

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***DETECCIÓN DE CYCLOVIRUS EN MUESTRAS RESPIRATORIAS
DE NIÑOS Y ADULTOS CHILENOS***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en
Bioquímica Clínica por:**

ERNESTO TORRES FUENZALIDA

Directora de Tesis: Dra. Vivian Luchsinger F.

SANTIAGO-CHILE

Enero 2018

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

ERNESTO TORRES FUENZALIDA

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 en el examen público rendido el día 25 de enero de 2018.

Director de Tesis:

Dra. Vivian Luchsinger F.

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Javier Puente

Dra. Nicole Tischler

Dr. Sergio Alvarez

TABLA DE CONTENIDOS

Agradecimientos	4
Financiamiento.....	5
Índice de Figuras.....	6
Índice de Tablas	7
Resumen	8
Abstract	9
Introducción.....	11
Hipótesis	14
Objetivos	15
<i>I.- Objetivo General.....</i>	15
<i>II.- Objetivos específicos.....</i>	15
Materiales y Métodos.....	16
Resultados	25
Discusión	40
Conclusiones.....	44
Bibliografía.....	45

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Vivian Luchsinger por su disposición en apoyarme en la formulación, desarrollo y culminación de mi proyecto de tesis, particularmente en la redacción de este documento. También agradezco a los dos funcionarios del laboratorio de Virología del ICBM, Cristian Moreno y Dina Silva, por su buena disponibilidad en acogerme en el laboratorio y a las estudiantes de doctorado del laboratorio Yara Prades y Andrea Garces por la ayuda técnica aportada durante el transcurso de esta tesis. Especialmente quiero reconocer los aportes fundamentales realizados por el profesor BQ. Luis Lizama, quien siempre me acogió mis dudas y prestó apoyo para resolverlas.

No puedo dejar de agradecer a la Dra. Lissette Valenzuela quien me facilitó acomodar mi jornada laboral además de prestarme ayuda cada vez que le presente alguna inquietud sobre la forma de enfrentar mi investigación de magister.

Finalmente agradezco a mis familiares y muy particularmente a mi pareja Deisy Guzman quien me soportó durante los casi tres años en que estuve realizando mis estudios de postgrado, especialmente el año 2017 que estuvo lleno de desafíos fuera del ambiente académico del magister. También tengo que agradecerle por dar a luz a nuestro primer hijo, Vicente Ernesto Torres Guzman, un precioso y saludable bebé que llegó a impregnar de alegría nuestra relación y entorno familiar.

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 con recursos del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) otorgados al proyecto “Detección y genotipificación de cyclovirus en niños y adultos con y sin enfermedad digestiva, respiratoria y/o neurológica aguda”.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del plasmidio pUCIDT-CyCV, del genoma completo de la cepa chilena de cyclovirus, posición de hibridación y tamaño de amplicón en la cepa chilena de cyclovirus 7046A.

Figura 2: Distribución de 105 adultos con NAC estudiados según mes de enrolamiento y detección de CyCV, Santiago, 2012-2015.

Figura 3: Distribución de 101 niños con ERA estudiados según la semana de enrolamiento y detección de CyCV, Santiago, junio-julio 2016.

Figura 4: Corrida electroforética de productos de PCR en tiempo real purificados de adultos con NAC en gel de agarosa al 2%.

Figura 5: Alineamiento entre la secuencia de consenso de CyCV proveniente de una muestra de adulto con NAC y la cepa chilena 7046A de CyCV.

Figura 6: Corrida electroforética de los productos de PCR obtenidos de la amplificación de pUCIDT-CyCV con la enzima Kapa PROBE FAST qPCR en gel de agarosa al 2%.

Figura 7: Corrida electroforética de los productos de PCR inversa obtenidos de la amplificación de pUCIDT-CyCV con la enzima Kapa HiFi PCR en gel de agarosa al 2%.

Figura 8: Corrida electroforética de los productos de PCR inversa obtenidos de la amplificación de pUCIDT-CyCV con partidores iFw/iRv con la enzima Kapa HiFi PCR en gel de agarosa al 2%.

Figura 9: Corrida electroforética de los productos de PCR inversa obtenidos de la amplificación de pUCIDT-CyCV con partidores iFw/iRv con la enzima Kapa HiFi PCR en gel de agarosa al 2%.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Condiciones para la amplificación del genoma completo de CyCV con la enzima ACCUZYME™ DNA Polymerase (Bioline).

Tabla 2: Condiciones para la amplificación del plasmidio pUCIDT-CyCV con la enzima Kapa PROBE FAST qPCR (Kapa Biosystems®).

Tabla 3: Condiciones para la amplificación del plasmidio pUCIDT-CyCV con la enzima Kapa HiFi PCR (Kapa Biosystems®).

Tabla 4: Datos demográficos y detección de agentes infecciosos en adultos con NAC de acuerdo a la detección de cyclovirus.

Tabla 5: Datos demográficos y antecedentes clínicos en adultos sin sintomatología respiratoria de acuerdo a la detección de cyclovirus.

Tabla 6: Datos demográficos y detección de agentes infecciosos en niños con enfermedad respiratoria aguda de acuerdo a la detección de cyclovirus.

Tabla 7: Datos demográficos y antecedentes clínicos de los niños sin sintomatología respiratoria de acuerdo a la detección de cyclovirus.

Tabla 8: Distribución de las muestras positivas para cyclovirus según secuenciación y grupo etario.

Tabla 9: Resultados de amplificación de pUCIDT-CyCV con las distintas ADN polimerasas de alta fidelidad.

Tabla 10: Comparación de los antecedentes clínicos de los adultos con NAC de acuerdo a la detección de cyclovirus.

RESUMEN

Cyclovirus (CyCV) es un agente infeccioso, recientemente descubierto, con un pequeño material genético de DNA circular de hebra simple que codifica para una proteína asociada a la replicación (Rep) y otra a la capsida viral (Cap). Infecta diversos organismos eucariontes, incluyendo humanos, donde se han descrito variantes genéticas con prevalencia de hasta 15,7% en niños con parálisis flácida aguda. El genoma del CyCV se ha detectado en distintas muestras biológicas de población enferma y asintomática, desconociéndose su rol patogénico. En Chile, sólo se ha estudiado en aspirado nasofaríngeo de niños con enfermedad respiratoria aguda baja (ERA), detectándose en el 3,3% y describiéndose una nueva cepa viral denominada CyCV-ChileNPA. El objetivo de esta tesis fue detectar y genotipificar variantes de la cepa chilena de cyclovirus en niños y adultos, con y sin enfermedad respiratoria.

En 101 menores de un año hospitalizados por ERA, 105 mayores de 18 años hospitalizados por neumonía adquirida en la comunidad (NAC), 104 niños y 104 adultos sin sintomatología respiratoria, por al menos un mes previo al enrolamiento, cuyas muestras respiratorias se obtuvieron entre 2012-2016 en Santiago, se amplificó un fragmento del gen Rep de cyclovirus mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con el reactivo Kapa PROBE® a partir de extractos de ácidos nucleicos totales obtenidos con el kit MasterPure (Epicenter®). Los amplificados se purificaron con el kit GEL/PCR Purification (FAVORGEN®) y se secuenciaron en Macrogen® (Corea). Las muestras secuenciadas se alinearon con BLAST y con el programa BioEdit® generándose una secuencia consenso. Se detectó CyCV en un 54,3% (57/105) de los adultos NAC; 17,3% (18/104) en adultos sin sintomatología respiratoria; 14,9% en niños con ERA (15/101) y en 48,1% (50/104) de niños sin ERA. Los 79 (84%) amplificados de 149pb tuvieron un 99% de identidad con la secuencia nucleotídica correspondiente de la proteína Rep de CyCV-ChileNPA.

Por primera vez se detecta CyCV en muestra respiratoria de adultos, con una frecuencia significativamente mayor en pacientes con NAC que en adultos sin enfermedad respiratoria, lo que sugeriría la presencia de este virus en adultos con enfermedad respiratoria. Por otra parte, la detección en niños fue mayor a la publicada y similar entre casos con y sin ERA.

