0001$ ). There are no significant differences in demographic, clinical and disease evolution data between patients with viral detection by Luminex<sup>®</sup> or RT-PCR. Luminex<sup>®</sup> possesses the biggest sample processing capability and viral type detection, but is more expensive and has the biggest processing time lapse than the other techniques.

Finally, Luminex<sup>®</sup> possesses a high sensibility and specificity for detecting respiratory viruses in adults with CAP in comparison to RT-PCR, showing that it is a good and appropriate option for viral diagnosis in these patients, although its implementation in a routine diagnostic laboratory could be difficult for its high costs. On the contrary, classic IFA had a low performance and should not be used in detecting respiratory viruses in adults.

## INTRODUCCIÓN

### *I.- Neumonía adquirida en la comunidad (NAC): Generalidades*

La NAC es una enfermedad que involucra inflamación del epitelio respiratorio, con síntomas como dificultad para respirar, tos, expectoración, dolor en el pecho, fatiga, fiebre y escalofríos. El diagnóstico de esta enfermedad se basa en un criterio clínico, de acuerdo a los síntomas y desarrollo de la enfermedad y es confirmado por la observación de infiltrados pulmonares en una radiografía de tórax. Algunos factores de riesgo en la evolución de la NAC, favoreciendo su gravedad, son el tabaquismo, el alcoholismo, enfermedades respiratorias, hepáticas o renales, diabetes mellitus, inmunosupresión por drogas (transplantados) o infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), entre otros (1).

La enfermedad es más frecuente en niños menores de 5 años y adultos mayores de 75 años (proporción de 34/1000 individuos), lo que estaría influido por la disminuida capacidad de acción del sistema inmunológico asociado a la edad (1). En países en desarrollo la incidencia puede ser hasta 5 veces mayor que en países desarrollados (2), convirtiéndola en la 3ª causa de muerte después de la isquemia y los accidentes cerebrovasculares, con un 6,7% de la mortalidad mundial (3). La letalidad de esta enfermedad varía entre 3% en pacientes ambulatorios a 10-20% en hospitalizados. En Chile, en el año 2009, determinó una mortalidad de 20% en la población general, por lo que independiente de su causa, esta enfermedad es un problema de salud pública.

### *II.- Etiología*

Las causas de NAC pueden ser diversas, entre los cuales están las infecciones bacterianas y virales, su identificación es vital para establecer un tratamiento adecuado, así como para estudiar la correlación entre la gravedad de la neumonía y la detección de uno o más agentes patógenos (1).

En adultos se considera que los agentes etiológicos más comunes son de origen bacteriológico, siendo *Streptococcus pneumoniae* el más frecuente (3), por lo que generalmente el tratamiento inicial frente a un diagnóstico de NAC es con antibiótico. Otros agentes bacterianos involucrados son bacterias atípicas como *Chlamidia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella* spp., las que pueden infectar al paciente como agente único o en coinfección, convirtiéndose en un factor de riesgo en la evolución de la NAC (4, 5).

En los últimos años ha aumentado el reconocimiento de los virus respiratorios como causa frecuente de NAC en adultos, facilitado por la introducción de pruebas diagnósticas de mayor sensibilidad que, además, detectan múltiples virus (3). Aunque la mayoría de las guías clínicas reconocen a los virus como causa, no incluyen recomendaciones respecto a su manejo, debido en gran parte a la escasa información disponible sobre prevalencia, presentación clínica y desarrollo en adultos (5). Los agentes virales más comunes que causan esta patología son el virus influenza (FLU), virus respiratorio sincicial (VRS), virus Parainfluenza (PiV) y adenovirus (AdV), aunque han aparecido en escena otros como Bocavirus (BoVh) y nuevos subtipos de Coronavirus (CoVh) (2). Algunas características de estos virus las resumiremos a continuación:

**1.- Virus influenza:** Es uno de los agentes más frecuentes de infección respiratoria en el mundo. Pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y se clasifican en 3 tipos: A, B y C, los que comparten características estructurales, como el diámetro de 50 a 120 nm y la forma esférica, la presencia de una envoltura formada por una bicapa lipídica con glicoproteínas en forma de espículas insertadas y un genoma de ácido ribonucleico (en inglés *ribonucleic acid*, RNA) con polaridad negativa. El RNA está compuesto de 7 a 8 fragmentos y codifica para 9 proteínas diferentes, entre estructurales y no estructurales. Las proteínas del manto se denominan Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA), y la combinación de los tipos de estas proteínas determina el subtipo viral. Ambas son altamente propensas a presentar modificaciones por mutaciones puntuales (*drifts*), que marcan el comportamiento estacional de la infección, las cuales son de intensidad variable y más frecuentes en el invierno, y reordenamientos de los fragmentos del genoma (*shifts*), que pueden generar epidemias o pandemias de mayor escala (6). Las



epidemias de influenza afectan entre un 5 a un 30% de la población, con grados variables de morbilidad y algunos casos de muerte en adultos mayores con condiciones médicas previas (3).

**2.- *Virus respiratorio sincicial*:** Es la principal causa de infecciones respiratorias agudas bajas en niños y, con el aumento de la sensibilidad de las técnicas de detección, se ha demostrado que es un virus relevante en ancianos e inmunocomprometidos (7). Pertenece a la familia *Paramyxoviridae* que mide entre 150 y 300 nm, con simetría helicoidal, posee manto y su genoma es un RNA de polaridad negativa de aproximadamente 14 kb. Posee 10 genes que codifican 11 proteínas: 2 no estructurales, incluyendo RNA polimerasa RNA dependiente y 9 estructurales entre las cuales se encuentran glicoproteínas de superficie de tipo variables (G) y conservadas (F), importantes en la diversidad antigénica y en estrategias de inmunización, respectivamente (7, 8).

**3.- *Virus parainfluenza*:** Estos virus fueron descubiertos a mediados de los 50's siendo recuperados de muestras provenientes de niños con infecciones respiratorias bajas. Pertenecen a la familia *Paramyxoviridae*, al género *Paramyxovirus*, además poseen 2 subgéneros denominados *Respirovirus* (PiV-1 y PiV-3) y *Rubulavirus* (PiV-2 y PiV-4). Miden entre 150 y 250 nm, aunque se han observado agregados de mayor tamaño; su genoma es RNA de polaridad negativa que contiene aproximadamente 15 kb y codifica entre 6 y 10 proteínas, con una nucleocapside gruesa envuelta por un manto de grosor variable, el cual exhibe glicoproteínas como proteínas de fusión (F) y hemaglutinina-neuraminidasa (9, 10). Respecto a las NAC, PiV-1 y PiV-3 se detectan en el 10% de pacientes con neumonías no hospitalizadas, PiV-3 es detectado en mayor porcentaje en pacientes hospitalizados y PiV-1 en neumonías bacterianas en adultos mayores. La NAC también puede ser causada por PiV-2 y PiV-4, pero la incidencia de ambos en la enfermedad no está bien descrita (9).

**4.- *Adenovirus*:** Este virus no sólo provoca enfermedades de tipo respiratorio, sino que también produce conjuntivitis, gastroenteritis y cistitis hemorrágica aguda. Además, gracias a su estructura y forma de replicación, se utiliza como herramienta de terapia génica y vacunas génicas. Este virus pertenece a la familia *Adenoviridae*, la cual se compone de 5

géneros, que pueden afectar a reptiles, aves y mamíferos, y 55 serotipos que pueden afectar a humanos. Son virus icosaédricos de 70 a 100 nm, sin manto y con genoma de ácido desoxirribonucleico (en inglés *deoxyribonucleic acid*, DNA) lineal y doble hebra de aproximadamente 36 a 38 kb. Esta infección se presenta de forma endémica con brotes epidémicos, de los cuales los serotipos más prevalentes son del 1 al 7. Los serotipos 3, 4 y 7 son los más frecuentes en adultos, especialmente en recintos militares, donde pueden afectar hasta el 80% de la población, con una tasa de hospitalización de un 20 a 40% (7).

**5.- Rinovirus (RVh):** Es el principal agente del resfrío común, de las reactivaciones de crisis en individuos asmáticos o con bronquitis obstructiva crónica (7). Su nombre deriva del compromiso nasal que ocasiona. Pertenece a la familia *Picornaviridae*, del género *Rhinovirus*. Son virus pequeños, icosaédricos, sin manto, con un tamaño de 18 a 30 nm y con un genoma compuesto de una hebra de RNA de 7 a 8 kb de polaridad positiva unida a una proteína de forma covalente al extremo 5' y una cola poli A en el extremo 3'. Es lábil en pH ácido (de 3 a 5) y su temperatura óptima de multiplicación es de 33 a 35 °C, semejante a la temperatura nasal, la cual es menor con respecto a la temperatura corporal humana. La infección por rinovirus está presente durante todo el año y es más común al inicio del otoño y primavera en climas templados. Un adulto puede experimentar 2 a 4 episodios de resfríos por año y un niño, 6 a 8 episodios anuales. (7, 10)

**6.- Metapneumovirus humano (MPVh):** Fue identificado por primera vez en 2001 en muestras de niños con enfermedades del tracto respiratorio y se discute su participación en la mayor gravedad en niños con bronquiolitis coinfectados con VRS (11). Pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumoviridae*, género *Metapneumovirus*, encontrándose 2 grupos genéticos denominados A y B y, a su vez, subdivididos en los grupos 1 y 2. Mide 200 nm de diámetro, posee manto y es muy similar a VRS tanto en estructura como patogenicidad. Su genoma está compuesto de una sola hebra de RNA de polaridad negativa que contiene 8 genes que codifican al menos 9 proteínas, de las cuales la proteína F es la que determina el grupo viral (7). Según Van Den Hoogen *et al.*, la estacionalidad de este virus varía dependiendo del país en estudio, circulando principalmente en la temporada de invierno, con un máximo entre Diciembre y Febrero en países templados y siendo más frecuente en primavera y verano en otros países, como

China, afectando a un 3% de la población general (12). En Chile, Luchsinger *et al.*, detectó MPVh entre Septiembre y Diciembre en el 5,4% de menores de 2 años hospitalizados por enfermedad respiratoria y sin detección de otros virus respiratorios entre (13).

**7.- *Coronavirus*:** Es la segunda causa de resfrío común, y aunque son difíciles de diagnosticar y generalmente son de carácter benigno, una nueva variante determinó una pandemia de neumonía en el 2002 (7). Pertenecen a la familia *Coronaviridae*, la cual comprende 11 virus que afectan a aves, algunos mamíferos y al humano. A su vez, esta familia se divide en 2 géneros, *Coronavirus* y *Torovirus*, y en 4 subgrupos, describiendo 5 cepas importantes que afectan a los humanos: CoVh-229E y CoVh-NL63 (subgrupo 1); CoVh-OC43 y CoVh-HKU1 (subgrupo 2); SARS-CoVh (subgrupo 4), responsable de la pandemia de 2002 (7, 14). Estos virus son pleiomórficos, generalmente esféricos, su tamaño varía entre 60 y 220 nm de diámetro, poseen manto con proyecciones llamadas espículas de 20 nm de extensión. Su genoma es una hebra de RNA de polaridad positiva, de 30 kb y que codifica para 2 proteínas grandes, las cuales son procesadas y conforman las proteínas de superficie (S), de membrana (M) y la nucleoproteína (N), además de 2 RNA polimerasas (replicasas 1 y 2) (7, 15). Estos virus se encuentran en todo el mundo, con diferentes frecuencias de detección según la estacionalidad. Gaunt *et al.*, detectó durante 3 años las 4 cepas más comunes de coronavirus mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (TR-RCP) con frecuencia de 0,3 – 0,85% en todos los grupos etarios analizados, distribuidos mayormente en la temporada invernal, excepto CoVh-229E, el cual se detectó esporádicamente durante todo el año (16).

**8.- *Bocavirus humano*:** Fue descrito en 2005 por Allander *et al.*, siendo detectado en aspirados nasofaríngeos de pacientes con infecciones del tracto respiratorio mediante RCP. Este virus pertenece a la familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae*, género *Bocavirus* y posee cápside icosaédrica y genoma DNA de simple hebra de 4 a 6 kb. Se ha podido detectar en muestras congeladas a -80°C en una frecuencia de 3 a 6%. Este agente se ha encontrado en todo el mundo, en pacientes que poseen enfermedades respiratorias agudas con una frecuencia del 1,5 al 1,9%, sobre todo en menores de 2 años de edad. No se ha podido establecer estacionalidad de esta infección, entre otras razones, debido a la presencia del virus en individuos asintomáticos (7, 17).

### ***III.- Métodos de detección y diagnóstico***

La detección de virus en NAC era infrecuente, debido a la baja sensibilidad de las técnicas aplicadas (18), lo que ha ido mejorando con las nuevas metodologías. En un comienzo, los cultivos celulares surgieron como método de diagnóstico viral y, por mucho tiempo, fueron la técnica más importante y más utilizada en la práctica clínica, complementada desde 1980 con la detección de antígenos por inmunofluorescencia (IF) utilizando anticuerpos monoclonales. En 1985, con el desarrollo de la biología molecular, aparecieron técnicas más sensibles y específicas, como la amplificación de ácidos nucleicos mediante TR-RCP, lo que generó una evolución en el diagnóstico, masificándose al hacer más asequible la implementación y el costo en laboratorio (19-22). Nuevas metodologías como Luminex<sup>®</sup> se han incorporado a este quehacer, las que prometen ser revolucionarias en el ámbito diagnóstico por su rapidez, manejo, versatilidad y la gran sensibilidad que presenta. Las técnicas más importantes del diagnóstico en virología son:

***I.- Aislamiento viral (AV):*** En ella se inocula una muestra biológica en cultivos celulares susceptibles, en el que se replican los virus infectivos presentes y posteriormente se confirma su presencia mediante detección específica por inmunodiagnóstico. Este método ha estado presente en gran parte de la historia de la virología, tanto en diagnóstico, investigación y preparación de vacunas, y, a pesar de la aparición de nuevos procedimientos con mayor sensibilidad y especificidad, se le considera aún la técnica de referencia para detección y estudio de muchos virus (19). Sin embargo, incluso en condiciones óptimas, como la obtención de una muestra en un cuadro agudo de corta evolución y con alta excreción viral, la sensibilidad del cultivo es bastante menor en comparación a la TR-RCP y a la serología. La sensibilidad del cultivo, especialmente en adultos mayores, es de 21%- 50% con respecto a la detección mediante TR-RCP y de un 51,2% a la serología (23).

La ventaja del AV es la posibilidad de identificar nuevos virus y de estudiar su morfología, ciclo de replicación, citopatología, etc. Las grandes desventajas de este método que dificultan su aplicación en el diagnóstico viral son: primero, las dificultades del traslado de las muestras, en especial en los virus con manto que por su labilidad a las condiciones

ambientales requieren cercanía del centro de obtención de la muestra con el laboratorio de diagnóstico y mantención de la cadena de frío; segundo, para obtener una muestra óptima, con una alta carga viral y con virus infectivo, se requiere una corta evolución de la infección; tercero, la incapacidad de replicación en células *in vitro* de algunos virus y la inexistencia de cultivos permisivos para todos los agentes virales; cuarto, la demora en el resultado puede ser de días hasta semanas, variando entre los 1 a 42 días; quinto, la menor sensibilidad de la técnica en adultos porque, en general, excretan bajas cargas virales; y por último, el alto costo y la necesidad de personal altamente entrenado que conlleva la obtención y mantención de líneas celulares adecuadas (19, 23).

**2.- Serología:** Mediante distintos métodos, se detectan anticuerpos antivirales específicos en suero como respuesta a una infección; una de las más utilizadas en este campo es el ensayo inmunoenzimático (ELISA), el cual utiliza un soporte al que está unido un antígeno viral y este se incuba con el suero del paciente que puede poseer el anticuerpo que interacciona específicamente con ese antígeno. Después se incuba con un nuevo anticuerpo, que reconoce inmunoglobulinas, y está unido a una enzima que genera una reacción colorimétrica actuando sobre el sustrato correspondiente. Esta metodología puede usarse para detectar 2 tipos de inmunoglobulinas: IgM, presente en fases tempranas de la infección aguda, demoran 4 a 8 semanas en ser detectables en suero y son útiles en la detección de infección por agentes virales que poseen uno o muy pocos serotipos; e IgG, la cual es detectable por largos periodos de tiempo post infección reflejando inmunidad frente a un virus particular, siendo especialmente útiles en la evaluación de la respuesta inmune frente a una vacuna y del estado inmunitario de la población (19).

Aunque la serología es útil, posee restricciones con respecto a su aplicación en el diagnóstico de infecciones respiratorias en adultos, puesto que generalmente son reinfecciones, por lo que prácticamente en todos se detectarán inmunoglobulinas lo que no permitirá establecer una infección actual, excepto si se demuestra seroconversión. Para esto se necesitan 2 muestras como mínimo, una inicial y otra posterior al menos 20 días después. Además, la producción de IgM puede tardar de 4 a 8 semanas en cuadruplicar los títulos de anticuerpos que se requieren para confirmar infección, lo que no tiene utilidad en

la práctica clínica ni en estudios como el de esta tesis, que incluye pacientes con un corto período de evolución de la enfermedad (cuadro menor a 7 días).

**3.- *Detección de antígenos por IF:*** Esta técnica es considerada de diagnóstico rápido y consiste básicamente en el reconocimiento de antígenos virales protéicos presentes en la muestra, fijada en un soporte de vidrio, por anticuerpos específicos y que luego podemos observar mediante la acción de fluoróforos acoplados a los anticuerpos. Se puede realizar de 2 maneras: de forma directa, en la que el anticuerpo de reconocimiento está directamente acoplado con el fluoróforo, siendo en general isotiocianato de fluoresceína, y de forma indirecta, en el que un anticuerpo primario específico reconoce al antígeno y luego este es reconocido por un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo.

Este método es habitualmente cualitativo y su sensibilidad depende de la edad del paciente y de factores de la muestra respiratoria como: tipo, el aspirado nasofaríngeo (ANF), el más efectivo pero a la vez más invasivo, o el torulado nasofaríngeo (TNF), uno de los más simples de obtener teniendo el personal entrenado; calidad (medida en integridad y alta celularidad); obtención y transporte. A pesar de todos estos factores, las IF son las más utilizadas por ser ensayos rápidos, que no demoran más de 60 a 120 minutos, proveen resultados válidos y son técnicamente más simples y baratos que los métodos moleculares. La sensibilidad observada de una IF en comparación al cultivo es aproximadamente de un 81%, aunque este varía dependiendo del virus analizado. Para VRS, el virus con mayor sensibilidad de detección por esta técnica, es de 84-99% en comparación al cultivo celular y para AdV de 0-58%, siendo el de menor sensibilidad (24). En niños, la IF alcanza una sensibilidad de 95% en comparación con la TR-RCP para detección de MPVh (25), la que disminuye en adultos mayores a 6-23% en comparación con la serología y la TR-RCP, lo que se explicaría por la menor excreción viral en estas personas y, por lo tanto, una menor capacidad de detección de la técnica (26). Aún con esta complicación, utilizaremos esta técnica en la tesis porque es la más extendida en uso en los hospitales de nuestro país y está disponible en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico.

**4.- *Reacción en cadena de la polimerasa:*** Es la técnica de biología molecular de amplificación más usada en los laboratorios de investigación y en el diagnóstico virológico.