ABSTRACT

“CYCLOVIRUS DETECTION IN RESPIRATORY SAMPLES OF CHILEANS CHILDREN AND ADULTS”

Cyclovirus (CyCV) is a recently discovered infectious agent, with little DNA simple strand genetic material that codifies for a protein associated to the replication (Rep) and to the viral capsid (Cap). It infects different eukaryotic organisms, including humans, where it has been described genetic variants with up to 15,7% prevalence in children with acute flaccid paralysis. CyCV genome has been detected in different biological samples in illness and asymptomatic population, with an unknown pathogenic role. In Chile, it has been studied in nasopharyngeal aspirate only in children with lower respiratory tract infections, detected in 3,3% and being described a new viral strain named CyCV-ChileNPA. The objective of this thesis was to detect and genotype the Chilean cyclovirus strain variants in children and adults, with and without respiratory infections.

In 101 children under 1 year hospitalized by acute respiratory infection (ARI), 105 adults over 18 years hospitalized by community-acquired pneumonia (CAP), 104 children and 104 adults without respiratory symptomatology, for at least 1 month prior to enrollment, whose samples were obtained between 2012 and 2016 in Santiago, a fragment of the Rep gene of cyclovirus was amplified through a chain reaction of the polymerase in real time using Kapa PROBE® reagent from total nucleic acid extracts obtained with MasterPure kit (Epicenter®). The amplifiers were purified with the GEL/PCR Purification kit (FAVORGEN®) and sequenced in Macrogen® (Corea). The sequenced samples were aligned with BLAST and using BioEdit® program, generating a consensus sequence. CyCV was detected in 54,3% of adults with CAP; 17,3% (18/104) in adults without respiratory symptomatology; 14,9% in children with ARI (15/101) and 48,1% (50/104) children without ARI. All of the 79 amplified (84%) of 149pb had 99% of identity with nucleotide sequence corresponding to CyCV-ChileNPA Rep protein.

It is the first time that CyCV is detected in respiratory samples in adults, with a significantly higher frequency in patients with CAP than in adults without respiratory

disease, and it would suggest the presence of this virus in adults with respiratory disease. On the other hand, the detection in children was higher than the previously published and similar to cases with and without ARI.

INTRODUCCION

Cyclovirus (CyCV) es un género recientemente propuesto de la familia *Circoviridae*. Estos son virus que carecen de manto y poseen un pequeño material genético circular de una sola hebra de ácido desoxirribonucleico (ssDNA) de aproximadamente 2kb (1). Este agente presenta en su estructura molecular dos marcos de lectura abierta (ORF) que codifican para una proteína asociada a la replicación viral (Rep) y una proteína de la capsida viral (Cap) orientadas en posiciones opuestas (1). El segmento de material genético viral que codifica para la proteína Rep se caracteriza por tener un intrón el cual tiene un sitio dador (GT) y un sitio aceptor (AG) que posibilitan el procesamiento (splicing) del genoma. La secuencia aminoacídica de la proteína Rep presenta varios motivos proteicos que posibilitan la replicación viral (FTxNN, YCSKxGX y HLQGxxNL), dos secuencias consenso con alta afinidad de unión al ADN determinante de especificidad (SPDs) y un motivo de unión a helicasa dependiente de ATP (1, 2, 3). Entre ambos extremos 5' de los ORFs se encuentra una región intergénica que incluye una secuencia nonamérica y en su extremo una estructura "stem-loop" que posibilita la replicación viral en un proceso de círculo rodante (rolling-circle). La secuencia nonamérica (TAATACTAT) es altamente conservada entre los distintos cyclovirus y el stem-loop tiene una longitud variable de nucleótidos (entre 9 y 11) dependiendo de la cepa descrita (1, 2, 3). El gen viral que codifica para la proteína Cap se encuentra en una dirección opuesta al gen Rep, tiene una longitud de aproximadamente 680 pb y su principal rol es formar la estructura proteica que envuelve el material genético del cyclovirus (2, 4, 5).

Inicialmente estos virus se detectaron en animales de granja (1), aunque recientes estudios han descrito la presencia del genoma de CyCV en un amplio rango de organismos eucariontes, incluyendo pollos (6); insectos como libélulas (7, 8) y cucaracha de madera (9), y mamíferos como: ardillas (10), gatos (11), murciélagos (6, 12, 13, 14, 15), caballos (16), animales de granja (6) y chimpancés (1). En humanos, también se ha detectado cyclovirus, en diferentes muestras tales como líquido cefalorraquídeo (2, 3, 5), heces (1, 2, 4) y aspirados nasofaríngeos (3).

La primera detección del material genético del cyclovirus en humanos fue publicada por Li y colaboradores (1), en heces de niños paquistaníes, nigerianos y tunecinos con parálisis flácida aguda (PFA), en frecuencias respectivas de 15,8%, 9,4% y 7,3%. También fue detectado en 33,3% (3/9) de niños paquistaníes sanos que tuvieron contacto con los niños enfermos con parálisis flácida aguda, y en 17,1% de quienes no tuvieron este contacto. El análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de los cyclovirus provenientes de las muestras de heces de los niños identificó ocho cepas distintas de virus según la nacionalidad de los niños estudiados: las cepas PK5006, PK5034, PK5510 y PK5222/6197 obtenidas de los niños de Pakistán; la cepa NG12, NG13 y NG14 proveniente de niños nigerianos y la cepa TN18/25, de los tunecinos.

Posteriormente en 2013, Tan Le y colaboradores (2) detectaron CyCV en un 4% de las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes (niños y adultos) vietnamitas con infección aguda del sistema nervioso central de etiología desconocida, siendo el mismo porcentaje detectado en muestras de heces de niños sanos. En este mismo estudio también se describió una nueva cepa de cyclovirus nombrada CyCV-VN. El mismo año, Smits y colaboradores (5) detectaron y secuenciaron el material genético de CyCV en muestras de LCR y suero de pacientes de Malawi con paraplejía de etiología desconocida en un 10% y 15%, respectivamente, caracterizando una nueva cepa de este virus denominada Human cyclovirus VS5700009. Sin embargo, estos resultados fueron recientemente cuestionados por Chan y colaboradores (17) al demostrar que la PCR utilizada presentaba reactividad cruzada con DNA genómico humano.

El 2014 Garigliany y colaboradores (18) demostraron que la variante del virus CyCV-VN se encuentra presente en heces de niños sanos de Madagascar con una prevalencia de 0,73%, separándose de las cepas africanas de CyCV encontradas en Nigeria, Túnez y Malawi. Los autores además descartaron la presencia de cyclovirus en muestras de heces de niños de Ghana, tanto asintomáticos como con diarrea o vómito.

Recientemente, Phan y colaboradores (4) detectaron cyclovirus en muestras de LCR de pacientes (niños y adultos) de Sri Lanka con encefalitis de origen desconocido en dos muestras de un total de 62, obteniendo una prevalencia de un 3,2%. Este nuevo cyclovirus

se denominó CyCV-SL. Además detectaron y secuenciaron material genético de cyclovirus en un conjunto de 5 muestras de heces de Nicaragua con diarrea de origen desconocido, identificando una nueva cepa de este virus denominada CyCV-NI. Ambas cepas de este agente infeccioso se agruparon en un grupo distinto de cyclovirus a los anteriormente descritos.

Últimamente, la cepa de cyclovirus de Vietnam (CyCV-VN) fue detectada en un 13% de muestras de suero de adultos italianos infectados con virus hepatitis B (VHB), virus hepatitis C (VHC) o virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y no fue detectado ni en 79 muestras de suero de pacientes sanos ni en 52 muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con alteraciones neurológicas (19).

El único estudio de detección de cyclovirus en muestras respiratorias (3) se realizó en niños chilenos menores de dos años con infección respiratoria aguda baja. El virus se detectó en cuatro de los 120 aspirados nasofaríngeos estudiados, estableciéndose una frecuencia de infección del 3,3%, similar a la encontrada en otras publicaciones, identificándose una nueva cepa de cyclovirus denominada CyCV-ChileNPA con cuatro variantes genéticas.