Requiere la extracción y purificación del ácido nucleico de la muestra, y en caso de los virus con RNA como genoma, primero debe realizarse una transcripción reversa (TR) a un DNA complementario. Además se necesitan partidores o secuenciadores diseñados para que reconozcan por complementariedad los extremos del fragmento de DNA a identificar; la mezcla de RCP, que contiene nucleótidos, sales y una enzima que polimerice DNA como lo son las polimerasas Taq de la bacteria *Thermophilus aquaticus*, capaces de soportar altas temperaturas y de elongar y amplificar el DNA blanco. Este proceso se realiza en varias fases, incluyendo: denaturación del DNA, en la cual las hebras se separan; hibridación, en la cual los partidores reconocen la secuencia blanco y se complementan, y la síntesis de DNA por acción de la polimerasa Taq. La aplicación de este método puede verse dificultada por su alto costo debido al elevado precio del equipo y por los reactivos específicos necesarios, por requerir personal entrenado para llevar a cabo el proceso y porque se necesita una infraestructura adecuada que incluya zonas especializadas para cada proceso incluyendo un sector limpio para preparación de reactivos, un área para cargar las muestras, un lugar para amplificación en la cual estarán los termocicladores y una zona “sucia” en la cual se detectarán los amplificados obtenidos.

Se ha desarrollado la TR-RCP en “tiempo real”, que permite detectar los amplicones mientras van sintetizándose gracias a sondas fluorescentes, acortando el tiempo de diagnóstico y acoplado el análisis a un programa computacional, con lo que se disminuye la posibilidad de contaminación (19). Diversos estudios han demostrado la mayor sensibilidad de esta técnica en distintas poblaciones. En la detección de AdV, FLU A, PiV 1-3, VRS y MPVh en niños, la RT-RCP obtuvo un 53,4% de detecciones en comparación al 38,3% de la IF, la que es la técnica de preferencia en este grupo etáreo (27). En 60 adultos mayores de 49 años, se observó que en la TR-RCP en 16 casos, con una sensibilidad superior al aislamiento que sólo detectó 2 de los 12 casos más probables (17%) (excluidos los casos con resultado negativos en todas las técnicas aplicadas tras el cultivo de la muestra por 24 horas) a la IF, que detectó 4 de los 12 casos (33%) (26).

El desarrollo de la TR-RCP de tipo “Multiplex” mezcla partidores que permite que se detecten varios blancos virales en forma simultánea y en menor tiempo, manteniendo la mayor sensibilidad en comparación con técnicas más clásicas. Junto a las nuevas

aplicaciones de la RCP, su costo ha ido disminuyendo, aumentando significativamente el número de laboratorios que poseen los equipos necesarios para realizar esta técnica, masificando su utilización. Todas estas ventajas han puesto a la TR-RCP en una posición de preferencia en el diagnóstico clínico por lo que se utilizará como técnica de referencia en esta tesis.

**5.- Luminex®:** esta nueva tecnología detecta múltiples ácidos nucleicos utilizando sondas específicas unidas a microesferas con equipos Luminex® xMAP®. Su aplicación en la clínica ha ido evolucionando con el tiempo desde la genotipificación descrita, por Bortolin en 2004, hasta su uso en kit diagnósticos como el de virus respiratorios denominado xTAG® RVP, descrito por Mahony en 2007. Esta técnica consiste en 2 procesos: el primero es una TR-RCP multiplex, para 16 blancos virales; y el segundo, una extensión de partidores blanco-específica (TSPE), en la cual una DNA polimerasa sintetizará determinadas secuencias definidas por partidores específicos para cada blanco viral y que además, contendrán biotina-dCTP y una secuencia de oligonucleótidos llamada Tag. Mediante esta Tag, el amplicón generado hibridará por complementariedad de bases con el anti-Tag presente en una población de microesferas, coloreadas espectrofotométricamente de forma diferente, para cada uno de los blancos virales. Por otro lado, los dCTP-biotina incorporados reaccionarán con una molécula reportera de Estreptavidina-R-Ficoeritrina (en inglés *Streptavidin-R-Phicoerythrin*, SAPE), la cual es fluorescente. El equipo establece una intensidad de fluorescencia media (en inglés *Median Fluorescence Intensity*, MFI) entre la interacción del reportero de ficoeritrina-estreptavidina y la población de microesferas, cuantificado por 2 láseres individuales, estableciendo una señal única dentro de esta población, la que es analizada bajo parámetros preestablecidos en el programa entregado por la compañía (28, **Figura 1**).



**Figura 1.-** Esquema del procedimiento de la técnica Luminex® (Modificado de la fuente: <http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xTAGTechnology/>).

### Ejemplo de la Química usada en la tecnología xTAG



#### I. RT-RCP Multiplex

Se realiza una reacción RT-RCP Multiplex para amplificar las regiones de interés en genes blanco humanos o de agentes infecciosos.

#### II. Tratamiento Exo/SAP del producto de RT-RCP

La reacción de RCP es tratada para remover el exceso de nucleótidos y partidores.



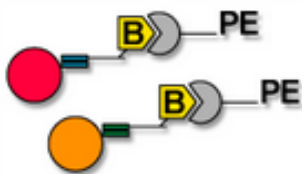
#### III. Multiplex ASPE/TSPE

La reacción de RCP es expuesta a un paso de extensión que es específico para un alelo o un agente infeccioso en análisis: Extensión partidior-específica de alelos (ASPE) o Extensión partidior-específica de blanco (TSPE). El extremo 5' de los partidores ASPE o TSPE es unido a una secuencia universal tag de xTAG.



#### IV. Universal Array Sorting

La secuencia tag universal en 5' se hibrida con una secuencia anti-tag complementaria unida a un set particular de microesferas xMAP.



#### Lavado

#### V. Detección

Las microesferas hibridadas son leídas por el sistema Luminex xMAP y los resultados son analizados por el programa de análisis de datos.

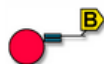
#### Sistema de Detección Luminex



#### \*Simbología:



\*amplicón extendido + dCTP-Biotina (B)



\*Amplicón extendido + dCTP-Biotina unido a microesfera específica.



\*molécula de streptavidina (gris)-ficoeritrina (PE)

Los estudios internacionales que han comparado el rendimiento de esta técnica con respecto a las clásicas, detectaron un rendimiento de un 98,5% con respecto al 68,8% obtenido por la IF/aislamiento viral (29). En otro estudio, se comparó el sistema diagnóstico xTAG<sup>®</sup> con respecto a la TR-RCP en tiempo real, resultando con una especificidad del 99,6% y una sensibilidad del 78,8% debido a que xTAG<sup>®</sup> no detectó virus en muestras positivas por RCP en tiempo real con un alto ciclo umbral (en inglés *cycle threshold*,  $C_t$ , que corresponde al número de ciclo en el cual la fluorescencia generada en la reacción es significativamente más alta que la fluorescencia basal, cruzando el umbral de fluorescencia, y es inversamente proporcional a la cantidad de copias del gen a amplificar en el extracto), lo que indica una baja concentración de material genético en la muestra. Por otro lado, xTAG<sup>®</sup> amplificó virus, especialmente picornavirus, en muestras negativas por RCP en tiempo real, por lo que no fue significativa la diferencia en la capacidad de detección general de ambas técnicas (30).

Luminex<sup>®</sup> ha demostrado ser una metodología versátil en usos, tanto en investigación como en diagnóstico, con una gran sensibilidad y especificidad respecto a las técnicas clásicas y con capacidad de pesquisar virus que habitualmente no se detectan como los CoVh, PiV 4, RVh/enterovirus y subtipos H1y H3 de FLU. La dificultad en su uso masivo estaría dada por el alto costo de los insumos y del equipo, lo cual eleva el valor de los exámenes y por la complejidad de ejecución en el laboratorio.

En la decisión de implementar y aplicar una técnica en un laboratorio de diagnóstico, no solo se debe considerar los aspectos propios de la técnica, como el rendimiento en base a la sensibilidad y especificidad presentada, sino también la rapidez en la obtención y las dificultades en la interpretación del resultado, las posibilidades de implementación, su accesibilidad y la factibilidad económica, todo lo cual está incluido en el concepto de efectividad de la técnica, entendiendo el término como el impacto general alcanzado por la técnica implementada en condiciones habituales de uso. Respecto a la efectividad de la nueva metodología de Luminex<sup>®</sup> existen escasas publicaciones internacionales y no se dispone de información nacional, ni de su rendimiento en población chilena. Considerando que los virus son agentes importantes en NAC de adultos, en quienes se necesita aplicar métodos de mayor sensibilidad por su menor excreción viral y que se requiere de técnicas

más efectivas, es necesario determinar este parámetro en Luminex® frente a la RT-RCP en tiempo real y a la inmunofluorescencia, con el fin de aportar con información relevante a su posible incorporación en los servicios de diagnóstico nacionales.

## **HIPÓTESIS**

“La efectividad de la tecnología xTAG<sup>®</sup> de Luminex<sup>®</sup> en la detección de virus respiratorios en adultos con NAC es mayor a la de la TR-RCP y estas dos, a su vez, son más efectivas que la detección de antígenos virales por IF”.

## **OBJETIVOS**

I.- General: Comparar la efectividad de las técnicas de IF, TR-RCP en tiempo real y Luminex<sup>®</sup> en la detección de virus respiratorios en muestras de adultos con NAC.

II.- Específicos:

1.- Detectar virus respiratorios mediante IF, TR-RCP en tiempo real y la tecnología xTAG<sup>®</sup> Luminex<sup>®</sup> en muestras de adultos con NAC.

2.- Determinar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos de la tecnología xTAG<sup>®</sup> Luminex<sup>®</sup> respecto a la TR-RCP en tiempo real en la detección de virus respiratorios en adultos con NAC.

3.- Relacionar la efectividad en la detección de virus respiratorios del panel xTAG<sup>®</sup> Luminex<sup>®</sup>, de la TR-RCP en tiempo real y de la IF, con características demográficas (edad, género), clínicas (gravedad de la enfermedad) y de la infección (tiempo de evolución) de adultos con NAC.

4.-Analizar las ventajas y desventajas de las 3 metodologías en relación a su implementación, manejo, costo y rapidez en un laboratorio de diagnóstico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Contexto de la tesis:** Esta tesis está financiada por el proyecto FONDECYT N° 1121025, dirigido por la Dra. Vivian Luchsinger. El proyecto está aprobado por el Comité de bioseguridad de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, y por los Comités de Bioética de esta misma facultad, del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y del Servicio de Salud Metropolitano Sur y Oriente. Se adjuntan los certificados de aprobación y consentimientos informados correspondientes (**Anexo 1**).

**Pacientes:** Se incluyeron pacientes mayores de 18 años hospitalizados por NAC con síntomas por < 7 días y con imágenes compatibles en la radiografía de tórax. Se excluyeron pacientes hospitalizados durante los 30 días previos e inmunosuprimidos por medicamentos o por estar infectados con el virus de inmunodeficiencia humana. Se enrolaron 113 pacientes, provenientes del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH), Hospital Lucio Córdova (HLC) y la Clínica Santa María (CSM) entre Julio/2012 y Enero/2014. Para cada paciente se completó una ficha clínica con datos demográficos (edad, género); antecedentes (tabaquismo, alcoholismo, diabetes, insuficiencia renal o cardíaca); condición de ingreso (síntomas, días de evolución); parámetros de laboratorio (frecuencia respiratoria, pulso, evaluación radiológica); tratamiento y evolución. Se estratificó la enfermedad de cada caso según gravedad mediante el índice el PSI de Fine en base al puntaje obtenido aplicando el criterio de PORT de estratificación, modelo que analiza los factores independientemente relacionados a la mortalidad del paciente en una forma aditiva (31, **Anexo 2**).

**3.- Muestras:** De cada paciente se obtuvo un TNF y/o un ANF, con una tórula flexible (Copan<sup>®</sup>) o una jeringa con Medio de transporte universal (en inglés *Universal Transport Media*, UTM<sup>®</sup>), en forma estéril por personal de enfermería entrenado en los procedimientos; se depositaron en tubos con medio de transporte y se enviaron al laboratorio de Virología de inmediato en frío. Las muestras se trabajaron en cámara de bioseguridad con materiales desechables y una alícuota se congeló a -80°C hasta su análisis.

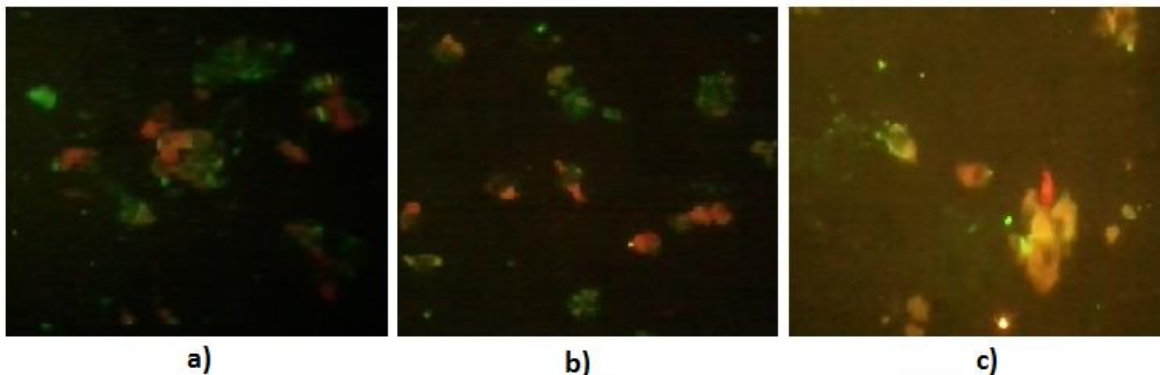
#### 4.- Pruebas diagnósticas:

*IF clásica:* Para la detección de antígenos de AdV, VRS, PiV 1-3 y FLU A/B se establecieron las concentraciones óptimas de los anticuerpos monoclonales (Sigma®), producidos en ratón, utilizando muestras del proyecto que previamente fueron positivas por RT-RCP (con bajo Ct) y por Luminex® (alto MFI). Se realizaron diluciones seriadas desde el stock de 1:100, 1:200, 1:300 y 1:400 para VRS, 1:200, 1:300 y 1:400 para FLU A/B y 1:100, 1:200 y 1:300 para AdV y PiV 1-3 y se determinó que las concentraciones adecuadas eran 1:200 para VRS; 1:300 para FLU A/B; 1:200 para AdV; y 1:200 para PiV 1-3 (Tabla 1, Figura 2).

**Tabla 1:** Detección de antígenos de VRS, FLU A/B, AdV y PiV 1-3 mediante IF clásica utilizando diferentes diluciones de anticuerpos monoclonales en adultos con NAC.

Virus	Dilución de anticuerpos	Cant. de células		Intensidad		Observaciones	Resultado
		1-2: baja	1-2: baja	1-2: baja	1-2: baja		
		3-4: alta	3-4: alta	3-4: alta	3-4: alta		
<b>VRS</b>	1:100	4	4	4	4	-	<b>Positivo</b>
	1:200	4	4	4	4	-	<b>Positivo</b>
	1:300	3	3	3	3	-	<b>Positivo</b>
	1:400	3	2	3	2	-	<b>Positivo</b>
<b>FLU A/B</b>	1:200	3	2	3	2	Inespecificidad alrededor de las células	<b>Positivo</b>
	1:300	3	2	3	2	Inespecificidad alrededor de las células	<b>Positivo</b>
	1:400	3	1	3	1	Inespecificidad alrededor de las células	Negativo
<b>AdV</b>	1:100	2	1	2	1	Saturación basal muy alta	Negativo
	1:200	4	2	4	2	Punteado poco claro	<b>Positivo</b>
	1:300	4	1	4	1	Núcleos poco definidos	Negativo
<b>PiV 1-3</b>	1:100	3	4	3	4	Saturación basal muy alta	<b>Positivo</b>
	1:200	3	3	3	3	Saturación basal muy alta	<b>Positivo</b>
	1:300	3	2	3	2	Saturación basal muy alta, fluorescencia difusa	<b>Positivo</b>

**Figura 2:** Detección de FLU A/B por IF clásica con distintas diluciones de anticuerpos monoclonales: a) dilución 1:200; b) dilución 1:300; c) dilución 1:400.



Cada muestra respiratoria se lavó con 3-5 ml de PBS, se homogeneizó, se extrajeron las mucosidades no disueltas y se centrifugó a 327 g por 10 minutos en centrifuga Hanshin<sup>®</sup>. Se resuspendió el sedimento en 100 µl de PBS, depositando 10 µl en un portaobjetos identificado con los datos de la muestra (N° y código, tipo de muestra, virus a detectar y fecha). Las muestras se secaron a temperatura ambiente o en calefactor, se fijaron durante 10 minutos con acetona y se volvieron a secar en calefactor. Cada muestra fijada se incubó con 8-10 µl de anticuerpo monoclonal preparado previamente durante 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Luego se lavó con PBS durante 5 minutos en agitación y se agregó el anticuerpo IgG de cabra anti-ratón conjugado con fluoresceína (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) que además contiene azul de Evans (contraste rojo). Se repitió la incubación y el lavado y, una vez secos, se colocó el cubreobjetos. En el caso de MPVh se realizó una IF directa, utilizando un anticuerpo monoclonal conjugado con fluoresceína y preparado con Azul de Evans por el proveedor (DiagnosticsHybrids<sup>®</sup>). Los portaobjetos se guardaron a 4°C hasta su revisión en microscopio de fluorescencia (**Anexo 3, Punto 1**).

2. *IF directa rápida:* Según las instrucciones del proveedor del sistema comercial D<sup>3</sup><sup>®</sup>-FastPoint<sup>®</sup> L-DFA Respiratory Virus Identification kit (Hybrid Diagnostics<sup>®</sup>) la muestra de ANF se resuspendió en 3-5 ml de PBS (preparado a partir del PBS 40x del kit), por agitación, se retiraron las mucosidades no disueltas y se centrifugó a 327 g durante 10 minutos en centrifuga Hanshin<sup>®</sup>. El sedimento se resuspendió en 200 µl de PBS y 70 µl de la suspensión se colocó en cada uno de los 3 tubos Eppendorf<sup>®</sup> marcados con las siglas: A/B (FLU A y B), R/M (VRS y MPVh) y P/A (PiV y AdV). Se agregaron 2 gotas de

reactivo D FastPoint<sup>®</sup> a cada tubo correspondiente, se mezclaron por vortex y se incubaron a 37 °C durante 5 minutos en termoblock. Después se agregó 1.5 ml de PBS 1x a cada tubo, se centrifugó por 2 minutos a 214 g en centrifuga Heraeus<sup>®</sup>, se eliminó el PBS mediante una inversión suave del tubo y se secaron en papel absorbente. Se agregaron 20 µl de solución de resuspensión a cada tubo, para romper el sedimento celular. En los canales de cada portaobjeto del sistema comercial debidamente identificado (N° y tipo de muestra, fecha) se depositaron 20 µl del respectivo tubo y se observaron en el microscopio de fluorescencia con un aumento de 20x (**Anexo 3, Punto 2**).

3. *TR-RCP multiplex*: Se realizó extracción de DNA/RNA y TR-RCP en tiempo real mediante el sistema comercial multiplex de Virus Respiratorios, ARVI Screen Real-TM<sup>®</sup>, (Sacace Biotechnologies<sup>®</sup>) que permite detectar AdV, BoVh, VRS, MPVh, PiV 1-4, RVh y CoVh tipos NL63, 229E, HKU-1 y OC-43. Además se detectó virus FLU A y B con el kit influenza A, B Real-TM<sup>®</sup> (Sacace Biotechnologies<sup>®</sup>).

3.1 **Protocolo de extracción:** Las muestras guardadas a -80°C se descongelaron rápidamente. Aquellas con exceso de mucus, previamente se trataron con DTT 0,3% p/v, agregando un volumen proporcional a la cantidad de muestra a tratar, incubando por 1 hora a 37 °C en calefactor y extrayendo una alícuota de 1,8 ml. Para la extracción, en cada tubo se incubaron 450 µl de solución de lisis y 10 µl de control interno (IC) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl de muestra y de Control Negativo al tubo respectivo, se mezclaron en vortex y se centrifugaron durante 1 minuto a 13.684 g en centrifuga Heraeus<sup>®</sup>. Se transfirió el sobrenadante, se agregó 25 µl de Sorbent<sup>®</sup>, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, mezclando cada 2 minutos, y se centrifugó 1 minuto a 13.684 g en centrifuga Heraeus<sup>®</sup>. Luego se eliminó el sobrenadante y se agregó 400 µl de solución de lavado, se mezcló en vortex y se centrifugó 1 minuto a 13.684 g. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 500 µl de etanol al 70%, se mezcló en vortex y se centrifugó 1 minuto a 13.684 g. Se repitió el lavado con etanol y se agregó 400 µl de acetona, mezclando por agitación y se centrifugó 1 minuto a 13.684 g. Se eliminó el sobrenadante y se incubaron los tubos con tapa abierta 10 minutos a 60 °C. Se resuspendió el sedimento con 50 µl de eluyente de RNA e incubaron los tubos 10 minutos a 60 °C,



agitando cada 2 minutos en el vortex. Se centrifugaron por 2 minutos a 16.060 g y se extrajo el sobrenadante sin remover el sedimento.

**3.2 TR-RCP Panel Viral e influenza A y B:** Se preparó un tubo RT mix<sup>®</sup>, común para el sistema comercial de Panel Viral y de FLU, agregando 5 µl de RT-G-mix1<sup>®</sup> y 6 µl de MMLV<sup>®</sup> a la mezcla. Se incubó 30 minutos a 37°C con 20 µl de muestra previamente centrifugada 2 minutos a 13.684g. Posteriormente, y modificando la proporción de volúmenes muestra: solución TE<sup>®</sup> de 1:2 propuesta en el sistema, se preparó una muestra sin solución y otra con una proporción 1:1, para comprobar si existen cambios en la detección viral en las muestras que tuvieron resultados discordantes con Luminex<sup>®</sup>, para finalmente almacenar estos DNAC a -80 °C. De las 26 muestras analizadas, en 7 se confirmó la detección de RVh, en 2 Flu B, en 1 PiV 1 en 1 AdV, aumentando de 45 casos iniciales (39,8%) a 56 (49,6%) (**Tabla 2**).

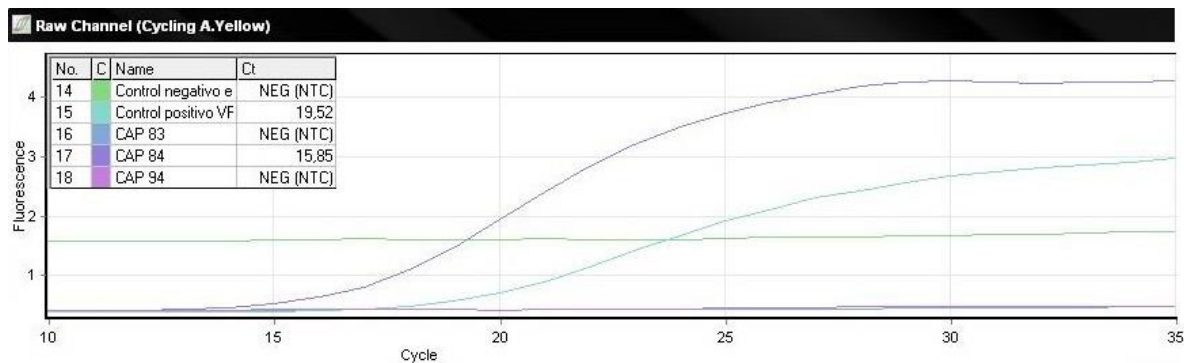
**Tabla 2:** Detección de virus respiratorios por TR-RCP en casos con detección discordante por Luminex® (26 casos), utilizando distintas proporciones de volumen de solución TE, en adultos con NAC.

Paciente	Resultado Luminex	MFI detectado	Resultado 2° TR-RCPtr concentrado	CI tubo concentrado	Resultado 2° TR-RCPtr diluido	CI tubo diluido
CAP-2	FLU A H3	349	Negativo	-	negativo	26,71
CAP-5	PiV 3	202	Negativo	22,89	negativo	25,47
CAP-7	AdV	285,5	Negativo	27,33	negativo	25,53
CAP-10	RVh	434,5	Negativo	-	<b>positivo (30,72)</b>	-
CAP-18	CoVh OC43	3578,5	Negativo	-	negativo	-
CAP-19	RVh	342	Negativo	-	negativo	22,66
CAP-24	FLU B	3646	Negativo	-	<b>positivo (27,56)</b>	-
CAP-25	RVh	676	Negativo	-	<b>positivo (30,07)</b>	-
CAP-27	FLU B/RVh	3545,5/451	negativo/negativo	-	<b>positivo (19,96)/negativo</b>	29,12/-
CAP-28	PiV 1	955	Negativo	21,33	<b>positivo (26,1)</b>	23,11
CAP-33	RVh	457	Negativo	24,15	negativo	28,3
CAP-34	RVh	320,5	Negativo	-	negativo	23,13
CAP-53	RVh	2953	Negativo	-	<b>positivo (28,24)</b>	-
CAP-57	CoVh NL63	207	Negativo	21,29	negativo	22,93
CAP-58	PiV 4	2341	Negativo	24,91	negativo	28,45
CAP-65	FLU A H3	590	Negativo	22,56	negativo	27,07
CAP-73	RVh	2361	n/r	-	<b>positivo (26,7)</b>	-
CAP-74	FLU A H1N1	868	Negativo	-	negativo	26,31
CAP-87	AdV	430	n/r	-	<b>positivo (29,28)</b>	-
CAP-91	RVh	2572	n/r	-	<b>positivo (18,9)</b>	23,1
CAP-97	RVh	336	n/r	-	negativo	24,61
CAP-98	RVh	609	n/r	-	negativo	22,65
CAP-106	RVh	548	n/r	-	negativo	25,94
CAP-108	RVh	307	n/r	-	negativo	26,24
CAP-110	RVh	383,5	n/r	-	<b>positivo (30,43)</b>	-
CAP-111	RVh	547,5	n/r	-	<b>positivo (29,95)</b>	23,23

n/r = no realizado

Para la RCP, se mezclaron 10 µl de PCR-mix-1®, 5µl de PCR-mix-2-FRT® y 0.5 µl de TaqF polimerasa®. Se agregaron 15 µl de esta mezcla y 10 µl de cada muestra a cada tubo. En cada corrida se incluyeron 6 controles positivos por mix-1 del Panel Viral, 2 controles positivos del sistema FLU A/B, uno por cada tipo de FLU, y uno negativo. La RCP se realizó en un termociclador Rotor Gene® con los parámetros señalados en el **Anexo 4 (Figura 3)**.

**Figura 3:** Curva de fluorescencia y  $C_t$  de la RCP en tiempo real de un adulto con NAC positivo para VRS.



4. **Luminex<sup>®</sup>**: Mediante TR-RCP e hibridación de microesferas con el sistema comercial xTAG<sup>®</sup> RVP (Respiratory Viral Panel) FAST v2 y el sistema de detección Luminex<sup>®</sup> xMAP<sup>®</sup> Millipore Analyzer se detectó VRS, MPVh, RVh/enterovirus, PiV 1-4, CoVh tipos NL63, 229E, HKU-1 y OC-43, AdV, BoVh, FLU A tipo H1, H3 y H1N1 cepa 2009 y FLU B.

4.1 **TR-RCP:** Se utilizaron 2 controles, uno de procedimiento (DNA de lambda) y uno negativo. En un tubo se preparó la mezcla maestra agregando los reactivos, según se describe en el **Anexo 5, punto 1**, y se agregó 10 µl de ella a los 10 µl de cada muestra. Se aplicó en un termociclador precalentado (50 °C) el programa de temperatura explicado en el **Anexo 5, punto 2**, y posteriormente se guardaron los tubos a 4°C.

4.2 **Preparación de indicadores e hibridación de esferas:** Para 96 reacciones, 120 µl de la solución xTAG<sup>®</sup> 0.22 SAPE se diluyeron con 8.8 ml del tampón informante xTAG<sup>®</sup> RVP FAST v2, agitando la dilución 10 segundos protegido de la luz. La mezcla de microesferas para xTAG<sup>®</sup> RVP FAST v2 se agitó y se sometió a ultrasonido 10 segundos; a cada pozo se añadieron 20 µl de esta mezcla, 2 µl del producto de la RT-RCP y 75 µl de la solución informante mezclando suavemente. La placa se cubrió con Microseal<sup>®</sup> y se colocó en el termociclador a 45°C 20 minutos. Luego se aplicó el programa, Luminex<sup>®</sup> xPONENT<sup>®</sup> y se analizaron los resultados con el programa TDAS RVP FAST<sup>®</sup> (**Anexo 5**).

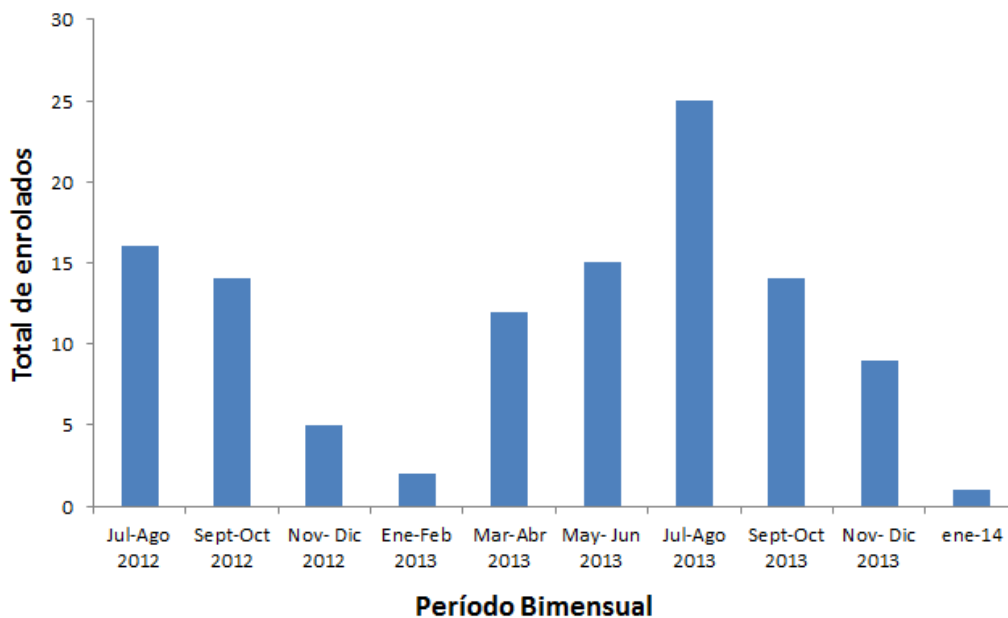
**5.- Análisis estadístico:** Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism<sup>®</sup>, aplicando la prueba Z para el análisis de valores cualitativos (proporciones), la pruebas t

para valores cuantitativos y la prueba de correlación de Pearson para el análisis de MFI v/s Ct, considerando significativas las diferencias con  $p < 0,05$ . Para determinar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y coeficiente Kappa de la IF clásica y Luminex<sup>®</sup> respecto a la TR-RCP se utilizaron tablas de 2x2. Se realizaron curvas ROC (Característica de operación del receptor, en inglés *Receiver Operating Characteristic*) para IF clásica, Luminex<sup>®</sup> y las detecciones por virus asociadas a cada técnica, calculando además el área bajo la curva (AUC, en inglés *area under curve*) de cada una, utilizando también GraphPad Prism<sup>®</sup>.

## RESULTADOS

En esta tesis se enrolaron 113 pacientes entre julio de 2012 y enero de 2014, con edades entre los 20 y 92 años, de los cuales 69 (61,1%) son hombres. La procedencia de los pacientes fue la siguiente: 57 (50,4%) fueron del Hospital Lucio Córdova, 54 (47,8%) del Hospital Clínico de la U. de Chile y 2 (1,8%) de la Clínica Santa María. Los meses de Julio-Agosto de 2013 fueron los de mayor cantidad de pacientes enrolados con 25 casos (22,1%; **Figura 4**). Con respecto a las muestras respiratorias, en 19 (16,8%) pacientes solo se obtuvo ANF, 36 (31,9%) solo TNF y en 58 (51,3%) ambos tipos de muestra.

**Figura 4:** Distribución bimensual del enrolamiento de los adultos con NAC entre Julio de 2012 y Enero de 2014.



### ***1.- Inmunofluorescencia (IF):***

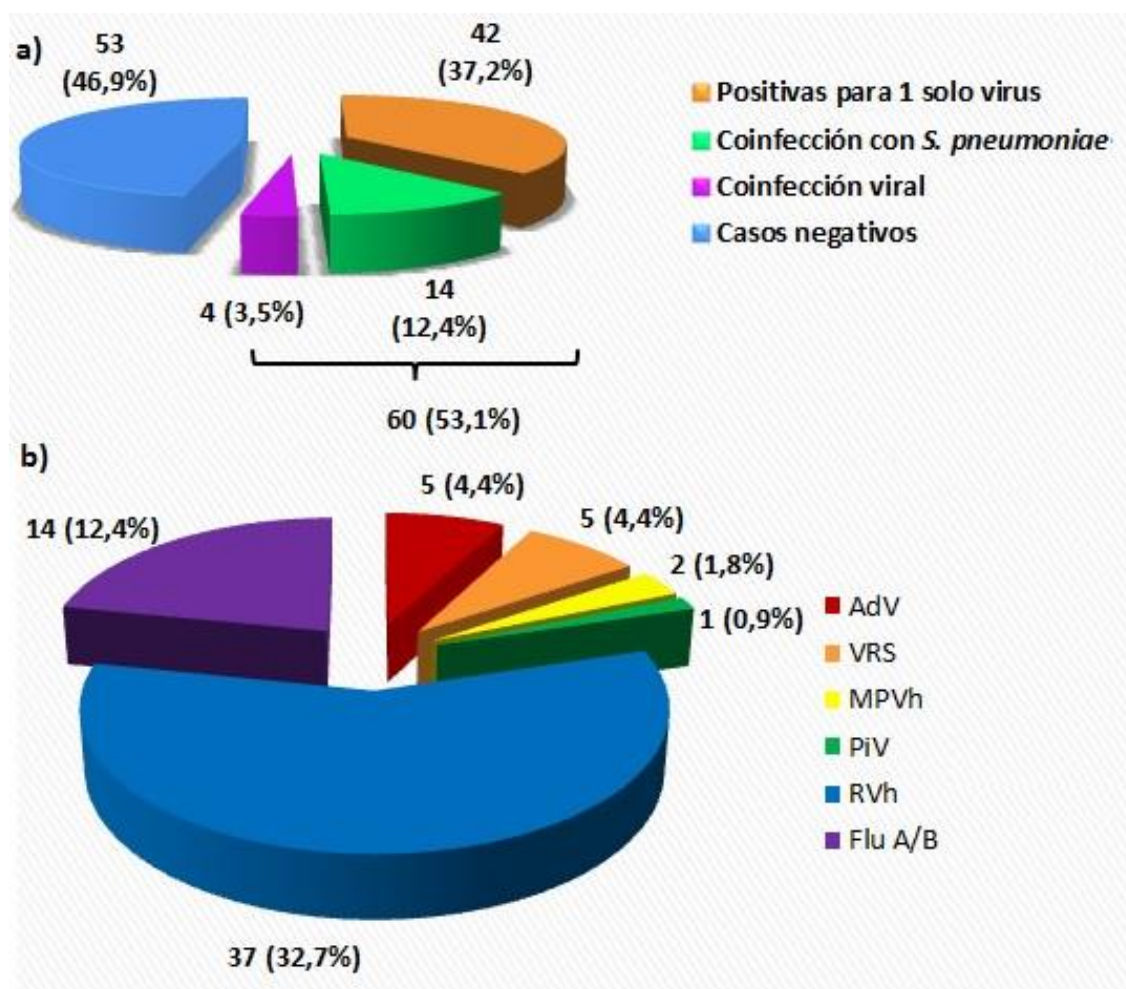
Se realizó IF clásica a 105 muestras (92,9%), disponiéndose sólo de ANF en 43 (41%) pacientes, solo de TNF en 39 (37,1%) y con ambos tipos de muestra en 23 (21,9%) casos. En 3 enfermos se detectaron virus (2,9%,  $p=0,3$ ), correspondiendo a 2 casos de FLU (1,9%) y uno (1%) de VRS. Los 3 casos positivos fueron detectados en ANF y solo 2 en TNF, porque no se dispuso este tipo de muestra en un caso de FLU. Se observó un alto contenido celular en 38 de los 67 ANF (56,7%) y en 22 de los 62 TNF (35,5%) ( $p=0,02$ ), siendo más frecuente encontrar una muestra con una alta celularidad entre los ANF que en los TNF.

La IF rápida se realizó en 33 (29,2%) ANF, todos negativos, por lo que no se continuó con su realización. Hubo un mayor contenido celular en los frotis de estos ANF preparados para la IF clásica que la rápida (19/33, 57,6% versus 2/33, 6,1%, p=0).

## **2.- TR-RCP multiplex:**

Se detectaron 60 casos positivos de los 113 enrolados (53,1%) con 64 (47,4%) detecciones de un total de 135, considerando la IF clásica/rápida, TR-RCP y Luminex® (**Figura 5**).

**Figura 5:** Detecciones virales, realizadas por la TR-RCP multiplex en tiempo real, de los 113 adultos con NAC.



- a) Casos detectados con un solo virus, coinfecciones virales, con *S. pneumoniae* y negativas.  
b) Detecciones por virus.

Se comparó la detección viral entre ANF y TNF en 58 muestras, detectando 34 casos (58,6%) positivos en ANF y 30 (51,7%) en TNF ( $p=0,4$ ). En TNF se encontraron 4 RVh (6,9%) no detectados en ANF. Sin embargo, en TNF no se detectaron: 5 RVh (8,6%), 1 FLU A (1,7%), 1 AdV (1,7%) y 2 coinfecciones (3,4%), un AdV/RVh y un RVh/PiV 1 (**Tabla 3**). Este hallazgo aumentó la cantidad de casos positivos de 56 (49,6%) a 60 (53,1%) y el total de RVh de 33 (29,2%) a 37 (32,7%).