Sólo en las publicaciones de Li y cols. (1) y de Macera y cols. (19) se diferencian las frecuencias de detección de este virus en población de niños y de adultos, y sólo Macera detectó cyclovirus en adultos. Como no se dispone de técnicas clásicas (como el aislamiento viral) para el estudio de estos virus, para la detección y análisis de secuencias nucleotídicas o aminoacídicas de las distintas variantes de cyclovirus se han utilizado diversas herramientas de biología molecular (2, 4, 5, 7, 9). Una de las técnicas más utilizadas a nivel mundial es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método basado en la amplificación de un segmento de material genético de forma exponencial, utilizando partidores que flanquean la región de interés y una polimerasa termoestable que posibilita la amplificación del segmento. El proceso se realiza en un termociclador en el cual se programan los cambios de temperaturas y el número de ciclos requeridos para lograr la amplificación (20). La PCR en tiempo real sigue los mismos fundamentos de la PCR convencional, pero utiliza un fluoróforo en la reacción que permite detectar la producción

del amplificado al final de cada ciclo de amplificación, aumentando su sensibilidad y rapidez (21).

Se han detectado diferentes variantes genéticas de cyclovirus en muestras provenientes de distintas regiones del planeta, describiéndose cepas en Vietnam (CyCV-VN), Sri Lanka (CyCV-SL), Nicaragua (CyCV-NI), Pakistán (CyCV1-PK5006), Nigeria (CyCV-NG), Túnez (CyCV-TN) y en Chile (CyCV-ChileNPA), por lo que las cepas virales circulantes presentarían cierta distribución geográfica. El único estudio de comparación entre los genomas de cyclovirus lo realizó Tan le y colaboradores (2) quienes realizaron un alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de Cap y Rep de ocho cepas de CyCV que infectan humanos y ocho cepas de CyCV que infectan animales, encontrando un mayor grado de identidad de las secuencias aminoacídicas entre la proteína Rep de CyCV humano (rango: 43 – 74%) respecto del encontrado en la proteína Cap de CyCV humano (rango: 14 – 48%). No se ha publicado un estudio de comparación entre las cuatro cepas chilenas de CyCV ni de estas comparadas con las secuencias nucleotídicas y/o aminoacídicas de las otras cepas de cyclovirus publicadas.

Pese a la presencia de este virus en diferentes muestras humanas, lo que sugiere una posible infección sistémica, se desconocen los mecanismos de infección, replicación celular, la respuesta inmunológica desarrollada por el organismo frente a este agente y la significancia patológica de la infección con este virus (4). Tampoco está claramente definido el impacto de la infección en niños y en adultos. La información nacional es escasa y limitada a un pequeño número de niños con patología respiratoria. Por lo anterior, fue de interés estudiar la infección por cyclovirus en niños y adultos chilenos, con y sin enfermedad respiratoria.

En base a los antecedentes mencionados se planteó la siguiente hipótesis:

La infección por cyclovirus se relaciona con enfermedad aguda respiratoria en niños y adultos chilenos, detectándose en $\geq 3\%$ de enfermos y no detectándose en asintomáticos. Los genotipos circulantes en Chile corresponden a variantes de la cepa CyCV-ChileNPA descrita previamente en nuestro país.

El objetivo general de esta hipótesis fue determinar la frecuencia de infección por cyclovirus y los genotipos circulantes en muestras respiratorias de niños y adultos chilenos, con y sin enfermedad respiratoria. Los objetivos específicos son los siguientes:

1.- Detectar genoma de cyclovirus en muestras respiratorias de niños y adultos con enfermedad respiratoria aguda y sin sintomatología respiratoria, mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rt-PCR).

2.- Genotipificar los cyclovirus detectados en los individuos chilenos y establecer la epidemiología molecular de las cepas circulantes en Santiago de Chile.

3.- Relacionar los antecedentes clínicos de los pacientes con la presencia de cyclovirus.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Recolección de muestras

Un total de 434 muestras respiratorias de 209 mayores de 18 años y 225 niños menores a dos años, con y sin enfermedad respiratoria, fueron estudiadas según se describe a continuación:

1.1 Muestras de adultos con enfermedad respiratoria: Se estudiaron 105 aspirados nasofaríngeos (ANF) de pacientes hospitalizados por neumonía adquirida en la comunidad (NAC) en el Hospital de Enfermedades Infecciosas Dr. Lucio Córdova o en el Complejo Hospitalario San José, enrolados en el proyecto FONDECYT N° 1121025, dirigido por la Dra. Vivian Luchsinger entre junio 2012 a enero 2015, exceptuando los meses de febrero. A cada paciente se le realizó detección de virus respiratorio sincicial, adenovirus, virus influenza, parainfluenza, coronavirus, bocavirus, enterovirus y metaneumovirus utilizando inmunofluorescencia indirecta (IFI), RT-PCR en tiempo real con el kit Sacace® y kit xTAG RVP Fast assay de Luminex®. También se detectó antígenos de *S. pneumoniae* y *Legionella* con la prueba de inmunocromatografía rápida BinaxNOW® en muestras de orina (Alere®) y *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydophila pneumoniae* mediante PCR utilizando el kit *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydophila pneumoniae* Real-TM® (Sacace Biotechnologies®), siguiendo las especificaciones del fabricante. La gravedad de los pacientes NAC fue evaluada utilizando en índice de severidad de neumonía (PSI) descrito por Fine (25). Estos pacientes voluntariamente aceptaron participar firmando el consentimiento informado con aceptación explícita del uso de las muestras para estudios posteriores. Las muestras se congelaron a -80°C hasta la extracción del material genético.

1.2 Muestras de adultos sin enfermedad respiratoria: Se estudiaron 104 torulados nasofaríngeos (TNF): 22 de adultos enrolados en enero del 2013 para el proyecto FONDECYT N° 1121025 y 82 de adultos enrolados entre septiembre y diciembre del 2016. Ninguno de ellos tenían enfermedad respiratoria por al menos 30 días antes su enrolamiento y sus muestras se almacenaron a -80°C inmediatamente después de su obtención.

1.3 Muestras de niños con enfermedad respiratoria aguda: Se estudiaron 101 aspirados nasofaríngeos de menores de un año con enfermedad respiratoria aguda (ERA), hospitalizados en el Hospital Roberto del Río entre el 15 de junio al 31 de julio del 2016 (semanas 24 a 31), recibidos en el laboratorio clínico del hospital para diagnóstico etiológico por indicación médica. El uso para este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Norte. Las muestras se mantuvieron a -20°C en el laboratorio del hospital y en Virología hasta su posterior procesamiento.

1.4 Muestras de niños sin enfermedad respiratoria: Se estudiaron 124 torulados nasofaríngeos de menores de dos años sin enfermedad respiratoria por al menos 30 días previos al enrolamiento a este estudio. Las muestras fueron recolectadas en el servicio de urgencia del Hospital Clínico Félix Bulnes entre noviembre del 2016 y enero del 2017. Los padres autorizaron voluntariamente la toma de las muestras mediante firma del consentimiento informado. Una vez obtenida la muestra, se mantuvo a 4°C hasta su traslado al laboratorio de Virología donde se congeló a -80°C hasta su posterior procesamiento.

Todos los tutores legales de los menores de dos años y los 82 adultos sin sintomatología respiratoria aceptaron voluntariamente la participación en el proyecto de la Dra. Vivian Luchsinger “Detección y genotipificación de cyclovirus en niños y adultos con y sin enfermedad digestiva, respiratoria y/o neurológica aguda” mediante firma del consentimiento informado. Este proyecto fue aprobado tanto por el Comité de Ética de investigación en seres humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile como por el Comité de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Norte.

2.- Extracción de material genético

Una alícuota de 250 µL de cada muestra respiratoria se utilizó para la extracción de ácidos nucleicos totales con el reactivo MasterPURE Complete DNA and RNA Purification Kit de Epicenter® bajo gabinete de bioseguridad (Heal Force®), adaptando proporcionalmente los volúmenes de reactivos sugeridos en el protocolo del fabricante al volumen señalado de muestra. Los pasos del protocolo incluyen lisis celular con el reactivo 2X T and C Lysis Solution, precipitación de proteínas con el reactivo MPC, precipitación de material genético

con isopropanol y posterior purificación con etanol al 70%. En cada corrida de extracción de material genético se incluyó un control negativo (agua bidestilada libre de nucleasas). Se resuspendieron los ácidos nucleicos en 30 μL de buffer TE 1X. Se cuantificó el material genético de cada muestra utilizando el espectrofotómetro EPOCH (BioTek[®]) obteniéndose concentraciones entre 30 y 650 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (mediana: 173 $\text{ng}/\mu\text{L}$).