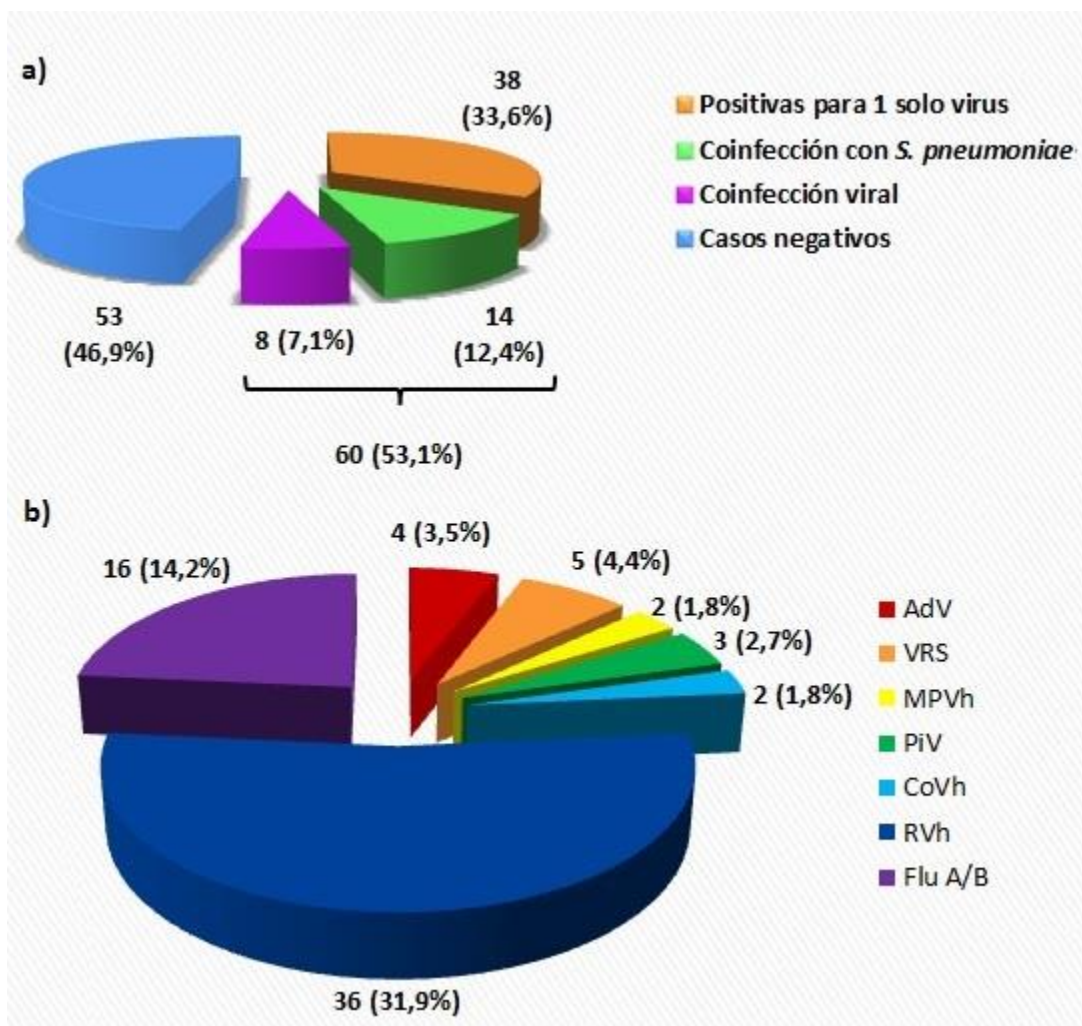
**Tabla 3:** Detecciones de virus respiratorios por la técnica de TR-RCP, ANF y TNF de en 58 adultos con NAC.

Virus detectado	Detección según tipo de muestra			
	ANF+/TNF-	ANF-/TNF+	ANF+/TNF+	Total detecciones
<b>VRS</b>	0	0	2	2
<b>AdV</b>	2	0	1	3
<b>PiV</b>	1	0	0	1
<b>RVh</b>	7	4	15	26
<b>FLU A/B</b>	1	0	8	9

### 3.- Luminex®:

En los 113 pacientes estudiados, se obtuvieron 60 casos positivos (53,1%) con un total de 68 (50,4%) detecciones de 135 (Figura 6).

Figura 6: Detecciones virales, realizadas por Luminex®, de los 113 adultos con NAC.



a) Casos detectados con un solo virus, coinfecciones virales, con *S. pneumoniae* y negativas.

b) Detecciones por virus.

**4.- Rendimiento de la IF clásica/rápida y Luminex®:** Considerando las muestras analizadas tanto por TR-RCP como Luminex® el rendimiento fue similar en ambas técnicas: 56 (49,6%) vs 60 (53,1%) de 113 casos estudiados ( $p=0,6$ ) y significativamente superior al de la IF clásica y rápida: 3/105 (2,9%) y 0/33 ( $p=0$ ). El rendimiento para el total de virus detectados fue similar entre RT-RCP (60/131, 45,8%) y Luminex® (68/131, 51,9%,  $p=0,2$ ) y superior al de la IF clásica (3/131, 2,3%,  $p=0$ ) (Tabla 4).



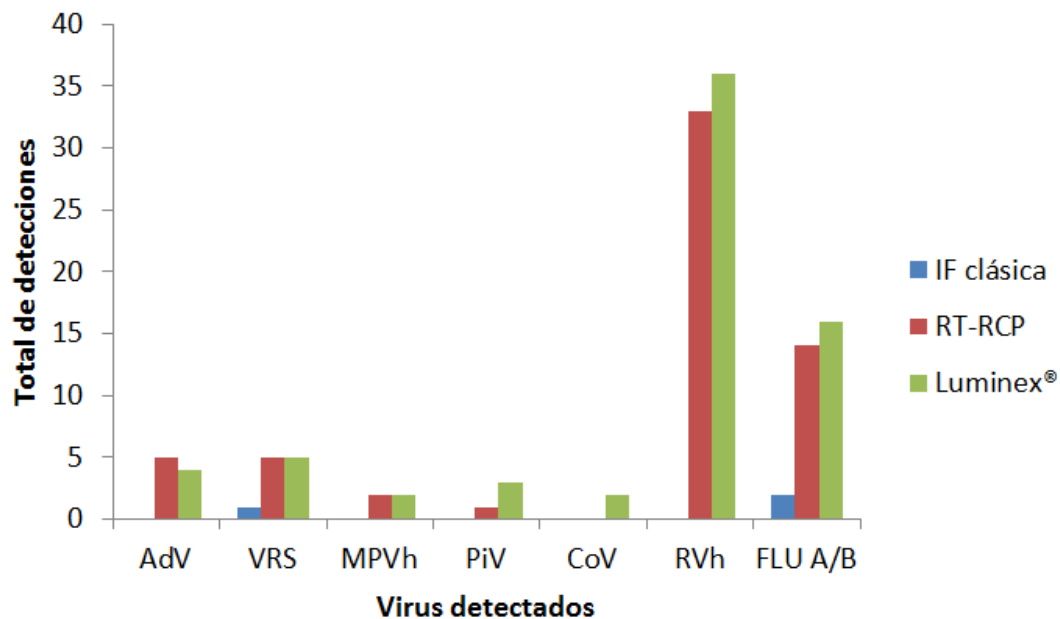
**Tabla 4:** Detecciones virales totales obtenidos por las técnicas de IF rápida, IF clásica, TR-RCP y Luminex® en adultos con NAC.

Técnica	Casos analizados	Casos positivos/Casos analizados (%)	Detecciones virales/ 131 (%)	Valor p*		
				IF rápida	IF clásica	RT-RCP
<b>IF rápida</b>	33	0	0			
<b>IF clásica</b>	105	3 (2,9%)	3 (2,3%)	0,3/0,08		
<b>TR-RCP</b>	113	56 (49,6%)	60 (45,8%)	<b>0/0</b>	<b>0/0</b>	
<b>Luminex®</b>	113	60 (53,1%)	68 (51,9%)	<b>0/0</b>	<b>0/0</b>	0,6/0,2
<b>TOTAL</b>	113	68 (60,2%)	131 (100%)			

\*p calculado con la prueba Z, considerando un  $p < 0.05$  como significativo

La TR-RCP y Luminex® detectaron la misma cantidad de casos de VRS (5) y de MPVh (2). La RT-RCP detectó más casos de AdV que Luminex® (5 vs 4). Sin embargo, Luminex® detectó más pacientes con PiV 1-4 (3 vs 1), FLU A/B (16 vs 14), RVh (36 vs 33) y los únicos casos de CoVh NL63 y OC-43 (2 vs 0). No se pesquisaron BoVh, VRS tipo B, FLU H1, PiV 2 y CoV HKU-1 y 229E mediante estas técnicas (**Figura 5**).

**Figura 7:** Detecciones de virus respiratorios por las técnicas de IF clásica, TR-RCP y Luminex® en 113 adultos con NAC.



Considerando al total de casos estudiados y a la TR-RCP como método de referencia, se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo (VP) positivo y negativo y el coeficiente de concordancia kappa para Luminex<sup>®</sup> y la IF clásica, considerando el total de casos positivos, total de detecciones virales y por virus. Luminex<sup>®</sup> obtuvo una sensibilidad del 89,3%, especificidad de 82,5%, VP positivos de 83,3%, VP negativos de 88,7% y coeficiente  $\kappa$  de 0,7. Estos valores bajan, cuando analizamos el total de detecciones virales (**Tabla 5**). Los análisis por virus mostraron una sensibilidad variable entre 100% y 60%, una especificidad entre 100% y 89%, VP positivos entre 100% y 33%, VP negativos entre 100% y 92% y coeficiente  $\kappa$  entre 1 y 0,5, siendo VRS y MPVh los que presentan los mayores valores de estos parámetros.

**Tabla 5:** Sensibilidad, especificidad, VP y coeficiente kappa, de Luminex<sup>®</sup>, en comparación con la TR-RCP, para el total de casos positivos (n=113), detecciones totales (n=131) y por virus en 113 adultos con NAC.

Luminex\ TR-PCR (referencia)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo positivo (%)	Valor predictivo negativo (%)	Coficiente $\kappa$
<b>Casos positivos</b>	89,3%	82,5%	83,3%	88,7%	<b>0,7</b>
<b>Detección viral total</b>	85%	73,4%	75%	83,9%	<b>0,6</b>
<b>Detección de AdV</b>	60%	99%	75%	98%	<b>0,7</b>
<b>Detección de VRS</b>	100%	100%	100%	100%	<b>1</b>
<b>Detección de MPVh</b>	100%	100%	100%	100%	<b>1</b>
<b>Detección de PiV</b>	100%	98%	33%	100%	<b>0,5</b>
<b>Detección de RVh</b>	82%	89%	75%	92%	<b>0,7</b>
<b>Detección de FLU</b>	93%	97%	81%	99%	<b>0,8</b>

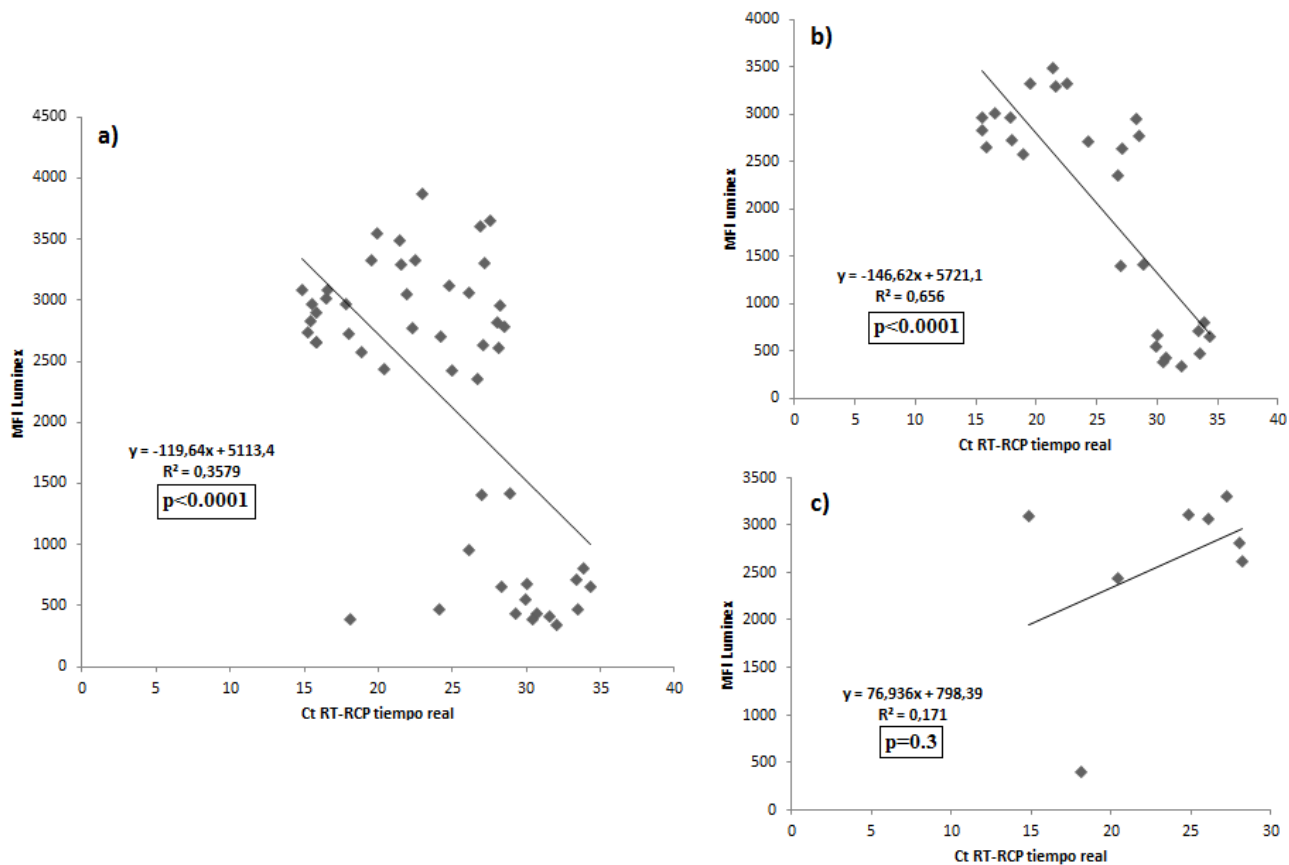
La IF clásica, en comparación con la TR-RCP, presentó una sensibilidad del 11,5%, especificidad y VP positivo del 100%, VP negativo de 77,7% y coeficiente  $\kappa$  de 0,2 para la detección de casos positivos. Si analizamos estos valores para la detección total de virus, todos bajan, excepto la especificidad y VP positivo. Para la detección por virus la sensibilidad varía entre 20% y 12,5%, la especificidad y VP positivos son del 100%, VP negativos entre 96,2% y 86,4% y coeficiente  $\kappa$  entre 0,3 y 0,2 (**Tabla 6**).

**Tabla 6:** Sensibilidad, especificidad, VP y coeficiente kappa, de la IF clásica, en comparación con la TR-RCP, para el total de casos positivos (n=105), detecciones totales (n=131) y por virus en 113 adultos con NAC.

IF clásica\ TR-PCR (referencia)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo positivo (%)	Valor predictivo negativo (%)	Coefficiente $\kappa$
<b>Casos positivos</b>	11,5%	100%	100%	77,7%	<b>0,2</b>
<b>Detección viral total</b>	5,1%	100%	100%	48,6%	<b>0,1</b>
<b>Detección de VRS</b>	20%	100%	100%	96,2%	<b>0,3</b>
<b>Detección de FLU</b>	12,5%	100%	100%	86,4%	<b>0,2</b>

**5. Análisis MFI vs  $C_t$ :** Para el total de casos virales positivos coincidentes de la TR-RCP y Luminex<sup>®</sup>, el ciclo umbral de detección de la TR-RCP ( $C_t$ ) se correlacionó en forma inversa significativamente ( $p < 0,0001$ ) con la intensidad de fluorescencia media (MFI) determinada por Luminex<sup>®</sup>. Este comportamiento fue similar en las detección de RVh, siendo inversamente proporcional ( $p < 0,0001$ ). Sin embargo, la relación no fue significativa para el virus FLU A ( $p = 0,3$ , **Figura 6**). Esta comparación no se realizó con los otros virus por el bajo número de detecciones.

**Figura 8:** Correlación entre la intensidad de fluorescencia media (MFI) de Luminex® y ciclo umbral de detección ( $C_t$ ) de la TR-RCP en detecciones coincidentes para el total de virus, para RVh y FLU A en adultos con NAC.



**a)** Detección positiva coincidente para ambas técnicas, **b)** Detección coincidente para RVh y **c)** Detección coincidente para FLU A.

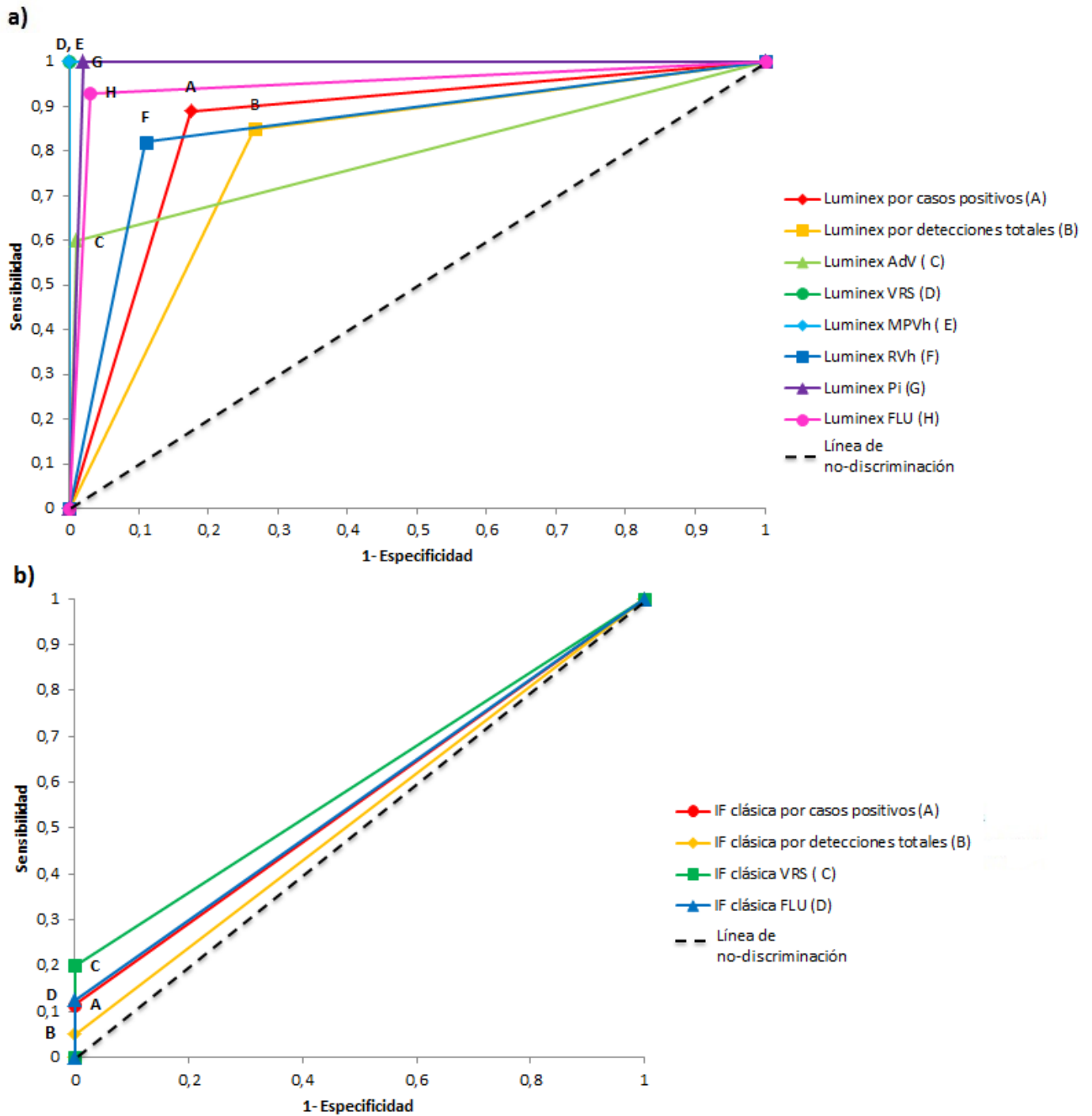
\*p obtenido con la prueba de correlación de Pearson, considerando significativo un  $p < 0,05$ .