3.- Detección de CyCV mediante PCR en tiempo real (rt-PCR)

Se detectó material genético de la cepa chilena de CyCV mediante PCR en tiempo real utilizando sonda de hidrólisis en una alícuota de 250 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de ácidos nucleicos totales obtenidos de las muestras respiratorias. Los partidores y la sonda de hidrólisis de la PCR en tiempo real se diseñaron utilizando como molde la secuencia nucleotídica de la proteína Rep de las cuatro cepas chilenas de cyclovirus y considerando un tamaño de partidores entre 18 a 22 pares de bases (pb) y de sonda entre 22 a 26 pb, un rango de contenido de CG de los partidores entre 35 a 45%, y un tamaño mínimo de amplicón de 100 pb y uno máximo 180 pb. Los partidores y la sonda fueron diseñados con el programa Beacon Designer 8.0[®] (partidor directo (Fw-TR): 5'CTCCTTGTATAGTTTCCAAA3' partidor reverso (Rv-TR): 5'CCGTATCCATATTGAGAAG3' sonda: 5'FAM CTGAATGTCCGTCCTGTGCC BHQ3'). Mediante alineamiento con el programa BLAST se confirmó que las secuencias de partidores y sonda de hidrólisis hibridaban exclusivamente con cyclovirus chileno.

Se realizó la reacción de amplificación en el termociclador Rotor-Gene 6000 (QIAGEN[®]), adicionando a cada tubo de reacción 10 μL del reactivo Kapa PROBE FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal (Kapa Biosystems[®]), 0,6 μL partidores directo y reverso (300nM), 0,6 μL de sonda de hidrólisis (300nM) y el volumen necesario de material genético para una concentración final de 12,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y de agua con grado de biología molecular hasta alcanzar un volumen final de 20 μL . Se incluyeron en cada ronda de amplificación un control negativo (agua bidestilada libre de nucleasas) y un control positivo de 149 pb sintetizado a partir de un fragmento (entre la bases 1267 y 1415) de la secuencia nucleotídica de la proteína Rep de las cuatro cepas chilenas de cyclovirus.

El programa de amplificación utilizado para la corrida en el termociclador contempla una etapa de un ciclo de activación enzimática a 95°C por 180 segundos, 45 ciclos a 95°C por 5 segundos (denaturación), 53°C por 20 segundos (hibridación) y 72°C por 5 segundos (extensión). Los resultados de la PCR se analizaron con el programa Rotor-Gene Q Series versión 1.7. Se consideraron como positivas para CyCV las muestras cuya señal de amplificación se inició en un ciclo (Ct) menor a 40.

La totalidad del volumen del producto de PCR de las muestras positivas fue purificada con el reactivo FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN®), siguiendo el protocolo del fabricante que incluye la unión del material genético a una columna de silica gel, limpieza con solución de lavado con etanol y, finalmente, la elución del producto de PCR con 25 µL de solución de elución. Se realizó una corrida electroforética de los productos de PCR purificados a 100 volts en un gel de agarosa al 2% con el agente intercalante SafeView (NBS biologicals) (dilución 1:20000), y junto con un estándar de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (New England BioLabs®). Aquellos amplificados en los que se observó una única banda de aproximadamente 150 pb se enviaron a secuenciación a MacroGen® (Corea del Sur), donde se secuenciaron con el equipo ABI 3730xl DNA Analyser con los dos partidores utilizados para la PCR.

Con las secuencias que tuvieron un adecuado cromatograma para el análisis (22-24), se generó una secuencia de consenso para cada una de las muestras secuenciadas, usando el programa BioEdit versión 7.2.5, que se alineó con la secuencia de consenso de las 4 variantes genéticas de la cepa chilena de cyclovirus publicadas por Phan y colaboradores (3) (número de acceso a Genbank KF726984.2, KF726985.2, KF726986.2 y KF726987.2) con el programa BLAST.

4.- Amplificación completa del genoma de CyCV mediante PCR inversa (iPCR)

Se estandarizaron las condiciones óptimas para obtener el genoma completo de la cepa chilena de cyclovirus mediante PCR inversa. Para esto, en el vector de clonamiento pUC-IDT, se insertó la secuencia nucleotídica de la cepa 7046A de CyCV-ChileNPA (ADN de doble hebra sintético), sintetizada en IDT®. Luego de la inserción en el vector de clonamiento pUCIDT-AMP (IDT®) se transformaron bacterias *E.coli* competentes

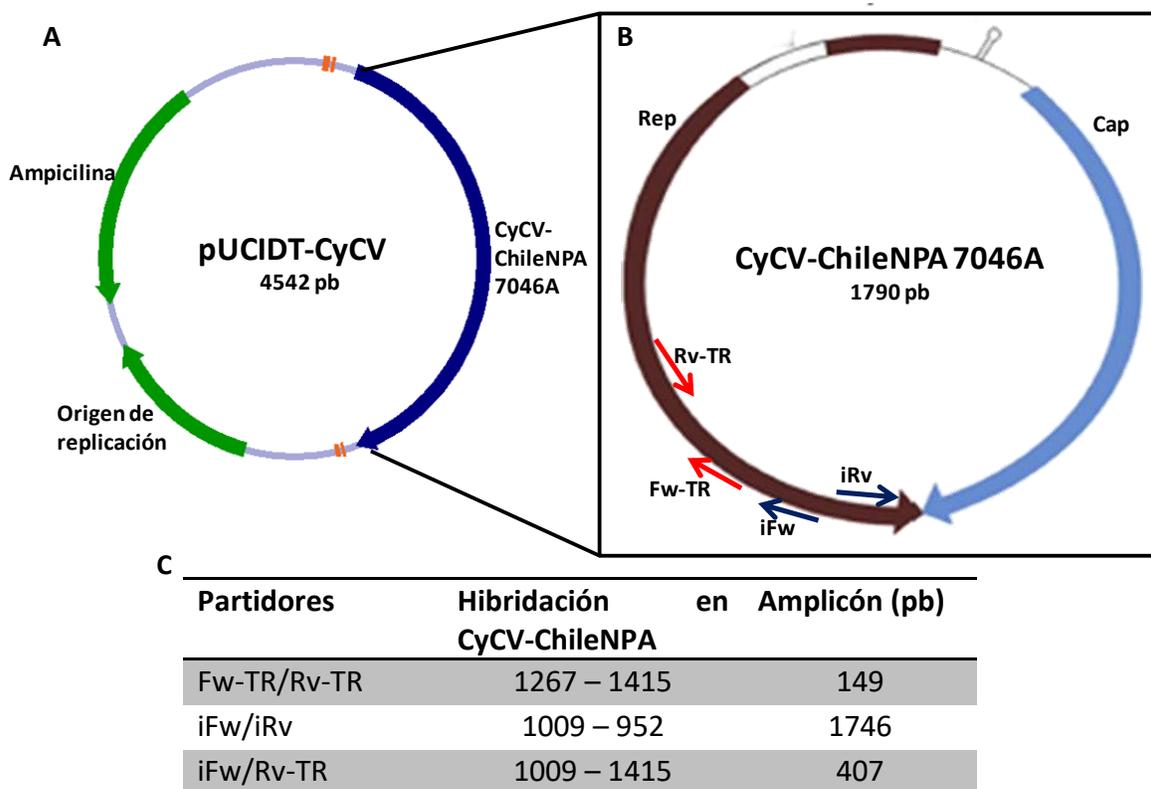
mediante shock térmico y posteriormente se sembraron en placas de agar LB (USBiological®) con ampicilina (concentración final de ampicilina 0,1 mg/mL). Finalmente, se crecieron en medio LB (USBiological) dos colonias y luego se purificó el material genético plasmidial mediante lisis alcalina con SDS y columna de afinidad a DNA HiBind® del reactivo E.Z.N.A.® Plasmid DNA Midi Kit (Omega) siguiendo el protocolo del fabricante. El plasmidio (pUCIDT-CyCV) se eluyó de la columna con 0,5 µL de solución de elución y luego se cuantificó en el espectrofotómetro EPOCH (BioTek®), obteniéndose una concentración de 300 ng/µL.

Para amplificar el plasmidio pUCIDT-CyCV que contiene el genoma completo de CyCV, se ensayaron tres enzimas DNA polimerasa de alta fidelidad: ACCUZYME™ DNA Polymerase (Bioline), High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific) y Kapa HiFi PCR Mix (Kapa Biosystems®). También se utilizó la enzima Kapa PROBE FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal (Kapa Biosystems®) para amplificar tanto el control positivo utilizado en la PCR en tiempo real para detección de CyCV como el plasmidio pUCIDT-CyCV. Se realizó la amplificación del plasmidio en un termociclador Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler con partidores diseñados para la iPCR con el programa Vector NTI Advance™ versión 11.0, utilizando como molde la secuencia nucleotídica de la proteína Rep de la cepa chilena 7046A de cyclovirus (partidor directo (iFw): 5'CAGACGTTTGCTGCATGTAGC3' partidor reverso (iRv): 5'GACAGATACCCACACAAGGTTCC3').

El siguiente esquema representa la posición de hibridación y el tamaño de amplicón obtenido con los partidores de la PCR en tiempo real y de la iPCR en la cepa chilena de CyCV (Figura N°1) para amplificar el plasmidio pUCIDT-CyCV con las cuatro enzimas probadas. En la parte A de la figura N°1 se observa el genoma completo de CyCV-ChileNPA inserto en el plasmidio pUCIDT con resistencia a ampicilina. En la parte B de la figura se esquematiza el genoma circular completo de la cepa chilena de cyclovirus 7046A además de la posición relativa de los partidores de PCR en tiempo real y de PCR inversa en la secuencia del gen Rep y, en C la posición de hibridación y el fragmento amplificado de ambos conjuntos de partidores en el genoma de CyCV-ChileNPA. Por otra parte, el

fragmento obtenido al amplificar pUCIDT-CyCV con los partidores de iPCR corresponde al tamaño completo del plasmidio de 4542 pb.

Figura N°1: Esquema del plasmidio pUCIDT-CyCV, del genoma completo de la cepa chilena de cyclovirus, posición de hibridación y tamaño de amplicón en la cepa chilena de cyclovirus 7046A.



Fw-TR: partidor directo de PCR en tiempo real; Rv-TR: partidor reverso de PCR en tiempo real; iFw: partidor directo de PCR inversa; iRv: partidor reverso de PCR inversa.

Las tres pruebas realizadas con la polimerasa de ACCUZYME se resumen en la tabla N°1, describiéndose el programa de amplificación y el tipo de material genético aplicado. En cada reacción se utilizaron 5 µL de 10x AccuBuffer, 2 µL de MgCl₂ (50mM), 4 µL de dNTPs (100 mM), 3 µL de cada partidor directo y reverso (10 µM), 3 µL de ACCUZYME DNA Polymerase (2,5 U/µL) y el volumen necesario de material genético extraído de una muestra respiratoria de un adulto con NAC positivo para CyCV (concentración final 20 ng/µL) o de pUCIDT-CyCV (concentración final 0,2 ng/µL), completando un volumen final de 25 µL con agua con grado de biología molecular .

Tabla N°1: Condiciones para la amplificación del genoma completo de CyCV con la enzima ACCUZYME™ DNA Polymerase (Bioline).

	Pruebas		
	1	2	3
Material genético	Adulto NAC CyCV+	pUCIDT-CyCV	pUCIDT-CyCV
Partidores	iFw/iRv	iFw/iRv	Fw-TR/Rv-TR
Programa de amplificación			
Denaturación inicial	98°C/3 min	98°C/3 min	98°C/3 min
Denaturación	98°C/15 seg	98°C/15 seg	98°C/20 seg
Hibridación	55°C/15 seg	55°C/15 seg	53°C/15 seg
Extensión	72°C/2 min 30 seg	72°C/9 min	72°C/1 min
N° de ciclos	40	40	30

Con la enzima High Fidelity se realizaron dos pruebas de amplificación del genoma completo de CyCV desde el plasmidio pUCIDT-CyCV. En cada reacción de PCR se utilizó: 2,5 µL de 10x High Fidelity PCR Buffer; 2,5 µL de dNTPs (25 mM); 2,5 µL de cada partidor para iPCR (10 µM); 0,5 µL de High Fidelity PCR enzyme (5 U/µL); el volumen necesario de pUCIDT-CyCV para asegurar una concentración final de 0,04 (prueba 1) y 0,4 ng/µL (prueba 3) y agua con grado de biología molecular para completar un volumen final de 25 µL. El programa de amplificación incluyó: un ciclo de denaturación inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos (denaturación), 48°C por 30 segundos (hibridación) y 72°C por 1 minuto (extensión) y un paso de extensión final de un ciclo a 72°C por 10 minutos.

Con el reactivo Kapa PROBE FAST qPCR se realizaron tres pruebas de amplificación, cuyo detalle se resume en la tabla N°2, donde se muestran las concentraciones de material genético, los pares de partidores y el programa de amplificación. En cada ensayo se utilizaron 10 µL de Kapa PROBE FAST qPCR, 1 µL de cada partidor directo y reverso (10 µM) y el volumen necesario de pUCIDT-CyCV y de agua con grado de biología molecular hasta alcanzar un volumen final de 20 µL.

Tabla N°2: Condiciones para la amplificación del plasmidio pUCIDT-CyCV con la enzima Kapa PROBE FAST qPCR (Kapa Biosystems®).

		Pruebas		
		1	2	3
Concentración	pUCIDT-CyCV	12 ng/μL	5 ng/μL 7,5 ng/μL 10 ng/μL	10 ng/μL
Partidores		Fw-TR/Rv-TR	Fw-TR/Rv-TR	Fw-TR/Rv-TR iFw/iRv iFw/Rv-TR
Programa de amplificación				
Denaturación inicial		95°C/3 min	95°C/3 min	95°C/3 min
Denaturación		95°C/5 seg	95°C/5 seg	95°C/5 seg
Hibridación		53°C/20 seg	53°C/20 seg	53°C/20 seg
Extensión		72°C/5 seg	72°C/5 seg	72°C/20 seg
N° de ciclos		45	45	45

Con la enzima Kapa HiFi PCR se realizaron tres pruebas de amplificación de material genético de CyCV utilizando pUCIDT-CyCV como templado. En cada ensayo se utilizaron 5 μL de 5X Kapa HiFi Buffer, 0,75 μL de Kapa dNTP Mix (10mM), 0,75 μL de cada partidores directo y reverso para la iPCR (10 μM), 0,5 μL de Kapa HiFi DNA Polymerase (1 U/μL) y el volumen necesario de material genético y de agua con grado de biología molecular para completar 25 μL. La prueba 2 se realizó en un termociclador convencional con gradiente de temperatura (Applied Biosystems Vereti™ Thermal Cycler). En la tabla N°3 se resumen las cantidades de material genético, los partidores, la concentración de MgCl₂ y el programa de amplificación de cada prueba.

Tabla N°3: Condiciones para la amplificación del plasmidio pUCIDT-CyCV con la enzima Kapa HiFi PCR (Kapa Biosystems®).

	Pruebas		
	1	2	3
Cantidad de pUCIDT-CyCV	250 ng	250 ng	0,1/1/10/100/1000 ng
Partidores	Fw-TR/Rv-TR iFw/iRv iFw/Rv-TR	iFw/iRv	iFw/iRv
Concentración de MgCl ₂	2 mM	2 y 3 mM	2mM
Programa de amplificación			
Denaturación inicial	95°C/3 min	95°C/3 min	95°C/3 min
Denaturación	95°C/20 seg	95°C/20 seg	95°C/20 seg
Hibridación	53°C/15 seg	53°C/15 seg 55°C/15 seg 57°C/15 seg	55°C/15 seg
Extensión	72°C/3 min 23 seg	72°C/3 min 23 seg	72°C/3 min 23 seg
N° de ciclos	35	35	35
Extensión final	72°C/4 min 30 seg	72°C/4 min 30seg	72°C/4 min 30seg

En todas las pruebas realizadas se incluyó un control negativo (agua bidestilada libre de nucleasas) de PCR y todos los productos de PCR se corrieron a 100 volts en un gel de agarosa al 2% con agente intercalante SafeView (NBS biologicals) (dilución 1:20000), junto con estándar de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (New England BioLabs®) o 1 kb DNA Ladder (Promega).