**6.- Curvas ROC:** También se realizaron análisis de concordancia y eficiencia diagnóstica de las técnicas de Luminex® e IF clásica con respecto a la TR-RCP, graficando la sensibilidad y 1-especificidad en una curva ROC y calculando el área bajo la curva (AUC), para las detecciones por paciente, total de detecciones virales y por blanco viral (**Tabla 7, Figura 7**). La técnica de Luminex® obtuvo valores de AUC entre 0,79 y 1, presentando gran eficiencia diagnóstica. Por el contrario, la IF clásica obtuvo valores de AUC entre 0,51 y 0,53, valores bajos y cercanos al límite de no-discriminación, debido a que sus valores de sensibilidad son bajos (5,1% – 13%).

**Tabla 7:** Sensibilidad, 1-especificidad y área bajo la curva (AUC) para el total de casos, detección total y por cada virus para las técnicas de IF clásica y Luminex<sup>®</sup>, respecto de la TR-RCP, en adultos con NAC.

Técnica	Parámetro calculado	Sensibilidad	1 - Especificidad	AUC
<b>Luminex<sup>®</sup></b>	<i>Casos positivos</i>	0,89	0,18	0,86
	<i>Detección viral total</i>	0,85	0,27	0,79
	<i>Detección de AdV</i>	0,6	0,01	0,8
	<i>Detección de VRS</i>	1	0	1
	<i>Detección de MPVh</i>	1	0	1
	<i>Detección de PiV</i>	1	0,02	0,99
	<i>Detección de RVh</i>	0,82	0,11	0,86
	<i>Detección de FLU</i>	0,93	0,03	0,95
	<b>IF clásica</b>	<i>Casos positivos</i>	0,12	0
<i>Detección viral total</i>		0,05	0	0,51
<i>Detección de VRS</i>		0,2	0	0,55
<i>Detección de FLU</i>		0,13	0	0,53

**Figura 9:** Curva ROC para la detección de casos positivos, del total de detecciones y por cada virus de las técnicas de Luminex® e IF clásica, en referencia a la TR-RCP, en adultos con NAC.

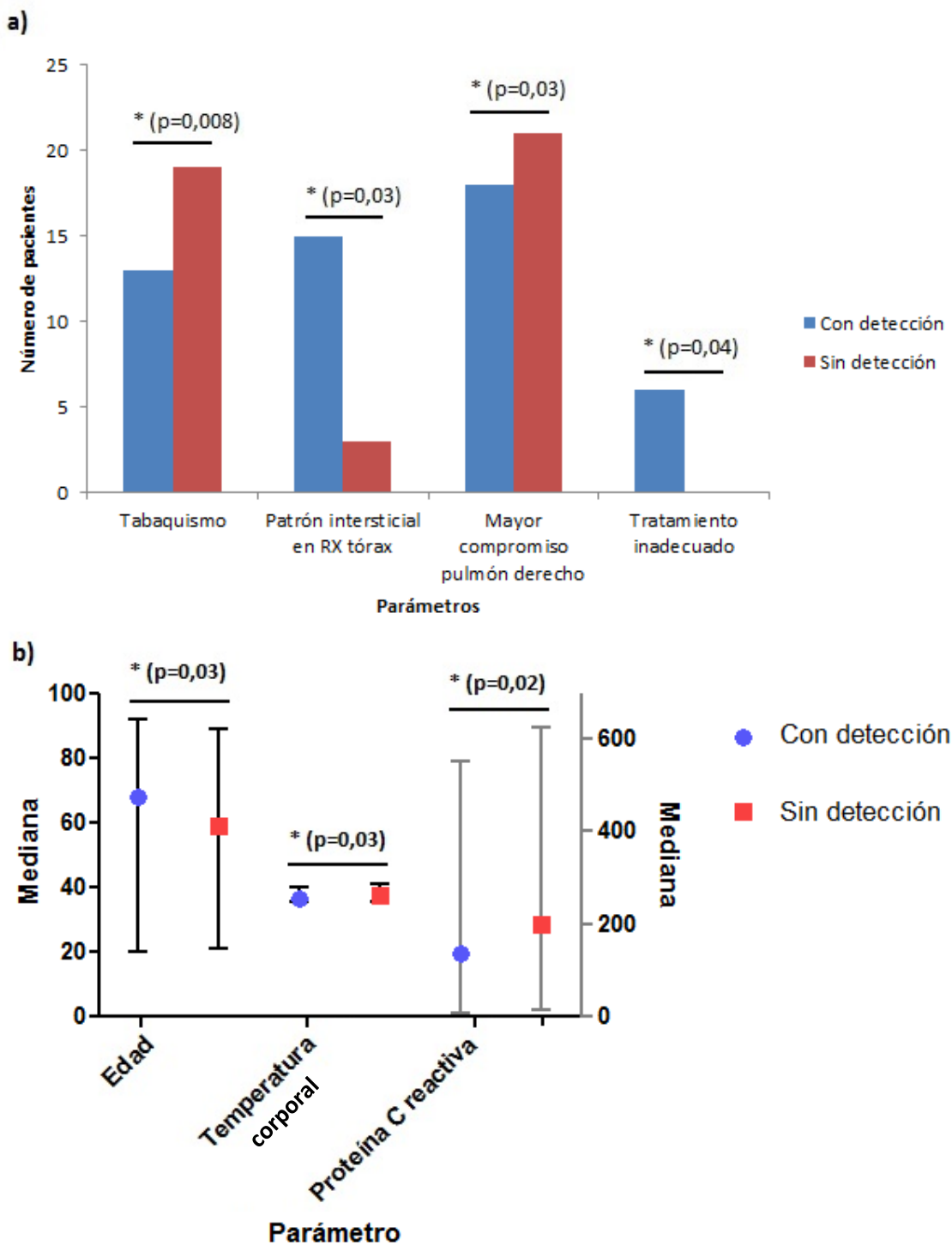


- a) Parámetros analizados para las detecciones por la técnica Luminex®, respecto de la TR-RCP.
- b) Parámetros analizados para las detecciones por la técnica IF clásica, respecto de la TR-RCP.

**7.- Análisis de datos demográficos:** Se compararon los datos obtenidos de la ficha clínica aplicada a cada paciente enrolado, agrupados en 4 categorías: a) Datos demográficos y antecedentes médicos; b) Condición de ingreso; c) Parámetros de laboratorio y evaluación radiológica y d) Tratamiento y evolución (**Anexo 6**).

Comparando los pacientes con y sin detección viral, mediante TR-RCP y/o Luminex<sup>®</sup>, solo fueron significativamente diferentes la mayor edad (mediana: 68 vs 59; rango: 20-92 vs 21-89; p=0,03), el número de casos con patrón intersticial en la radiografía de tórax (15 vs 3; p=0,03) y la cantidad de pacientes con tratamiento inadecuado (6 vs 0; p=0,04) entre los adultos con detección de virus respecto de los sin detección. Por el contrario, en los pacientes sin detección viral fueron significativamente superiores la temperatura corporal (mediana: 36,3°C vs 37,2°C; rango: 35,5°C – 40°C y 35,4°C – 41°C; p=0,03), los niveles sanguíneos de proteína C reactiva (PCR) (mediana: 134 mg/dl vs 198 mg/dl; rango: 5,9 mg/dl – 552 mg/dl y 14,5 mg/dl – 626 mg/dl; p=0,02), el número de fumadores (13 vs 19; p=0,008) y los casos con mayor compromiso lobular en el pulmón derecho (18 vs 21; p=0,03) (**Figura 8**).

**Figura 10:** Parámetros demográficos, clínicos y de evolución significativamente diferentes entre 68 adultos con NAC y detección viral y 45 sin detección por las técnicas de TR-RCP y/o Luminex®.



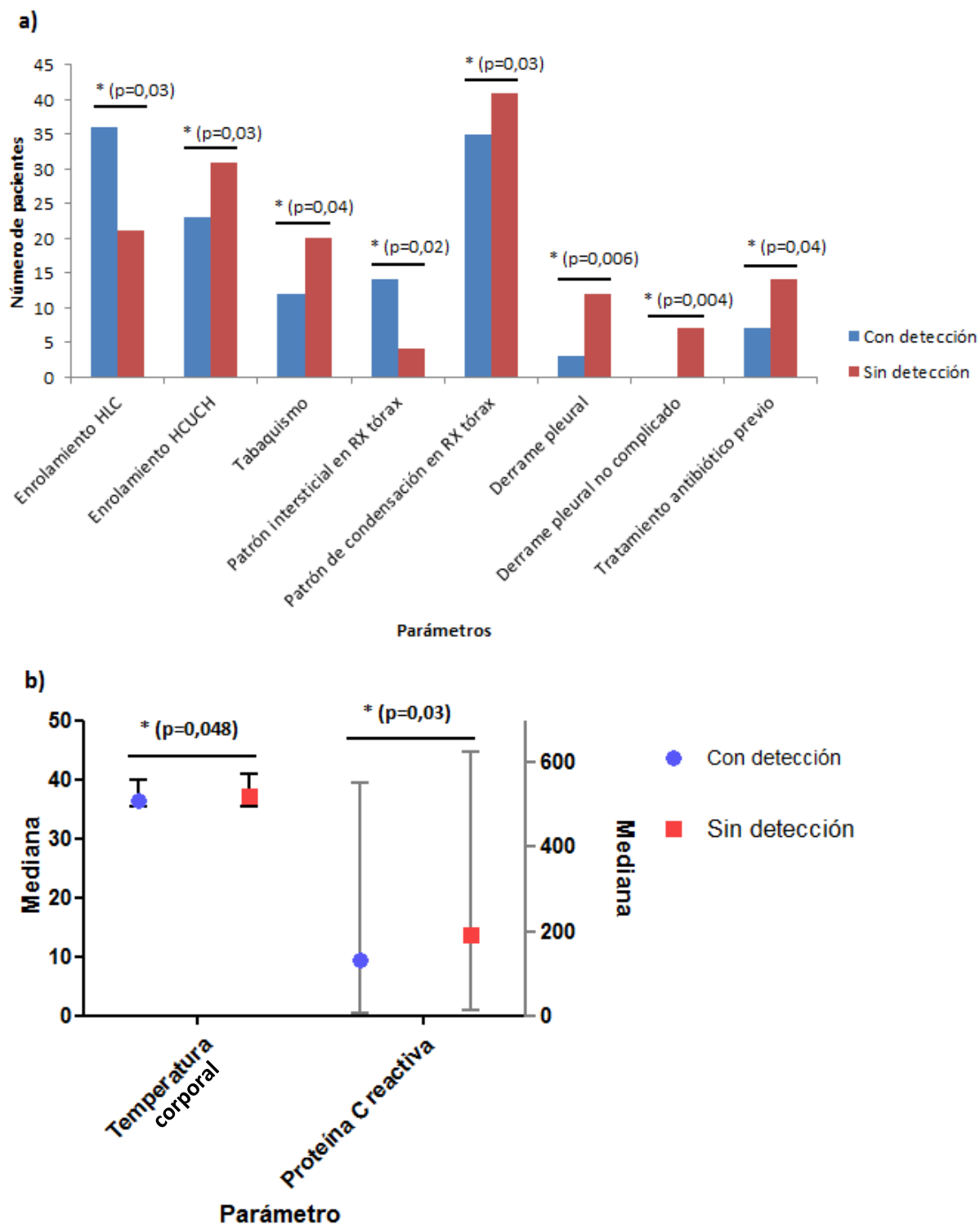
**a)** Parámetros cualitativos, analizados con la prueba Z considerando como significativo un  $p < 0,05$ .

**b)** Parámetros cuantitativos, graficados con mediana y rango (su color corresponde al eje Y correspondiente), y analizados con la prueba t considerando como significativo un  $p < 0,05$ .



Entre los adultos con virus detectados por TR-RCP, el número de casos enrolados por el Hospital Lucio Córdova (36 vs 21; p=0,03) y con patrón intersticial en la radiografía de tórax (14 vs 4; p=0,02) fue significativamente mayor que entre los sin detección viral. Por el contrario, en estos últimos se encontró significativamente mayor cantidad de pacientes enrolados en el HCUCH (23 vs 31; p=0,03), de fumadores (12 vs 20; p=0,04), con patrón de condensación en la radiografía de tórax (35 vs 41; p=0,03), con derrame pleural (3 vs 12; p=0,006) y no complicado (0 vs 7; p=0,004) y con tratamiento antibiótico previo al enrolamiento (7 vs 14; p=0,04). También fue mayor la temperatura corporal (mediana: 36,3°C vs 37,2°C; rango: 35,5°C – 40°C y 35,4°C – 41°C; p=0,048) y las concentraciones de Proteína C reactiva (mediana: 132 mg/dl vs 191 mg/dl; rango: 5,9 mg/dl – 552 mg/dl y 14,5 mg/dl – 626 mg/dl; p=0,03), (**Figura 9**).

**Figura 11:** Parámetros demográficos, clínicos y de evolución con diferencias significativas para 60 adultos con NAC con y detección viral y 53 sin detección por la técnica de TR-RCP.

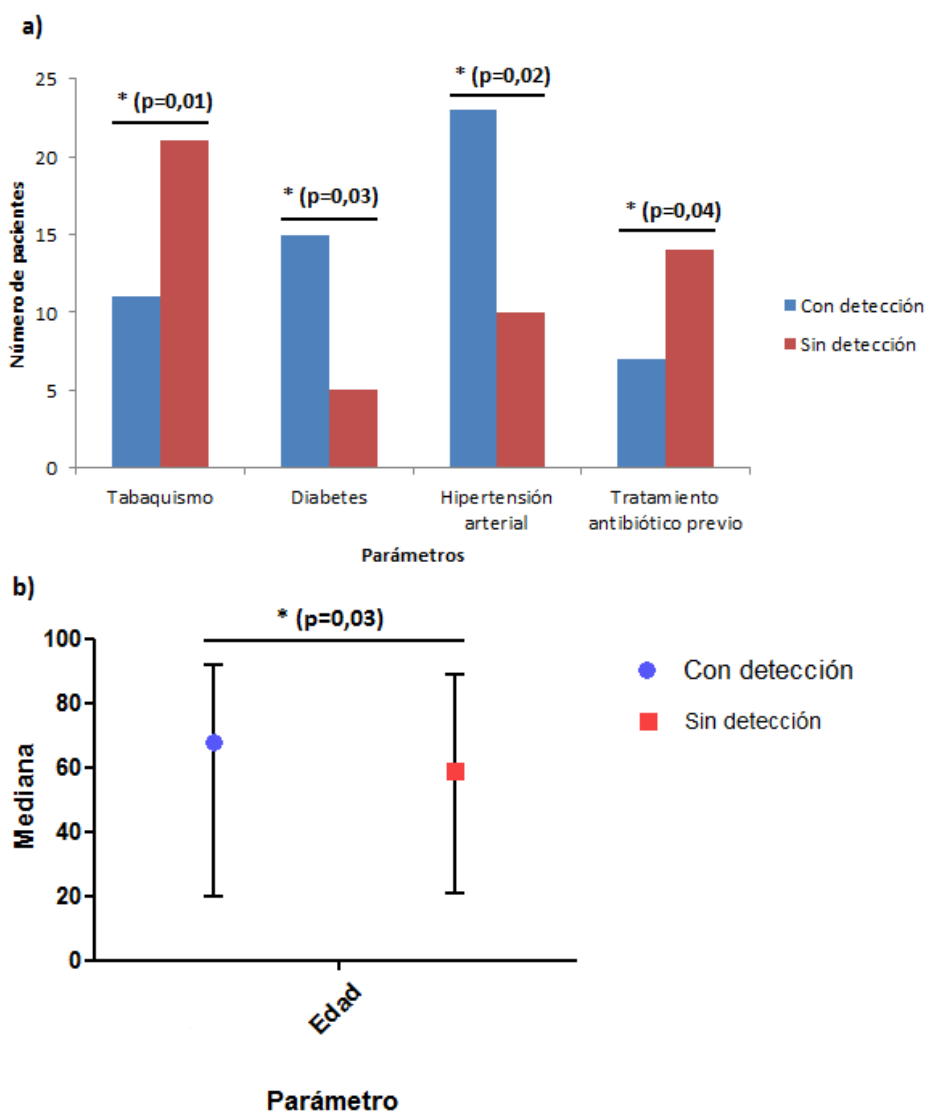


**a)** Parámetros cualitativos, analizados con la prueba Z considerando como significativo un  $p < 0,05$ .

**b)** Parámetros cuantitativos, graficados con mediana y rango (su color corresponde al eje Y correspondiente), y analizados con la prueba t considerando como significativo un  $p < 0,05$ .

Según la detección por Luminex<sup>®</sup>, los adultos con virus eran de mayor edad (mediana: 68 vs 59; rango: 20 – 92 y 21 – 89;  $p=0,03$ ) y mayor proporción presentaban antecedentes de hipertensión arterial (23 vs 10;  $p=0,02$ ) y de diabetes (15 vs 5;  $p=0,03$ ) que los pacientes sin detección viral. En estos, se encontró significativamente un mayor número de fumadores (11 vs 21;  $p=0,01$ ) y de casos con tratamiento antibiótico previo (7 vs 14;  $p=0,04$ ) (**Figura 10**).

**Figura 12:** Parámetros demográficos, clínicos y de evolución con diferencias significativas para 60 adultos con NAC y detección viral y 53 sin detección por la técnica de Luminex<sup>®</sup>.



a) Parámetros cualitativos, analizados con la prueba Z considerando significativo un  $p < 0,05$ .

b) Parámetros cuantitativos, graficados con mediana y rango, y analizados con la prueba t considerando significativo un  $p < 0,05$ .

No se encontraron diferencias significativas en los parámetros clínicos entre los casos positivos por Luminex<sup>®</sup> o TR-RCP, porque en 52 de los 60 pacientes (86,7%) coincidió la detección viral por ambas técnicas.

#### **4.-Analizar las ventajas y desventajas de las 3 metodologías en relación a su implementación, manejo, costo y rapidez en un laboratorio de diagnóstico.**

Se analizaron los parámetros de costo, manejo e implementación de las técnicas, encontrándose que la IF clásica es la técnica de menor costo en equipos y reactivos, pero también de número de muestras y blancos virales analizados simultáneamente. Por el contrario, Luminex<sup>®</sup> es la técnica más costosa, pero la que analiza el mayor número de muestras y blancos virales al mismo tiempo. Luminex<sup>®</sup> y la TR-RCP tienen un mayor tiempo y dificultad en la ejecución de la técnica comparado al de la IF. Sin embargo, el tiempo destinado a la observación del resultado y su interpretación es mayor en la IF que en la TR-RCP y Luminex<sup>®</sup>, siendo operador dependiente, por lo que existe un componente subjetivo. (Tabla 8).

**Tabla 8:** Análisis de factores que influyen en la implementación de las técnicas de IF, TR-RCP y Luminex<sup>®</sup>.

Aspectos de implementación	IF	TR-RCP	Luminex <sup>®</sup>
Costos de reactivos y fungibles por muestra*	\$1.800	\$110.000	\$197.000.
Costo de los equipos*	\$6.260.000 +IVA	\$9.000.000 + IVA	\$40.000.000 + IVA
Tiempo de ejecución**	2 horas	5 horas	6 horas
Tiempo para análisis**	30 min	5 min	5 min
Número de muestras estudiadas simultáneas	10 muestras	3 muestras (rotor 36 tubos)	21 muestras (tope 94 muestras)
Espacio de implementación	2 habitaciones	3 habitaciones	3 habitaciones
Dificultad en el manejo	Fácil	Medio	Medio
Dificultad en análisis	Medio	Fácil	Fácil
Número de blancos virales a detectar simultáneamente (considerando subtipos)	5	12	18

\*Costo aproximado

\*\*Tiempo aproximado

Si establecemos un sistema de puntajes para cada parámetro antes mencionado, el cual se califica de 1 a 5, siendo 1 el valor óptimo para cada parámetro y 5 el valor menos deseado, se considera para cada parámetro la siguiente tabulación:

- a) **Costo total aproximado de equipos y exámenes por paciente:** 1 es menor costo; 5, mayor costo.
- b) **Tiempo estimado de ejecución:** 1 es menor tiempo; 5, mayor tiempo.
- c) **Tiempo estimado de análisis:** 1 es menor tiempo; 5, mayor tiempo.
- d) **Número de muestras analizadas por corrida:** 1 es mayor número; 5, menor número.
- e) **Dificultad de manejo:** 1 es menor dificultad; 5, mayor dificultad.
- f) **Dificultad de análisis:** 1 es menor dificultad; 5, mayor dificultad.
- g) **Número de virus analizados simultáneamente:** 1 es mayor cantidad; 5, menor cantidad.
- h) **Rendimiento general en la detección viral en adultos:** 1 es mayor rendimiento; 5, menor rendimiento.

Los puntajes obtenidos por las distintas técnicas se adjuntan en la **Tabla 9**.

**Tabla 9:** Tabulación de los parámetros que influyen en la implementación de las técnicas de IF, TR-RCP y Luminex<sup>®</sup> en la detección de virus respiratorios en adultos con NAC.

Parámetro	IF clásica	TR-RCP	Luminex <sup>®</sup>
a)	1	4	5
b)	2	4	5
c)	3	2	1
d)	5	5	1
e)	2	4	4
f)	5	2	1
g)	5	2	1
h)	5	1	1
<b>Puntaje final (Media)</b>	<b>3,5</b>	<b>3</b>	<b>2,4</b>

De este análisis se obtiene que Luminex<sup>®</sup> es la técnica más adecuada y la IF clásica la menos recomendable para la detección de viral en adultos con NAC.

## DISCUSIÓN

### ***1.- Detección viral en adultos con NAC.***

De los 113 pacientes enrolados en esta tesis, considerando las 3 técnicas, se detectó virus en el 53,1% de los casos, coincidiendo con publicaciones de los últimos años en la importancia y alta prevalencia de los virus respiratorios en adultos con NAC, que aunque solo consideraban infección por VRS y FLU, alcanzan un 10-30% de prevalencia (3, 18, 20, 23). Lo anterior enfatiza la importancia de identificar los agentes etiológicos involucrados en el proceso de la NAC, lo que podría determinar un cambio en el tratamiento y evolución del paciente, según el agente infectado, y la necesidad de incluir a estos agentes virales en la guía clínica del MINSAL, puesto que la última versión del 2011 (1) solo considera la presencia y uso de tratamiento antibacteriano contra *Streptococcus pneumoniae* o *Mycoplasma pneumoniae* como parte del algoritmo de tratamiento ambulatorio en adultos con neumonía.

### ***2.- Epidemiología de las detecciones virales en adultos con NAC.***

La detección de virus en pacientes con infecciones respiratorias permite conocer el comportamiento estacional de los virus respiratorios circulantes en Santiago. Los casos con FLU A (9,7%) detectados fueron menores a los reportados por el MINSAL en el mismo periodo (13,3%) (32, 33), siendo FLU A H3N2 el más frecuente, acompañado de un alza de FLU A H1N1 pandémica 2009 en 2013, aunque estos coincidieron en los meses de invierno, tanto en 2012 como 2013. En el caso de FLU B, este coincidió tanto en frecuencia (5,3% vs 5%) y en su mayor detección durante la primavera de ambos años. Las detecciones de RVh (32,7%) fueron mayores a las de FLU y VRS y durante todo el año, concentrándose en invierno y primavera, tal como se describe en la literatura (10). Las detecciones de VRS (4,4%) fueron mucho menores a las de FLU A y a las reportadas (61,1%) (33), coincidiendo en la época invernal (julio-agosto), mas no en los meses de mayor aumento reportado (junio-julio).

Aunque el número de casos positivos para los otros virus es pequeño para establecer un comportamiento general de la infección durante el periodo 2012-2013, observamos que la

baja detección de MPVh (1,8%) y estacionalidad primaveral coincidió con los informes epidemiológicos (4,5%) (32, 33). La detección de PiV (2,7%) fue baja comparada con la de los informes (19%), pero coincidente en los meses de invierno; además, un caso de PiV 1 fue detectado fuera del invierno 2012, pero según los informes, esta detección coincide con un periodo de alza entre octubre y noviembre (33). AdV (4,4%) fue mayormente detectado en invierno y en similar porcentaje a los informes (6,9%) (33). Los 2 casos de CoVh (1,8%) fueron encontrados en invierno, como lo describió Gaunt *et al* (16).

BoVh no fue detectado en los pacientes estudiados, lo que difiere del 21,8% de frecuencia encontrado en estudios nacionales. Esto se podría explicar porque estos trabajos incluyeron a niños menores de 5 años (34, 35), siendo este el primer estudio conocido en adultos en nuestro país. Sin embargo, en otros países se ha reportado la presencia de BoVh en adultos. Fry *et al* (36) reporta 5 (0,42%) casos infectados con BoVh de 1168 adultos con neumonía en Tailandia; a su vez, Liu *et al* (37) reporta 4 (0,39%) casos de 1014 adultos con enfermedades respiratorias agudas en el sur de China con infección de BoVh, siendo las cifras en ambas publicaciones mucho menores a los casos detectados en niños (4,1% y 3,4% respectivamente), sobre todo en los menores de 5 años. La baja frecuencia detectada en estas publicaciones explicaría la ausencia de detección de este virus en nuestra cohorte, porque siendo muy poco frecuente en adultos, es muy improbable detectar algún caso en nuestro pequeño grupo de estudio.

### ***3.- Rendimiento de Luminex<sup>®</sup> en la detección de virus respiratorios en adultos con NAC.***

Luminex<sup>®</sup>, técnica que combina TR-RCP multiplex con un sistema de detección semejante a un citómetro de flujo, presentó un rendimiento (53,1%) similar al de la TR-RCP en la detección de casos virales y una sensibilidad (89,3%) en el rango de lo descrito, los cuales varían de un 78,8% a un 91,2% cuando lo comparamos con la TR-RCP convencional o en tiempo real (30, 38). También se enmarca en el rango de sensibilidad (84,4% al 90,6%) informado para otras técnicas que conjugan amplificación por TR-RCP y un método de detección adicional, como marcación enzimática con isoguanina/5-metil-isocitidina, suspensión del producto de TR-RCP en microarrays o en celdas de proceso usando microfluidos (39-41).

La especificidad de Luminex<sup>®</sup> de 82,5% fue menor a la referida en la literatura respecto a la TR-RCP convencional o tiempo real (97,3% - 99,9%) (30, 38) y a las otras metodologías (99,6% - 99,7%) (39-41). Esto podría explicarse porque fue el único método que detectó CoVh y PiV, posiblemente por el uso de partidores más apropiados a los utilizados en la TR-RCP. También contribuiría la pesquisa de los 2 casos de FLU A que no fueron detectados por la TR-RCP pero que fueron corroborados por resultados obtenidos en el Hospital Clínico U. de Chile, aplicando TR-RCP convencional en un tipo de muestra obtenida previamente a la recibida en el laboratorio. La detección de Luminex<sup>®</sup> en estas muestras, pese al uso previo de tratamiento antiviral, muestra la gran sensibilidad de este método. La mayor detección de RVh por Luminex<sup>®</sup> podría explicarse porque detecta indistintamente a RVh y enterovirus, siendo estos últimos no pesquisados por la TR-RCP usada en esta tesis, que está diseñada para una detección específica de RVh, lo que está descrito en la literatura (41, 42).

Los 3 casos de AdV detectados por TR-RCP y negativos por Luminex<sup>®</sup> presentaron altos  $C_t$  (>30), indicando una baja concentración de genoma viral en las muestras. Este material podría haberse perdido por la congelación y descongelación del extracto de RNA/DNA, proceso necesario para reunir el número de muestras que permitiera aprovechar al máximo el kit de Luminex<sup>®</sup> considerando su alto costo. Se han reportado en la literatura fallas en la detección de AdV en un amplio rango de  $C_t$ , posiblemente debido a la degradación del material genético por descongelaciones sucesivas o, en el caso de  $C_t$  más bajos, a la unión deficientes de los partidores asociados a ciertos subtipos de AdV, por ejemplo los serotipos 1, 2, 5 y 6 de la especie C. Dada la gran variabilidad de este virus, se sugiere incorporar en el kit los partidores que permitan detectar los subtipos más frecuentes observados en la población que se estudiará (30, 38, 41).

#### ***4.- Rendimiento de la IF rápida y clásica en la detección de virus respiratorios en adultos con NAC.***

El bajo rendimiento de la IF rápida, sin detectar casos positivos (aunque sus resultados coincidieron con la negatividad encontrada por la IF clásica), determinó la decisión de no seguir usándose en el proyecto. La menor celularidad observada en los frotis de los ANF



usados para la IF rápida respecto a los de la IF clásica, debido al protocolo propuesto por el fabricante, podría estar afectando el resultado final de esta técnica, lo que debiera establecerse aplicando el mismo protocolo a ambas IF.

Con respecto a la IF clásica, su rendimiento (2,9%) y sensibilidad (11,5%) fueron muy bajos, detectando solo 3 casos positivos, siendo consistente con la baja excreción viral en adultos señalada en la literatura (25, 26). Por otro lado, las 3 detecciones virales por la IF clásica fueron confirmadas tanto por la TR-RCP como por Luminex<sup>®</sup>, lo que podría sugerir que en estos casos la excreción viral era alta y por eso se pudieron detectar ( $C_t$  entre 15,85 y 24,13; MFI entre 470 y 2904). El ensayo de concentraciones de anticuerpos monoclonales fue de utilidad para confirmar los casos positivos detectados por IF clásica; sin embargo, la menor dilución de anticuerpos no detectó una mayor cantidad de casos. En esta tesis se demostró que en adultos la sensibilidad de la IF es considerablemente menor al 95% informado en niños (25,26), siendo superada por las técnicas moleculares y, por lo tanto, aunque sea ampliamente usada en nuestros servicios de salud (25) es inapropiada para el estudio viral respiratorio de rutina en adultos.

##### ***5.- TR-RCP en la detección de virus en adultos con NAC.***

Durante el desarrollo de esta tesis, se efectuaron algunos cambios al protocolo de la TR-RCP, como un aumento en el tiempo del programa de la RCP indicada por el proveedor, y dilución de la solución TE como resultado de pruebas realizadas por nosotros para dilucidar las discordancias entre esta técnica y Luminex<sup>®</sup>, aumentando el rendimiento de la RCP de 39,8% a 49,6%. Esto permitió identificar como verdaderos positivos a algunos resultados de Luminex<sup>®</sup>, que inicialmente no habían sido corroborados por la RCP, como las detecciones de CoVh y PiV 4 con altos MFI, y atribuir la falla en la detección por TR-RCP a problemas en las secuencias usadas en los partidores. Esta experiencia demuestra la importancia de un cuestionamiento constante a las técnicas que se utilizan en los laboratorios de rutina, sobre todo al implementar sistemas comerciales nuevos, porque este análisis puede ser vital al realizar el diagnóstico virológico.

Respecto a las otras discrepancias entre Luminex<sup>®</sup> y TR-RCP, como la mayor detección de RVh, se podría explicar porque la primera pesquisa a RVh y enterovirus en conjunto, en cambio la RCP amplifica específicamente a RVh. Los casos positivos solo por Luminex<sup>®</sup> de CoVh y PiV 4, con altos MFI, podrían deberse a problemas en la construcción de los partidores usados en la TR-RCP, determinando una menor sensibilidad de esta. En estos casos, el análisis de los valores de MFI y  $C_t$  y de la curva de fluorescencia pueden ayudar a interpretar los resultados correctamente, considerando como verdaderos positivos aquellos con altos MFI o bajos  $C_t$  y con una clara curva ascendente de fluorescencia.

#### **6.- Correlación entre MFI de Luminex<sup>®</sup> y $C_t$ de la TR-RCP.**

La correlación entre la MFI determinada por Luminex<sup>®</sup> y el  $C_t$  obtenido en la TR-RCP de las muestras positivas coincidentes en la detección total de virus y en las de RVh y FLU A, mostró que el MFI y  $C_t$  son inversamente proporcionales para las detecciones totales y RVh. Esto significa que mientras más alto el valor del MFI, más bajo es el valor de  $C_t$ , lo que indicaría una mayor carga viral en la muestra, siendo esto reportado también por Rand *et al* en 2011 (40). Relacionar el valor de MFI con la carga viral presente en la muestra, podría ser utilizado para cuantificar la carga viral en las muestras analizadas mediante Luminex<sup>®</sup>, aplicando una curva estándar. Esto debe ser comprobado con exhaustivos análisis de utilidad y factibilidad.

Sin embargo, esta correlación no solo no fue significativa para FLU A, probablemente por el bajo número de muestras positivas, sino que mostro una tendencia a ser directamente proporcional, lo que se explica por la detección de 2 genes diferentes en Luminex<sup>®</sup>. El primero corresponde al gen de la proteína matriz y el segundo al gen de la proteína H, el cual es variable para la detección de FLU H1, H3 y H1N1 p2009. En muchas de estas detecciones, el valor del MFI para el gen matriz fue menor al del gen H, teniendo además un  $C_t$  bajo, lo que altera la relación. Sin embargo, para este análisis que comprende todas las FLU A, el uso del MFI del gen matriz es lo más correcto a considerar.

### **7.- Curva ROC para Luminex® e IFI clásica.**

Los análisis de curva ROC y AUC son ampliamente usados en clínica para evaluar el desempeño de las técnicas diagnósticas en los laboratorios de rutina, porque evalúan tanto su capacidad de pesquisar todos los casos positivos (sensibilidad) como de detectar los verdaderamente positivos (1-especificidad). En referencia a la TR-RCP, Luminex® obtuvo valores altos de AUC, clasificando su rendimiento como “bueno” respecto al total de detecciones virales (AUC= 0,79) y de casos positivos (AUC=0,86) (43) y “excelente” respecto a la detección de VRS y MPVh (AUC=1). Estos resultados además son confirmados por el coeficiente kappa ( $\kappa$ ), el cual califica la concordancia de Luminex® con la TR-RCP como “moderada” a “perfecta” (0,5 a 1) (44) para las detecciones totales y de “substantial” para los casos positivos (0,7).

Por el contrario, cuando comparamos la IF clásica a la TR-RCP, los valores de AUC (0,51 a 0,55) la califican como un método “malo” y por análisis de coeficiente  $\kappa$ , con “poca” o “razonable” concordancia (0,1 a 0,3). Estos valores se explican por la baja sensibilidad de la técnica, a pesar de tener una especificidad excelente (100% para todos los parámetros).

### **8.- Detección viral por TR-RCP e IFI clásica en ANF y TNF.**

El rendimiento de la TR-RCP entre los ANF y TNF mostró una mayor detección de RVh en los TNF, lo que concuerda con lo descrito en la literatura (10), puesto que la temperatura nasal es óptima para su replicación. En cambio, en los ANF, se detectaron otros virus como FLU y AdV, no detectados en TNF porque son poco frecuentes en la zona alta del tracto respiratorio, lo que también concuerda con lo descrito en la literatura (6-9, 11). Por lo anterior, se debiera elegir el tipo de muestra a estudiar según el agente viral que se necesite pesquisar. Además la detección de RVh solo en muestras de TNF nos permite cuestionar su participación en el proceso de neumonía.

Con respecto al rendimiento de ambos tipos de muestra en la IF clásica, se encontró que los ANF tuvieron una mayor celularidad que los TNF, siendo coincidente con publicaciones más antiguas, que consideraban al ANF como la muestra de mejor rendimiento para esta técnica (25). Sin embargo, Jagus *et al* y Loeffelholz *et al* (24, 25) postulan que el TNF está

desplazando al ANF por su facilidad de obtención y mejor rendimiento en la detección, no siendo este el caso, aunque esto podría explicarse por errores en la toma de muestra de los TNF. No es posible comparar el rendimiento de la IF en los dos tipos de muestra por el bajo número de casos positivos y porque solo se dispuso de un tipo de muestra en una de las 3 detecciones virales.

### ***9.- Detección viral y características de los adultos con NAC.***

Se ha descrito una mayor edad y antecedentes de hipertensión y diabetes como factores de co-morbilidad en pacientes con NAC (1). Referente a esto, se encontró que los enfermos con NAC y detección viral eran de mayor edad que los sin detección; sin embargo, sólo se encontró una significativa mayor frecuencia de antecedentes de hipertensión y diabetes en aquellos con detección viral respecto a los sin detección establecida por Luminex<sup>®</sup>. Este hallazgo es difícil de explicar y podría deberse a algún factor desconocido que habría que determinar.

La mayor frecuencia de patrón de infiltrado intersticial en la radiografía de tórax en los casos con detección viral general y por TR-RCP concuerda con lo descrito en infecciones virales, a diferencia de las infecciones bacterianas que generan condensación pulmonar (45, 46). Esto, junto con derrame pleural no complicado, mayor temperatura corporal y niveles sanguíneos de proteína C, fue detectado con mayor frecuencia en los pacientes sin detección viral por la TR-RCP, lo que concuerda con síntomas y parámetros clínicos clásicos de una infección bacteriana (47, 48).

El mayor número de pacientes con tratamiento inadecuado, definido por los médicos como falta de respuesta del enfermo a la terapia antibiótica, entre aquellos con detección viral por ambas técnicas, es concordante con una enfermedad probablemente causada por un virus. Las recomendaciones de las guías clínicas (1) indican el uso de antibióticos como esquema inicial de tratamiento, incluso previo a la hospitalización del paciente, y solo en casos de infección viral tratable, como en los de FLU A/B, una vez confirmada su presencia se cambia a un tratamiento antiviral. Esto refuerza la importancia del diagnóstico del agente involucrado en la NAC, no solamente por la aplicación del tratamiento adecuado, sino que

también se evita la generación de bacterias multirresistentes por el uso indiscriminado de antibióticos.

El mayor número de pacientes con detección viral enrolados en el HLC y sin detección en el HCUCH, detectados sólo por la TR-RCP, se podría explicar por los días de evolución de los casos al momento de la toma de muestra, puesto que algunos enfermos provenientes del HCUCH tenían más de 7 días de evolución y/o estaban ya recibiendo tratamiento antiviral. Ambos factores afectan directamente la detección del agente viral porque la carga viral en la muestra disminuye por el antiviral o por la evolución de la infección de más de 7 días, disminuyendo la excreción viral en ambas situaciones.

También se encontró un mayor número de fumadores entre los pacientes sin detección general, por TR-RCP y Luminex<sup>®</sup>, lo que puede explicarse por la disminución en la respuesta inmunológica pulmonar, contribuyendo a un aumento en el riesgo de neumonías de origen bacteriano (49). También se encontró mayor compromiso en el pulmón derecho en pacientes sin detección viral, debiéndose probablemente a la tendencia de las bacterias en generar condensados en un solo pulmón (50).