5.- Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa GraphPad Prism versión 5.0, aplicando la prueba exacta de Fisher para los datos cualitativos y las pruebas t con la corrección de Mann-Whitney para variables cuantitativas, considerando un valor de $p < 0,05$ como significativo.

RESULTADOS

1.- Detección de CyCV en adultos

a) Con NAC:

La mediana de edad de los 105 adultos con NAC estudiados fue 68 años (rango: 20-89 años), siendo el 51,4% (54/105) hombres y el 48,6% (51/105) mujeres; el 87,6% (92/105) de estos tenía alguna enfermedad de base y 33,3% (35/105) presentó una enfermedad grave de acuerdo a la clasificación de Fine (25). Se detectó cyclovirus en 57 de ellos (54,3%) siendo 28 (49,1%) varones y 29 (50,9%) mujeres. El 26,3% de estos adultos con NAC con CyCV tenía enfermedad de base grave según puntaje FINE la mediana de edad fue de 67 años (rango: 20 – 89 años). Estas características fueron similares a las de adultos con NAC sin CyCV (Tabla N°4).

De los virus y bacterias estudiados en estos pacientes, la única diferencia estadísticamente significativa fue la menor detección de Flu y PIV en el grupo con CyCV (Tabla N°4).

Tabla N°4: Datos demográficos y detección de agentes infecciosos en adultos con NAC de acuerdo a la detección de cyclovirus.

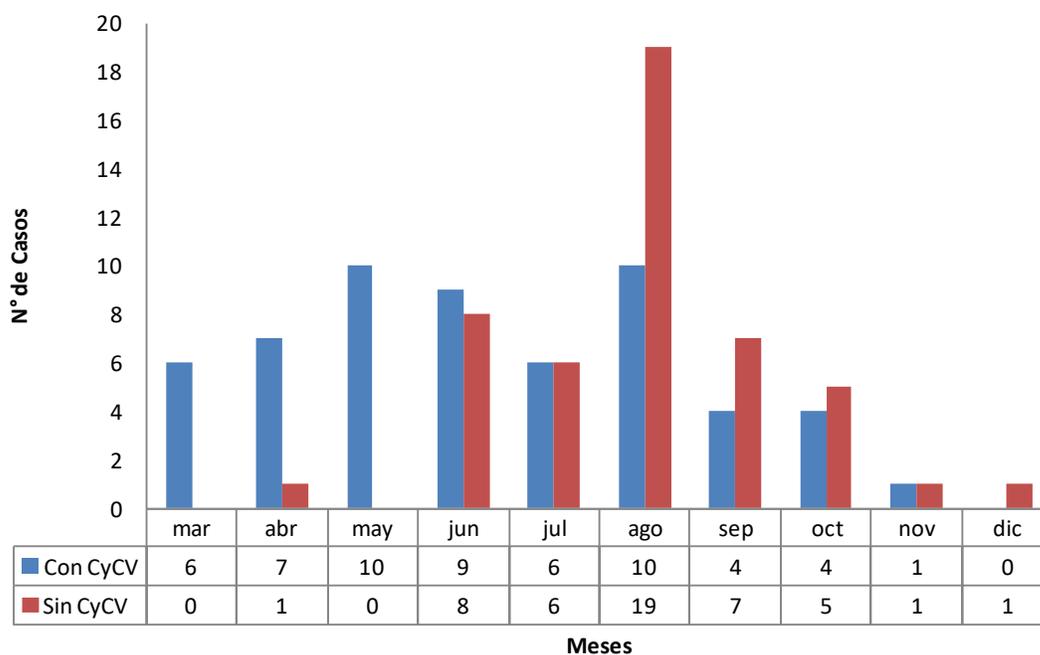
105 adultos con NAC			
	Con CyCV (%)	Sin CyCV (%)	Valor p
Total	57 (54,3%)	48 (45,7%)	
Género			
Masculino	28 (49,1%)	26 (54,2%)	0,60 ¹
Femenino	29 (50,9%)	22 (45,8%)	0,60 ¹
EDAD			
Mediana	67 años	69 años	0,77 ²
Rango	20 – 89 años	21 – 87 años	
DETECCIÓN AGENTE			
Uno o más agentes	32 (56,1%)	36 (75,0%)	0,06 ¹
Flu A/B; hPIV	3 (5,3%)	10 (20,8%)	0,02 ¹
hMPV; AdV	2 (3,5%)	3 (6,3%)	0,66 ¹
RSV	1 (1,8%)	1 (2,1%)	1,00 ¹
hRV	20 (35,1%)	10 (20,8%)	0,13 ¹
<i>S. pneumoniae</i>	8 (14,0%)	11 (22,9%)	0,31 ¹
GRAVEDAD			
Puntaje FINE (grupo 4 y 5)	15 (26,3%)	20 (41,7%)	0,1 ¹

Flu A: Virus Influenza A; Flu B: Virus Influenza B; hPIV: Virus parainfluenza humano; AdV: Adenovirus; RSV: Virus Respiratorio Sincicial; hRV: Rinovirus humano. ¹ Prueba exacta de Fisher, ² Prueba U de Mann Whitney.

En todos los meses estudiados (exceptuando diciembre) hubo casos con CyCV y todos los casos enrolados en marzo y en mayo fueron positivos. Solo en el mes de agosto se observó una mayor proporción de pacientes sin detección de cyclovirus. (Figura N°2).

Figura N°2: Distribución de 105 adultos con NAC estudiados según mes de enrolamiento y detección de CyCV, Santiago, 2012-2015.

Detección de CyCV en adultos con NAC



b) Sin sintomatología respiratoria:

La mediana de edad de los 104 adultos estudiados fue 41,5 años (rango: 19-80 años), siendo el 38,5% (40/104) hombres y el 61,5% (64/104) mujeres y el 26,0% (27/104) tenía alguna enfermedad de base (Tabla N°5). Se detectó cyclovirus en 18 (17,3%) individuos, 8 (44,4%) corresponden a varones y 10 (55,6%) a mujeres. La mediana de edad de este grupo de adultos con CyCV fue 41,5 años (rango: 21 – 78 años), siendo este grupo similar en proporción de género, edad y enfermedad de base al grupo de adultos sin CyCV.

Tabla N°5: Datos demográficos y antecedentes clínicos en adultos sin sintomatología respiratoria de acuerdo a la detección de cyclovirus.

104 adultos sin sintomatología respiratoria			
	Con CyCV (%)	Sin CyCV (%)	Valor p
Total	18 (17,3%)	86 (82,7%)	
Género			
Masculino	8 (44,4%)	32 (37,2%)	0,6 ¹
Femenino	10 (55,6%)	54 (62,8%)	0,6 ¹
EDAD			
Mediana	41,5 años	41,5 años	0,62 ²
Rango	21-78 años	19-80 años	
ANTECEDENTES			
Enfermedad de base	6 (33,3%)	21 (24,4%)	0,55 ¹

¹ Prueba exacta de Fisher, ² Prueba U de Mann Whitney.

La detección de CyCV en los 105 adultos con NAC fue significativamente superior a la de los 104 adultos sin sintomatología respiratoria (54,3% vs 17,3%, respectivamente; $p < 0,0001$).

2.- Detección de CyCV en niños

a) Con ERA:

En la tabla N°6 se muestran los datos demográficos y detección de agentes infecciosos en niños menores de dos años con enfermedad respiratoria aguda (ERA), según la detección de cyclovirus mediante PCR en tiempo real. La mediana de edad de los 101 niños con ERA fue 4 meses (rango: 0,4 - 11 meses), siendo el 52,5% (53/101) hombres y el 47,5% (48/101) mujeres. En estos niños se detectaron 6 virus respiratorios (virus influenza A y B, virus parainfluenza, metapneumovirus, adenovirus y virus respiratorio sincicial), mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), encontrándose en un 64,4% (65/101) detección de virus respiratorio sincicial; además no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los niños con y sin detección de cyclovirus.

Se detectó cyclovirus en 15 (14,9%) menores, 7 (46,7%) corresponden a varones y 8 (53,3%) a mujeres. La mediana de edad de este grupo de niños fue 3 meses (rango: 0,7 – 10 meses) siendo similar en proporción de género, edad y detección de agentes al grupo de niños con ERA sin detección de cyclovirus (Tabla N°6).

Tabla N°6: Datos demográficos y detección de agentes infecciosos en niños con enfermedad respiratoria aguda de acuerdo a la detección de cyclovirus.

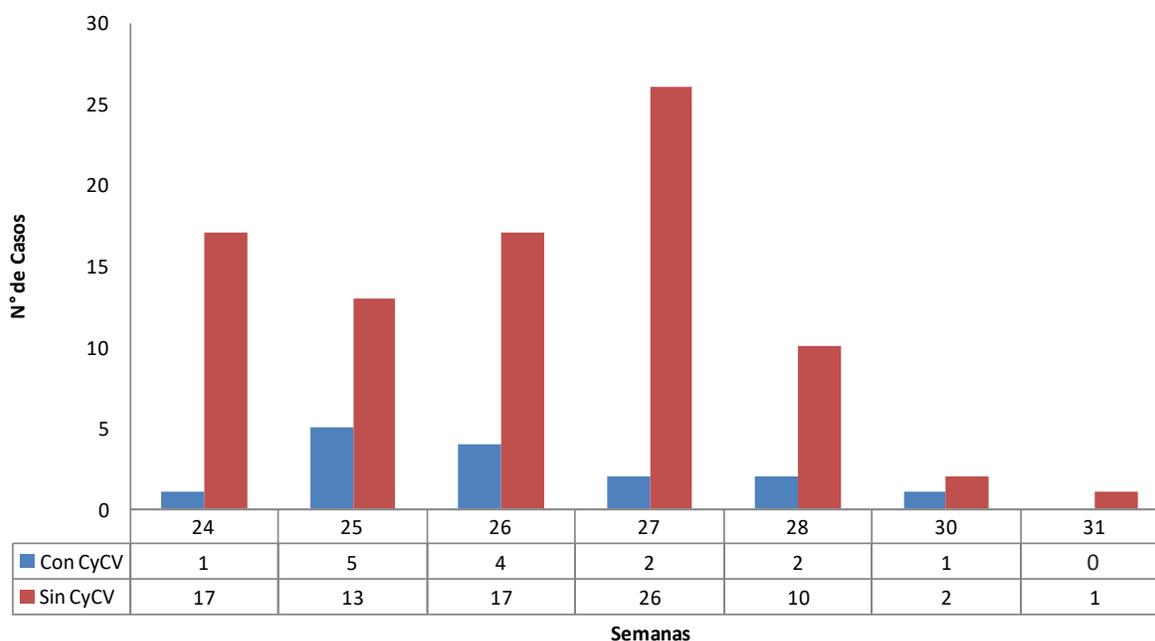
101 niños con ERA			
	Con CyCV (%)	Sin CyCV (%)	Valor p
Total	15 (14,9%)	86 (85,1%)	
Género			
Masculino	7 (46,7%)	46 (53,5%)	0,62 ¹
Femenino	8 (53,3%)	40 (46,5%)	0,62 ¹
EDAD			
Mediana	3 meses	5 meses	0,61 ²
Rango	0,7-10 meses	0,4-11 meses	
DETECCIÓN AGENTE			
Uno o más agentes	12 (80,0%)	60 (69,8%)	0,54 ¹
Flu A/B; hPIV	0 (0,0%)	7 (8,1%)	0,59 ¹
hMPV; AdV	0 (0,0%)	3 (3,5%)	1,00 ¹
RSV	12 (80,0%)	53 (61,6%)	0,25 ¹

Flu A: Virus Influenza A; Flu B: Virus Influenza B; hPIV: Virus parainfluenza humano; AdV: Adenovirus; RSV: Virus Respiratorio Sincicial; hRV: Rinovirus humano. ¹ Prueba exacta de Fisher, ² Prueba U de Mann Whitney.

Desde la semana 24 y hasta la 30, se detectó cyclovirus en las muestras respiratorias de los niños con ERA, observándose en todas las semanas una mayor proporción de niños sin detección de CyCV (Figura N°3).

Figura N°3: Distribución de 101 niños con ERA estudiados según la semana de enrolamiento y detección de CyCV, Santiago, junio-julio 2016.

Detección de CyCV en niños con ERA 2016



b) Sin sintomatología respiratoria:

Se analizaron 124 aspirados nasofaríngeos de niños sin sintomatología respiratoria, pero se excluyeron del estudio a 20 menores debido a que 3 eran mayores de 2 años y en 17, no se confirmó el resultado positivo de la PCR en una otra alícuota congelada de la muestra.

Se estudiaron 104 niños sin sintomatología respiratoria por al menos un mes previo al enrolamiento, cuyas características demográficas y antecedentes clínicos se describen en la tabla N°7. La mediana de edad de los niños fue 13 meses (rango: 0,1 - 24 meses), siendo el 51,9% (54/104) hombres y el 48,1% (50/104) mujeres. El 5,8 (6/104) de estos niños consultó por traumatismo; el 44,2% (46/104) por enfermedad digestiva; el 4,8% (5/104) por síndrome febril; el 13,5% (14/104) por infección urinaria; el 6,7% (7/104) por otras causas infecciosas (panadizo, escabiosis, herpangina, etc.) y el 26,9% (28/104) por razones no infecciosas (anemia, alergias, crisis de llanto, etc).

Se detectó cyclovirus en 50 (48,1%) individuos, 23 (46,0%) corresponden a varones y 27 (54,0%) a mujeres. La mediana de edad de este grupo de niños fue 12 meses (rango: 0,1 –

24 meses), siendo similar en proporción de género, edad y detección de agentes al grupo de niños sin detección de cyclovirus (Tabla N°7).

Tabla N°7: Datos demográficos y antecedentes clínicos de los niños sin sintomatología respiratoria de acuerdo a la detección de cyclovirus.

104 niños sin sintomatología respiratoria			
	Con CyCV (%)	Sin CyCV (%)	Valor p
Total	50 (48,1%)	54 (51,9%)	
Género			
Masculino	23 (46,0%)	31 (57,4%)	0,63 ¹
Femenino	27 (54,0%)	23 (42,6%)	0,63 ¹
EDAD			
Mediana	12 meses	13 meses	0,72 ²
Rango	0,1-24 meses	0,2-34 meses	
ANTECEDENTES			
Traumatismo	3 (6,0%)	3 (5,6%)	1,00 ¹
Enfermedad digestiva	23 (46,0%)	23 (42,6%)	0,84 ¹
Síndrome febril	4 (8,0%)	1 (1,9%)	0,19 ¹
ITU, PNA	5 (10,0%)	9 (16,7%)	0,40 ¹
Otras infecciosas	4 (8,0%)	3 (5,6%)	0,71 ¹
Otras no infecciosas	13 (26,0%)	15 (27,8%)	1,00 ¹

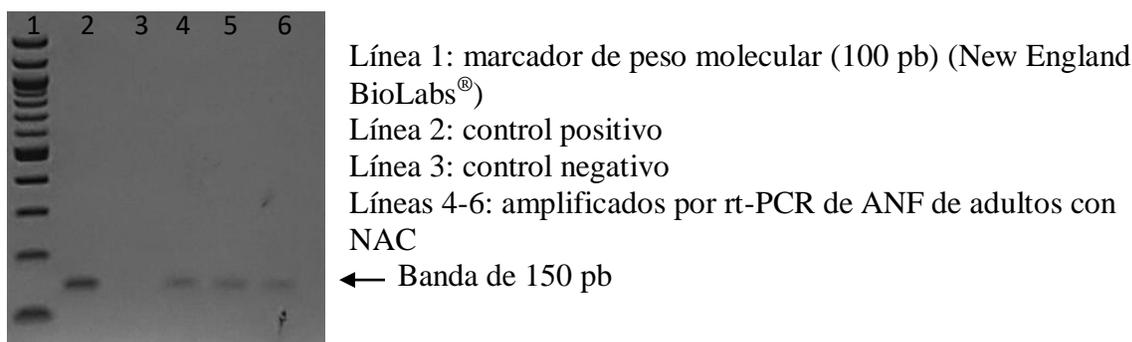
ITU: Infección urinaria; PNA: Pielonefritis aguda. ¹ Prueba exacta de Fisher, ² Prueba U de Mann Whitney.