#### ***10.- Evaluación comparativa entre Luminex<sup>®</sup>, TR-RCP e IFI clásica.***

En el análisis de implementación, Luminex<sup>®</sup> resultó ser la técnica más costosa de las 3 (\$60 millones aprox.); sin embargo, es la que permite detectar un mayor número de virus y de pacientes simultáneamente, requiriendo un tiempo de proceso similar al de la TR-RCP (6 horas aprox.), sin sacrificar sensibilidad ni especificidad, reduciendo los costos de implementación y de cada ensayo mientras mayor sea su uso en el laboratorio. La IF clásica es de menor costo, justificando su uso en nuestros hospitales, pero la cantidad de pacientes y de virus analizados simultáneamente es considerablemente menor con respecto a las otras técnicas. Además es poco sensible en adultos y necesita más tiempo, al ser más difícil y subjetivo el análisis de los resultados, por lo que requiere personal entrenado. Mahony *et al* (51) y Dundas *et al* (52) determinaron que no solo el desempeño de Luminex<sup>®</sup> era mayor al de la IF, conjugada con aislamiento viral, sino que además poseía un menor costo de

implementación, porque su uso determina menores gastos asociados al tratamiento y hospitalización de los pacientes.

### ***11.- Proyecciones.***

La aplicación de la TR-RCP permitió un diagnóstico rápido de infecciones virales respiratorias en adultos con NAC, lo que en algunos casos determinó el tratamiento antiviral oportuno. Estas ventajas de la RCP, junto con el mayor rango de virus a detectar, sensibilidad (25-27), rapidez y la mayor accesibilidad, indicarían la necesidad de reemplazar al aislamiento viral por la RCP como técnica de referencia, tal como se aplicó en esta tesis. También en este estudio mostramos que la contribución de la TR-RCP al diagnóstico en estos pacientes es importante por su alta sensibilidad y especificidad comparada con otras técnicas más clásicas, lo cual explica su masificación en los centros de salud de nuestro país. Esta masificación conlleva a la aparición de nuevas marcas con diferentes reactivos y protocolos, por lo que sería aconsejable en el futuro comparar con el protocolo aplicado en esta tesis, el cual era el único disponible en Chile al inicio del proyecto.

Finalmente, Luminex<sup>®</sup> podría convertirse en la técnica de detección de virus respiratorios en adultos en el futuro, considerando su alta sensibilidad, especificidad y capacidad de procesamiento, pero también de costos, siendo una técnica de alto rendimiento para un laboratorio con un gran flujo de muestras. Una de las limitantes de este estudio fue la cantidad de pacientes, siendo necesario ampliar el tamaño muestral, y comparar muestras distintas y con otros métodos de TR-RCP. Una proyección de este trabajo sería la generación de un kit de Luminex<sup>®</sup> dirigido específicamente a la detección de agentes respiratorios, lo que es posible porque esta técnica es abierta y permite la modificación de los distintos sistemas comerciales agregando patógenos involucrados en otras patologías respiratorias.

## CONCLUSIONES

1. La alta frecuencia de virus respiratorios en adultos con NAC determina la necesidad de incluir la detección de estos agentes en la rutina de un laboratorio de diagnóstico.
2. El rendimiento de Luminex<sup>®</sup> fue alto y similar al de la TR-RCP en la detección de virus respiratorios en adultos con NAC.
3. Por el mayor rendimiento y la mayor capacidad de detección de virus y pacientes simultáneos, Luminex<sup>®</sup> es una técnica óptima para implementarse en un laboratorio de rutina, para el diagnóstico de virus respiratorios en adultos con NAC, especialmente en aquellos con un alto flujo de muestras por su mayor costo y tiempo de procesamiento de muestras.
4. La IF no debiera ser utilizada para la detección de virus respiratorios en adultos con NAC por su bajo rendimiento y sensibilidad respecto a la TR-RCP, a diferencia de lo que ocurre en niños.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Guía Clínica AUGE “Neumonía Adquirida en la comunidad en adultos de 65 años y más: Manejo ambulatorio” Serie de Guías Clínicas MINSAL, 2011.
2. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. “Viral pneumonia”. *Lancet*. 2011. 377: 1264–75.
3. Marcos MA, Esperatti M, Torres A. “Viral pneumonia”. *Curr Opin Infect Dis*. 2009. 22(2): 143-147.
4. Niederman MS, Mandell, LA, Anzueto A, Bass JB, Broughton WA, Campbell GD, *et al*. “Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia: diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention”. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2001. 163(7): 1730-1754.
5. Johnstone J, Majumdar SR, Fox JD, Marrie TJ. “Viral infection in adults hospitalized with community-acquired pneumonia: prevalence, pathogens, and presentation”. *Chest*. 2008. 134(6):1141-1148
6. Luchsinger V. “Características del virus influenza y diagnóstico de laboratorio”. *Neumología Pediátrica*. 2009. 4(1): 3-5
7. Avendaño LF, Ferres M, Spencer E. “Virología clínica”. Capítulo 12. Páginas: 117-137. Editorial Mediterráneo, Chile. 2011.
8. Luchsinger V, Elgueta Noy A, Avendaño LF. “Human respiratory syncytial virus genomic and antigenic variants in two hospitals during one epidemic, in Santiago, Chile”. *J Clin Virol*. 2008. 42(3):260-263.
9. Henrickson KJ. “Parainfluenza viruses”. *Clin. Microbiol. Rev*. 2003. 16(2):242-264.
10. Gwaltney JM. “Rhinoviruses”. *Yale J Biol Med*. 1975. 48: 17-45.
11. Chan PKS, Tam JS, Lam CW, Chan E, Wu A, Li CK, *et al*. “Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome” *Emerg Infect Dis*. 2003. 9(9): 1058–1063.
12. Van Den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. “Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection”. *Pediatr Infect Dis J*. 2004. 23(1): 25-32.
13. Luchsinger V, Escobar C, Avendaño LF. “Detección de metapneumovirus humano en niños hospitalizados por infección respiratoria aguda baja en Santiago, Chile”. *Rev Med Chile*. 2005. 133: 1059-1064.
14. Kahn JS, McIntosh K. “History and recent advances in Coronavirus Discovery”. *Pediatr Infect Dis J*. 2005. 24: 223-227.
15. Siddel S, Wege H, Ter Meulen. “The biology of Coronaviruses”. *J. Gen. Virol*. 1983. 64: 761-776.
16. Gaunt ER, Hardie A, Claas EC, Simmonds P, Templeton KE. “Epidemiology and clinical presentations of the four human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex Real-Time PCR method”. *J Clin Microbiol*. 2010. 48(8): 2940-2947.
17. Allander T. “Human bocavirus”. *J Clin Virol*. 2008. 41: 29-33.



18. Rioseco Z ML, Riquelme O R, Riquelme O M, Inzunza P C, Oyarzún G P, Agüero O Y, *et al.* “Viral etiology of community acquired pneumonia among adults admitted to a general hospital”. *Rev Med Chil.* 2012. 140(8):984-9.
19. Avendaño LF, Ferres M, Spencer E. “Virología clínica”. Capítulo 8. Páginas: 77-89. Editorial Mediterráneo, Chile. 2011.
20. Jennings LC, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Laing RTR, Werno AM, *et al.* “Incidence and characteristics of viral community-acquired pneumonia in adults”. *Thorax.* 2008. 63:42-48
21. Templeton KE, Scheltinga SA, Van den Eeden CMJ, Graffelman WA, Van den Broek PJ, ECJ Claas. “Improved diagnosis of the etiology of Community-Acquired Pneumonia with Real-Time Polymerase Chain Reaction”. *Clin Infect Dis.* 2005. 41(3): 345-351.
22. Luchsinger V, Piedra PA, Ruiz M, Zunino E, Martínez MA, Machado C, *et al.* “Role of neutralizing antibodies in adults with Community-Acquired Pneumonia by Respiratory Syncytial Virus”. *Clin Infect Dis.* 2012. 54(7): 905-912.
23. Talbot HK, Falsey AR. “The diagnosis of viral respiratory disease in older adults”. *Clin Infect Dis.* 2010. 50: 747-751.
24. Jagus P, Chorostowska-Wynimko J, Radzikowska E, Gawryluk D. “The effectiveness of common respiratory viruses detection by indirect immunofluorescence test in samples from upper respiratory tract” *Centr Eur J Immunol.* 2011. 36(1): 37-39.
25. Loeffelholz M, Chonmaitree T. “Advances in diagnosis of respiratory virus infection”. *Int J Microbiol.* 2010. ID: 126049.
26. She RC, Polage CR, Caram LB, Taggart EW, Hymas WC, Woods CW, *et al.* “Performance of diagnostic tests to detect respiratory viruses in older adults”. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010. 67(3): 246-250.
27. Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang M, Cent A, Corey L, *et al.* “Comparison of Real-Time PCR assays with Fluorescent-Antibody Assays for diagnosis of respiratory virus infection in children”. *J Clin Microbiol.* 2006. 44(7): 2382-2388.
28. Merante F, Yaghoubian S, Janeczko R. “Principles of the xTAG™ respiratory viral panel assay (RVP Assay)”. *J Clin Virol.* 2007. 40(1): 31-35.
29. Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoubian S, Sinha, T, Lisle C, *et al.* “Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay”. *J Clin Microbiol.* 2007. 45(9): 2965-2970.
30. Gadsby NJ, Hardie A, Claas EC, Templeton KE. “Comparison of the Luminex Respiratory Virus Panel Fast assay with In-House Real-Time PCR for respiratory viral infection diagnosis”. *J Clin Microbiol.* 2010. 48(6): 2213-2216.
31. American College of Emergency Physicians. “Clinical policy for the management and risk stratification of community-acquired pneumonia in adults in the emergency department”. *Ann Emerg Med.* 2001. 38(1):107-113.

32. Unidad de Vigilancia, Departamento de Epidemiología, MINSAL. “Informe de Influenza; Semana Epidemiológica (SE) 1 a 52 de 2012 (1 de enero al 28 de diciembre)”  
[http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Influenza/Influenza\\_SE522012.pdf](http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Influenza/Influenza_SE522012.pdf)
33. Unidad de Vigilancia, Departamento de Epidemiología, MINSAL. “Informe de Circulación de Virus respiratorios hasta la semana 49 de 2014 ”  
[http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2013/12/informe\\_de\\_circulacion\\_viral\\_s49.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2013/12/informe_de_circulacion_viral_s49.pdf)
34. Flores JC, Vizcaya C, Araos R, Montecinos L, Godoy P, Valiente-Echeverría F, *et al.* “Bocavirus humano en Chile: características clínicas y epidemiológicas en niños con infecciones respiratorias”. *Rev Chil Infect.* 2011. 28(6): 504-511.
35. Moreno C, Solís Y, O’ Ryan M. “Bocavirus humano: Estudios en la literatura médica y en Chile”. *Rev Chil Infect.* 2009. 26(6):504-510.
36. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF *et al.* “Human Bocavirus: A novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand”. *J Infect Dis.* 2007. 195:1038-1045.
37. Liu WK, Chen DH, Liu Q, Liang HX, Yang ZF, Qin S *et al.* “Detection of human Bocavirus from children and adults with acute respiratory tract illness in Guangzhou, southern China”. *BMC Infect Dis.* 2011. 11:345.
38. Pabbaraju K, Tokaryk KL, Wong S, Fox JD. “Comparison of the Luminex xTAG Respiratory Viral Panel with In-House Nucleic Acid Amplification Tests for Diagnosis of Respiratory Virus Infections”. *J Clin Microbiol.* 2008. 46(9): 3056-3062.
39. Balada-Llasat JM, LaRue H, Kelly C, Rigali L, Pancholi P. “Evaluation of comercial ResPlex II v2.0, MultiCode<sup>®</sup>-PLx, and xTAG<sup>®</sup> respiratory viral panels for the diagnosis of respiratory viral infections in adults”. *J Clin Virol.* 2011. 50:42-45.
40. Rand KH, Rampersaud H, Houck HJ. “Comparison of Two Multiplex Methods for Detection of Respiratory Viruses: FilmArray RP and xTAG RVP”. *J Clin Microbiol.* 2011. 49(7): 2449-2453.
41. Popowitch EB, O’Neill SS, Miller MB. “Comparison of the BioFire FilmArray RP, Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP Fast Multiplex Assays for Detection of Respiratory Viruses”. *J Clin Microbiol.* 2013. 51(5):1528-1533.
42. Jokela P, Piiparinen H, Mannonen L, Auvinen E, Lappalainen M. “Performance of the Luminex xTAG Respiratory Viral Panel Fast in a clinical laboratory setting”. *J Virol Methods.* 2012. 182:82-86.
43. Fawcett T. “ROC Graphs: Notes and Practical Considerations for Researchers”. Technical report. Palo Alto (USA): HP Laboratories. 2004.
44. Viera AJ, Garret JM. “Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic”. *Fam Med.* 2005. 37(5):360-363.
45. Kim EA, Lee KS, Primack SL, Yoon HK, Byun HS, Kim TS, *et al.* “Viral Pneumonias in Adults: Radiologic and Pathologic Findings”. *Radiographics.* 2002. 22 spec:137-149.

46. Moëgne K, Ortega X, Cordero J, Vidal A, Escaffi J. "Patrón de alteraciones en la radiografía de tórax de niños hospitalizados por infección causada por virus influenza A (H1N1)". *Rev Chil Enf Respir.* 2010. 26:129-133.
47. Chan YL, Liao HC, Tsay PK, Chang SS, Chen JC, Liaw SJ. "C-reactive protein as an indicator of bacterial infection of adult patients in the emergency department". *Chang Gung Med J.* 2002. 25(7): 437-445.
48. Prasad R. "Community Acquired Pneumonia: Clinical Manifestations". *J Assoc Physicians India.* 2012. 60 suppl: 10-12.
49. Murin S, Smith Bilello K. "Respiratory tract infections: Another reason not to smoke". *Cleve Clin J Med.* 2005. 72(10): 916-920.
50. Vilar J, Domingo ML, Soto C, Cogollos J. "Radiology of bacterial pneumonia". *Eur J Radiol.* 2004. 51(2):102-113.
51. Mahony JB, Blackhouse G, Babwah J, Smieja M, Sonya B, Chong S, *et al.* "Cost analysis of multiplex PCR testing for diagnosing respiratory virus infections". *J Clin Microbiol.* 2009. 47(9): 2812-2817.
52. Dundas NE, Ziadie MS, Revell PA, Brock E, Mitui M, Leos NK, *et al.* "A Lean Laboratory: Operational simplicity and cost effectiveness of the Luminex xTAG™ Respiratory Viral Panel. *J Mol Diagn.* 2011. 13:175-179.

## ANEXOS

**Anexo 1.-** Certificado de aprobación del comité de bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, del Servicio de Salud Metropolitano Sur y Oriente y consentimiento informado.



UNIDAD DE PREVENCIÓN DE RIESGOS & BIOSEGURIDAD  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CHILE

Santiago, June 24<sup>th</sup> 2011.-

To:  
**FONDECYT PROGRAM  
PRESENT**

Dear Sirs

The Risk Prevention and Biosafety Unit of the Faculty of Medicine, University of Chile hereby certifies that it received for its study, from responsible investigator, Dra. Vivian Rose Luchsinger Farias, the project proposal titled as **"SEVERITY OF COMMUNITY- ACQUIRED PNEUMONIA BY VIRUSES AND / OR S. PNEUMONIAE IN ADULTS AND THEIR RELATIONSHIP WITH IMMUNOLOGICAL MARKERS (CYTOKINES, LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS AND TRANSCRIPTIONAL PROFILES OF IMMUNE RESPONSE GENES)"**. Laboratory of Virology, Program of Virology, Biomedical Sciences Institute (ICBM), Faculty of Medicine, University of Chile, which satisfies all basic Biosafety requirements to be carried out. It also meets every demand established on manuals: CONICYT "Biosafety 1<sup>st</sup> edition 1994" and "Manual of Safety Standards, 2<sup>nd</sup> edition 2008", "Center for Control and Prevention of Diseases, CDC, 4<sup>th</sup> edition, "Safety in Laboratories Manual", World Health Organization WHO, Geneva 2005, reasons why this unit approves its eventual execution.

Responsible investigator, Dra. Vivian Rose Luchsinger Farias, is committed to meet all biosafety standards established in the formerly cited manuals and those established in the Internal Regulations for the functioning of the Laboratories, Risk Prevention and Biosafety Unit, Faculty of Medicine, University of Chile. Concomitantly he is responsibly for the proper complying of established biosafety regulations, of all participants of the aforementioned project.

  
Receiving acknowledgement: **Dra. Vivian Rose Luchsinger Farias**

  
**Professor Mónica Acuña Patzke**  
Risk Prevention and Biosafety Unit Director



\* Attached Annex IX.1 Fondecyt Project

c.c.

- Dean, Doctor, Cecilia Sepúlveda C.
- Vice-Dean, Dr. Ennio Vivaldi
- Biomedical Sciences Institute Director ICBM, Dr. Benjamín Suárez
- Responsible Investigator, Dra. Vivian Rose Luchsinger Farias
- Archives

Av. Independencia 1027, Teléfono (56)-2 9786564, e-mail: [biosegur@med.uchile.cl](mailto:biosegur@med.uchile.cl) [upr@med.uchile.cl](mailto:upr@med.uchile.cl)



**Comité Ético Científico**

**MEMO N°: 292/ 2011**

MAT.: Se remite resultado evaluación  
Proyecto de Investigación que indica.

**Santiago, 09 de Agosto de 2011**

**DRA. VIVIAN LUCHSINGER F.  
INVESTIGADOR PRINCIPAL  
PROYECTO DE INVESTIGACION  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
PRESENTE**

Informo a usted, que la Directiva del Comité Ético Científico (CEC) del Servicio de Salud Metropolitano Sur (SSMS), tomó conocimiento y revisó en sesión del 26 de Julio y 9 de Agosto del 2011, los antecedentes del Proyecto de Investigación: “Gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos y su relación con marcadores inmunológicos (citoquinas, sub-poblaciones de linfocitos y expresión de genes de la respuesta inmune)”, a desarrollarse en el Hospital Dr. Lucio Córdova , remitidos mediante carta recepcionada por este CEC el 11 de Julio 2011, lo siguiente:

- I. Antecedentes revisados y evaluados en sesión del CEC del 26/07/2011.(Se remite listado de asistencia).
  1. Carta de intención a la Presidenta del Comité, Sra. Verónica Rivera.
  2. Carta dirigida al Director del Servicio de Salud Metropolitano Sur, Dr. Juan Manuel Toso L., fechada el 05/07/11.
  3. Carta del Director del Hospital Dr. Lucio Córdova, Dr. Claudio Farah Meza, para la realización del estudio, fechado el 5 de Julio 2011.
  4. Carta certificación financiamiento de insumos para toma de muestra de los pacientes, firmada por el Investigador Principal Dra. Vivian Luchsinger F., fechada el 05/07/11.
  5. Consentimiento Informado de pacientes, Dra. Vivian Luchsinger F., versión 1.0 del 01/07/2011, (3 copias en español).
  6. Proyecto Concurso FONDECYT Regular 2012, Versión N° 1.0, fechado el 01/07/2011, (en español 2 copias).
  7. Ejemplar FONDECYT Research Funding Competition 2012 Regular Competition (En inglés).



II. Los miembros del CEC el 9 de Agosto del 2011, determinan que **el Protocolo no presenta reparos Éticos y lo aprueban**, por lo tanto se remite firmado, timbrado y fechado lo siguiente:

- Consentimiento Informado de pacientes, Dra. Vivian Luchsinger F., versión 1.0 del 01/07/2011.

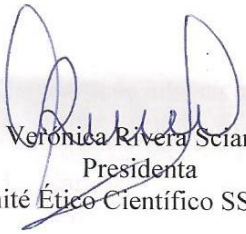
Además, se remite Certificado de Buenas Prácticas Clínicas del CEC.

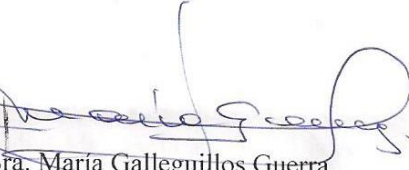
Solicitamos a usted, comunicar a este Comité el inicio de la ejecución del estudio e informar lo siguiente:

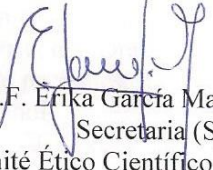
- Estado de avance y los eventos observados asociados y no asociados con el estudio
- Rechazo de participación de los sujetos
- Número de sujetos enrolados
- Cualquier antecedente importante que se observe durante la ejecución de la investigación.

Cabe señalar que los efectos adversos presentados graves, en su Centro, deben ser notificados dentro de las 48 horas de haber sido detectados, se adjunta Memo. N° 60/2010

Sin otro particular, saluda Atentamente a usted,

  
Q.F. Verónica Rivera Sciaraffia  
Presidenta  
Comité Ético Científico SSMS

  
Sra. María Galleguillos Guerra  
Vice-Presidenta (S)  
Comité Ético Científico SSMS

  
Q.F. Erika García Madrid  
Secretaria (S)  
Comité Ético Científico SSMS

SERVICIO DE SALUD  
METROPOLITANO SUR  
PRESIDENTE  
COMITÉ ETICO  
CIENTIFICO

C.c.

- Archivo CEC SSMS.
- Oficina de Partes SSMS.



Servicio de Salud Metropolitano Oriente  
Comité de Ética Científico

### **PROTOCOLO DE APROBACIÓN DE PROYECTOS CLÍNICOS**

Con fecha 25 de Junio de 2013, el CEC del S.S.M. Oriente analizó y aprobó el siguiente documento:

- Consentimiento Informado de Pacientes,  
Versión 3.0 Abril 2013, firmado por el CEC del S.S.M. Oriente el 25 de Junio de 2013;

destinado al Proyecto FONDECYT Regular 2012, titulado:

“Gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos y su relación con marcadores inmunológicos (citoquinas, subpoblaciones de linfocitos y expresión de genes de la respuesta inmune)”;

y que conduce actualmente la Dra. Vivien Luchsinger Farías como Investigador Principal en la Facultad de Medicina – División CS. Médicas Norte- Instituto de de Ciencias Biomédicas- Programa de Virología e incorporará como Centro de Investigación a la Clínica Santa María, con la colaboración de los siguientes Investigadores:

- Dr. Mauricio Ruiz, Unidad de Enfermedades Respiratorias
- Dr. Francisco Arancibia, Unidad de Enfermedades Respiratorias.

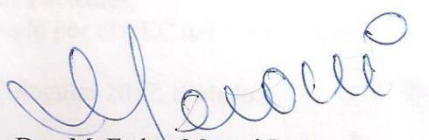
Tomó conocimiento de:

- Carta de la Dra. Vivien Luchsinger Farías Profesor Adjunto Programa de Virología fechada el 14 de Junio de 2013;
- Carta de la Dra. Marcela Paredes, Presidenta Comité de Ética Científica de la Clínica Santa María, dirigida al Dr. Pedro Peña G. Jefe de Servicio de Enfermedades Respiratorias Clínica Santa María, de fecha 14 Junio 2013.

Envío la nómina de los miembros permanentes del CEC del S.S.M. Oriente que participaron del análisis y aprobación del documento antes señalado:

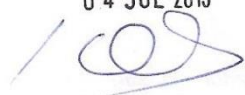
Dr. Rómulo Melo Monsalve	Neurocirujano	Inst. Nac. de Neurocirugía
Dra. M.Esther Meroni Layes	Geriatra (Secretaria)	Inst. Nac. de Geriatria
Dr. Jorge Plasser Troncoso *	Cirujano- Oncólogo	Hospital del Salvador
Dr. Manuel Sedano Lorca	Gineco-Obstetra	Hospital Dr. Luis Tisné
Dr. Ricardo Sepúlveda	Broncopulmonar	Inst. Nac. del Tórax
Dr. Luis Soto Román	Utiólogo	Inst. Nacional del Tórax
Dr. Andrés Stuardo Luengo	Neurólogo( Presidente)	Hospital del Salvador
Sra. Elena Núñez Migone	Enfermera ( Coordinadora)	No institucional
Sra. Angélica Sotomayor	Abogado	No institucional
Sr. Hugo Gutiérrez Guerra	Miembro de la Comunidad	No institucional

\*: No participó en la discusión

  
Dra. M. Esther Meroni Layes  
Secretaria



CLINICA SANTA MARIA  
COMITE DE ETICA CIENTIFICA  
04 JUL 2013



Santiago, 25 de Junio de 2013





## CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PACIENTES

Versión 3.0 Mayo 2012

### PROYECTO FONDECYT REGULAR 2012

"GRAVEDAD DE LA NEUMONIA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD EN ADULTOS Y SU RELACIÓN CON MARCADORES INMUNOLÓGICOS (CITOQUINAS, SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS Y EXPRESIÓN DE GENES DE LA RESPUESTA INMUNE)"

Registro N°-----

**Investigador Responsable:**

Dra. Vivian Luchsinger F.  
Programa de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile  
Teléfonos: 9786317



Le estamos invitando a participar en el Proyecto de Investigación "Gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos y su relación con marcadores inmunológicos (citoquinas, subpoblaciones de linfocitos y expresión de genes de la respuesta inmune)".

16 MAYO 2012

La neumonía adquirida en la comunidad es una infección del pulmón frecuente en el adulto, que puede ser más o menos grave. Esto depende de las enfermedades que tenga el paciente, de su edad y de la forma en que se defiende de la infección. Esta puede ser producida por bacterias y por virus, que se pueden detectar por distintos métodos.

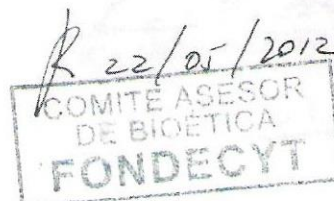
Solicitamos su ayuda y participación en este proyecto porque queremos estudiar si la respuesta de defensa del adulto frente a la infección es distinta según la gravedad de la enfermedad y si depende o no del agente infeccioso que causa la neumonía adquirida en la comunidad.

Se estudiarán 300 adultos con neumonía adquirida en la comunidad del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, del Hospital Lucio Córdova y del Instituto Nacional del Tórax, en Santiago, y 20 adultos sin síntomas ni enfermedades respiratorias, que voluntariamente deseen participar.

Si Ud. acepta participar en este estudio, tomaremos una vez al ingresar al estudio:

- una muestra de 8 ml de sangre (1 cucharadita y media de té) para estudiar las concentraciones de citoquinas, células de la respuesta defensiva y los patrones de expresión de los genes;
- una muestra de orina para detectar la presencia de las bacterias *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) y *Legionella*.
- Una muestra respiratoria para estudiar la presencia de bacterias y virus y para estudiar las concentraciones de citoquinas. Estas muestras se estudiarán en el Programa de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

La participación en este estudio no constituye ningún riesgo extraordinario. El procedimiento para obtener la muestra de sangre es el mismo que se realiza para otros exámenes de sangre. Es habitual que este procedimiento cause dolor, pero es de corta



duración. La obtención de la muestra de orina y de secreción respiratoria no tiene riesgos. La muestra respiratoria se obtiene mediante un lavado de la nariz, con un líquido estéril. En caso de que su médico tratante considere necesario tomar otro tipo de muestra respiratoria, como el lavado bronquioalveolar, le solicitamos su consentimiento para utilizar parte de esta muestra en este estudio. Cualquier efecto que Ud. considere que pueda derivarse de estos procedimientos, comuníquese a la Dra. Vivian Luchsinger en el teléfono 9786102.

16 MAYO 2012



El resultado del estudio de virus y bacterias se le comunicará a su médico tratante. Participar en este estudio no obtendrá ninguna compensación económica. La participación en este estudio es completamente libre, voluntaria y gratuita y no representa ningún costo extra para Ud. ni para su sistema previsional.

Las muestras solicitadas para este proyecto sólo serán utilizadas en este estudio y serán eliminadas después del término del proyecto. Toda la información derivada de su participación será confidencial, lo que incluye el acceso a la información sólo de los investigadores. Cualquier comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Su privacidad será protegida porque sus datos y muestras no serán identificados con su nombre, sólo con un código.

Usted se puede retirar del estudio en cualquier momento, incluso después que la muestra haya sido tomada. En este caso, la muestra será destruida y no podrá ser utilizada en este ni en ningún otro estudio. Si usted no desea participar en este estudio, no habrá ninguna consecuencia para usted.

Si tiene dudas sobre este estudio o considera que puede presentar molestias por participar en él, Ud. puede llamar a la Dra. Vivian Luchsinger F., teléfono: 9786317. Esta consulta será absolutamente gratuita.

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética Científica y de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Cualquier consulta llamar al teléfono 9789008.

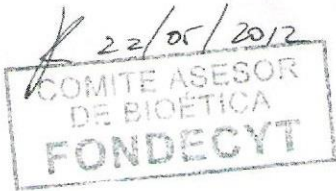
Después de haber leído y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "Gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos y su relación con marcadores inmunológicos (citoquinas, subpoblaciones de linfocitos y expresión de genes de la respuesta inmune)".

En este momento firmo dos ejemplares y recibo una copia de este documento que quedará en mi poder

----- Firma

----- Firma

----- Firma



**Anexo 2.** Criterio de estratificación de la gravedad de los pacientes.

**Estratificación de la enfermedad según criterio PORT:**

Características del paciente	Puntos
<i>Edad</i>	
Hombre	_____ (años)
Mujer	_____ (años - 10)
Cuidado en casa	+10
<i>Enfermedades coexistentes</i>	
Enfermedad neoplásica	+30
Falla hepática	+20
Falla cardíaca congestiva	+10
Falla cerebrovasculares	+10
Falla renal	+10
<i>Hallazgos por examen físico</i>	
Estado mental alterado	+20
Tasa de respiración $\geq 30$ respiraciones/min	+20
Presión sanguínea sistólica $<90$ mm Hg	+20
Temperatura $<35$ ° C (95 ° F) o $\geq 40$ ° C (104 ° F)	+15
Pulso $\geq 125$ latidos/min	+10
<i>Hallazgos radiográficos y de laboratorio (si se realiza estudio)</i>	
pH arterial $<7.35$	+30
Nitrógeno uréico sanguíneo $\geq 30$ mg/dL	+20
Sodio $<130$ mmol/L	+20
Glucosa $>250$ mg/dL	+10
Hematocrito $<30\%$	+10
Presión parcial de O <sub>2</sub> arterial $<60$ mm Hg o saturación de O <sub>2</sub> $<90\%$	+10
Efusión Bilateral pleural	+10

**Puntos totales = edad + corrección de sexo + suma de los puntajes encerrados**

**Clasificación según PSI**

Clase	Puntos	Mortalidad	Terapia sugerida
Clase I	$< 51$	0.1%	Antibióticos orales en casa
Clase II	(51-70)	0.6%	Antibióticos orales en casa – si vomita/poco confiable, estadía corta
Clase III	(71-90)	0.9%	Antibióticos orales en casa – si vomita/poco confiable, estadía corta
Clase IV	(91-130)	9.5%	Hospitalización + antibióticos intravenosos
Clase V	$>130$	26.7%	Hospitalización (UCI) + antibióticos intravenosos

### Anexo 3. Criterios de Análisis para IF:

**1.- Inmunofluorescencia indirecta clásica:** Su análisis se basa en 2 parámetros: cantidad de células e intensidad de la fluorescencia. Para medir la cantidad de células, se buscan células con granulado verde manzana tanto en núcleo (adenovirus), citoplasma (VRS, parainfluenza y metapneumovirus) o ambos (influenza), debiendo distinguir la fluorescencia por uniones inespecíficas de los anticuerpos. Una muestra se considera positiva, si se encuentran al menos 3 células con fluorescencia intensa (+++).

**2.- Inmunofluorescencia indirecta rápida:** Los frotis se observan en el microscopio de fluorescencia con un aumento de 20X, de acuerdo a los siguientes parámetros: se considera una muestra correcta si se encuentran al menos 2 células epiteliales columnares por campo; la muestra se considera invalida si existen <20 células por campo. Para determinar la presencia de virus, se consideran los siguientes parámetros:

<b>Virus</b>	<b>Parámetro</b>
Influenza A	Fluorescencia amarilla citoplasmática y/o nuclear.
Influenza B	Fluorescencia verde manzana citoplasmática y/o nuclear.
VRS	Fluorescencia amarilla citoplasmática.
Metapneumovirus	Fluorescencia verde manzana citoplasmática.
Parainfluenza	Fluorescencia amarilla citoplasmática.
Adenovirus	Fluorescencia verde manzana citoplasmática y/o nuclear.

**Anexo 4.** Parámetros de programación y análisis de RT-RCP en tiempo real multiplex:

**1.- Programa de ciclado de la RT-RCP multiplex de Panel Viral e Influenza A/B.**

Protocolo	Programa		
	N° de Ciclos	Temperatura	Tiempo
<i>RT-RCPtr Panel Viral y Flu A/B</i>	Mantención	95°C	15 min
	10	95°C	10 seg
		<b>54°C</b>	<b>25 seg</b>
		<b>72°C</b>	<b>25 seg</b>
	35	95°C	10 seg
		<b>54°C</b>	<b>30 seg*</b>
		<b>72°C</b>	<b>25 seg</b>

\*= Adquisición de fluorescencia por el equipo.

**2.- Parámetros de análisis de la corrida de los RT-RCPtr multiplex de Panel Viral e Influenza A/B.**

	Canal		
	<i>Verde</i>	<i>Amarillo</i>	<i>Naranja</i>
<b>Umbral</b>	0,1	0,1	0,1
<b>Remoción de la línea basal</b>	0%	5% - 10%	5% - 10%
<b>Optimización del Gain</b>	5 FI – 10 FI	4 FI – 8 FI	4 FI – 8 FI

## Anexo 5. Parámetros de programación y análisis del Luminex®:

### 1.- Volúmenes de reactivos para la mezcla maestra de RT-PCR Multiplex.

Reactivos	Volúmenes para 1 muestra
Agua libre de DNasas y RNasas para xTAG®	1.3 µl
Tampón OneStep para xTAG® 5x	4 µl
dNTP para xTAG®	1.1 µl
Mezcla base para xTAG® RVP FAST v2	2 µl
Enzimas OneStep para xTAG®	1.6 µl

### 2.- Programas de temperatura del RT-RCP Multiplex:

Protocolo	N° de Ciclos	Temperatura	Tiempo
<i>RT-PCR xTAG® RVP FAST v2</i>	1	50°C	20 min
	1	95°C	15 min
	36	95°C	30 seg
		59°C	30 seg
		72°C	30 seg

**3.- Interpretación de resultados:** El análisis informa los resultados como: POS= virus detectado; NEG= virus no detectado; “No call”= sin dianas, arrojando un error de procedimiento. Para la detección de virus Influenza A, se analizan por separado un gen de la matriz común para las 3 cepas A y secuencias conservadas del gen de la hemaglutinina para las cepas H1, H3 y H1N1, lo que permite detectar la presencia de distintos tipos de cepas de Influenza A en la misma muestra. El análisis se informa como:

Resultado	Significado
H1 D	Se detecta el subtipo H1 (estacional) de la Gripe A y el gen matriz de la Gripe A.
H3 D	Se detecta el subtipo H3 de la Gripe A y el gen matriz de la Gripe A.
2009 H1N1 D	Se detecta el subtipo H1N1 2009 de la Gripe A y el gen matriz de la Gripe A.
Ut D	Gripe no clasificable en tipo, es decir, se detecta un gen matriz de la Gripe A, pero ninguno de los subtipos H1N1 2009, H1 (estacional) y H3.
No Call (Sin dianas)	Fallo en uno o más parámetros/controles del análisis.

También se detecta la presencia de dianas control como PRES; la falta de detección de alguno de los controles como ABS; y la inhabilidad de poder determinar la presencia de alguno de los controles, señalando errores en el procedimiento o no cumplimiento de los criterios de análisis, como “No call” (Sin dianas).

**4.-Valores umbrales de fluorescencia aplicados en la interpretación de los resultados obtenidos por Luminex® según virus.**

<b>Virus</b>	<b>Valores del umbral (MFI)</b>
Flu A matrix	300
Flu A H3	250
Flu A H1	450
Flu A H1N1 2009	250
Flu B	300
VRS A	120
VRS B	150
AdV	150
BoV	300
MPVh	200
RVh	300
Pi 1	150
Pi 2	300
Pi 3	150
Pi 4	200
CoV 229E	300
CoV HKU1	300
CoV NL63	200
CoV OC43	300

**Anexo 6.** Datos demográficos, clínicos y de evolución obtenidos de las fichas clínicas de cada paciente.

<i>a) Datos demográficos y Antecedentes médicos</i>	<i>b) Condición de ingreso</i>	<i>c) Parámetros de laboratorio y evaluación radiológica</i>	<i>d) Tratamiento y evolución</i>
Total pacientes	Sepsis foco pulmonar	Frecuencia respiratoria	Tratamiento antibiótico, antiviral o anti-tuberculosis
Edad	Insuficiencia respiratoria	Pulso	Hipotensión
Genero	Infección tracto urinario (ITU)	Presión arterial	Shock séptico
Procedencia	Cardiopatía coronaria	Temperatura	Tratamiento inadecuado
Vacuna anti-influenza	Desnutrición	Hematocrito	Necesidad de ventilación mecánica
Alcoholismo	Clasificación de grupo de riesgo (FINE y ATS)	Glóbulos blancos	Falla renal aguda
Tabaquismo (cajetillas/año)	Puntaje FINE	% de Linfocitos y Neutrófilos	Insuficiencia respiratoria
Fibrosis pulmonar/enfisema	Estado de gravedad	Plaquetas	Derrame pleural complicado y no complicado
Diabetes	Síntomas de NAC (tos, expectoración, dolor pleurítico, sospecha de aspiración y desorientación)	Velocidad de sedimentación globular (VHS)	Alteración de conciencia
Hipertensión arterial (HTA)	Días de evolución	Proteína C reactiva (PCR)	Falla hepática
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	Antibióticos previos	Nitrógeno ureico en sangre (NUS o BUN)	Progresión radiológica
Asma	Detección de <i>S. pneumoniae</i> por BINAX® y	Creatinina	Oxigenoterapia



	hemocultivo		
Insuficiencia cardiaca		pH	
Daño hepático		Sodio plasmático	
Insuficiencia renal		% saturación de O <sub>2</sub>	
Neoplasia		Presión arterial de O <sub>2</sub>	
Enfermedad neurológica		Lactato deshidrogenasa (LDH)	
Residencia en asilo		Presión de CO <sub>2</sub>	
		Evaluación radiológica (patrón, derrame pleural, lóbulos comprometidos y pulmón más comprometido)	