La detección de cyclovirus fue significativamente superior entre los 104 niños sin sintomatología respiratoria que entre los 101 niños con ERA (48,1% v/s 14,9%, respectivamente, $p < 0,001$).

3.- Confirmación de amplificación de CyCV

Para verificar si el tamaño del amplificado en las muestras positivas por PCR corresponde a la banda de aproximadamente 150 pb esperada, todas las muestras positivas para CyCV se corrieron en un gel de agarosa al 2% ($n=140$). La figura N°4 corresponde a una imagen representativa de una corrida electroforética de 3 muestras de aspirado nasofaríngeo de adultos con NAC, con el estándar de peso molecular de 100 pb y el control positivo y negativo utilizado en la detección de CyCV en las muestras respiratorias.

Figura N°4: Corrida electroforética de productos de PCR en tiempo real purificados de adultos con NAC en gel de agarosa al 2%.



En la totalidad de los 140 amplificados (75 de adultos y 65 de niños) se observó una única banda de 150 pb. Todas fueron purificadas y el 67,1% (94/140) se secuenciaron en MacroGen® con los mismos partidores directo y reverso utilizados en la PCR en tiempo real para detección de CyCV. En 84% (79/94) de las muestras secuenciadas se obtuvo un cromatograma adecuado desde el cual se generó una secuencia consenso a 58/70 (82,8%) de las muestras de adultos y 21/24 (87,5%) de niños, encontrándose en un 64,6% (51/79) una única mutación respecto de la cepa chilena de cyclovirus 7046A (Tabla N°8).

Tabla N°8: Distribución de las muestras positivas para cyclovirus según secuenciación y grupo etario.

	Total (+) (n)	Secuenciadas (%)	Con secuencia consenso (%)	Con mutación (%)
Adultos	NAC (57)	55 (96,5%)	44 (80,0%)	37 (84,1%)
	Sin sintomatología (18)	15 (83,3%)	14 (93,3%)	6 (42,9%)
Niños	ERA (15)	12 (80,0%)	10 (83,3%)	4 (40,0%)
	Sin sintomatología (50)	12 (24,0%)	11 (91,7%)	4 (36,4%)
Total	140	94 (67,1%)	79 (84,0%)	51 (64,6%)

La mutación encontrada en 43/58 (74,1%) de las muestras con secuencia consenso de adultos y en 8/21 (38,1%) de las muestras con secuencia consenso de niños corresponde a

una sustitución de una guanina por una timina en la posición 1313 de las cuatro cepas chilenas de CyCV-ChileNPA (figura N°5). La guanina de la posición 1313 corresponde al tercer nucleótido del codón 104 que codifica para el aminoácido serina de la proteína asociada a la replicación viral (Rep), cuya secuencia está en la hebra negativa del genoma de cyclovirus. La sustitución encontrada en la secuencia consenso modifica la secuencia del codón desde TCC a TCT el cual codifica también para un aminoácido serina.

Figura N°5: Alineamiento entre la secuencia de consenso de CyCV proveniente de una muestra de adulto con NAC y la cepa chilena 7046A de CyCV.

Human cyclovirus strain 7046A, complete genome
Sequence ID: [KF726987.2](#) Length: 1790 Number of Matches: 1

Range 1: 1267 to 1415 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
270 bits(146)	5e-69	148/149(99%)	0/149(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTCCTTGTATAGTTTCCAAAAGGGACTGAATGTCCGTCCGTTGTCCTGATCCTTCAGAAG	60		
Sbjct 1267	CTCCTTGTATAGTTTCCAAAAGGGACTGAATGTCCGTCCGTTGTCCTGATCCTTCAGAAG	1326		
Query 61	GACTCCCCTTCTCAAAGAACTCGCCTGATTTACTACAGTATTGTTGGTTTTCTTGTCCGG	120		
Sbjct 1327	GACTCCCCTTCTCAAAGAACTCGCCTGATTTACTACAGTATTGTTGGTTTTCTTGTCCGG	1386		
Query 121	ATCCCATTCGCTTCTCAATATGGATACGG	149		
Sbjct 1387	ATCCCATTCGCTTCTCAATATGGATACGG	1415		

 : indica la sustitución.

4.- Amplificación del genoma completo de CyCV

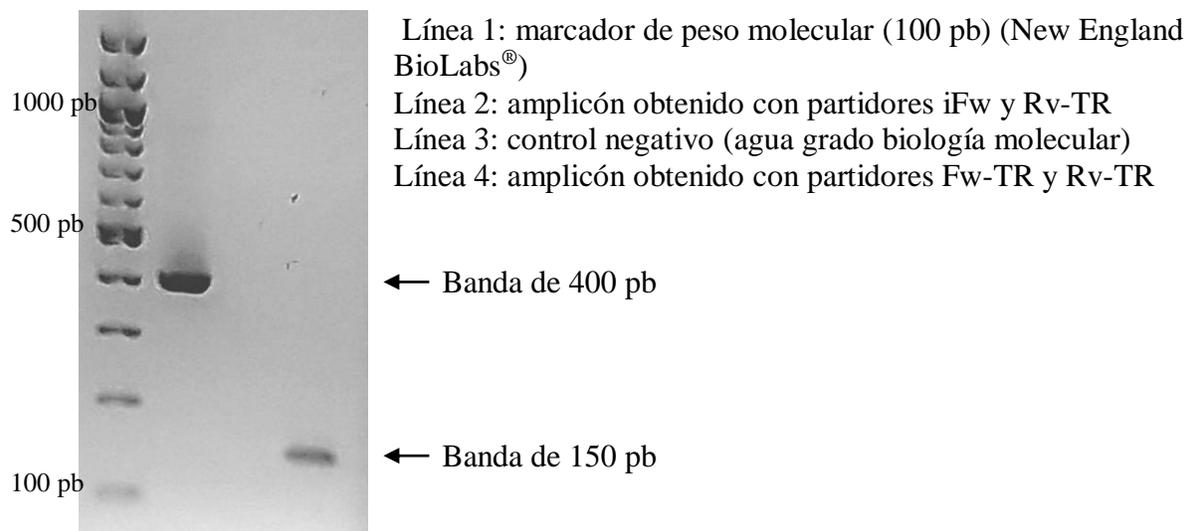
Para determinar posibles variantes genéticas de la cepa chilena de cyclovirus detectado en las muestras respiratorias de niños y adulto estudiadas, se estandarizaron las condiciones para la amplificación del genoma completo de CyCV-ChileNPA (tamaño 1790 pb) insertado en un plasmidio de clonamiento pUC-IDT (tamaño total 4542 pb) mediante PCR inversa. La tabla N°9 resume los resultados de las 8 pruebas de amplificación con las dos ADN polimerasas de alta fidelidad ((ACCUZYME™ DNA Polymerase (Bioline) y High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific)) y con la enzima Kapa PROBE FAST qPCR (KapaBiosystems®) utilizada en la detección de CyCV en las muestras respiratorias (tablas N° 1 y 2). No se obtuvo amplificación en ninguno de los cinco ensayos realizados con las enzimas de Bioline y Thermo Fisher, mientras que en los tres ensayos con el reactivo Kapa PROBE se obtuvo amplificación de pUCIDT-CyCV.

Tabla N°9: Resultados de amplificación de pUCIDT-CyCV con las distintas ADN polimerasas de alta fidelidad.

REACTIVO	RESULTADOS DE AMPLIFICACIÓN		
	1	2	3
ACCUZYME™ DNA Polymerase	No	No	No
High Fidelity PCR Enzyme Mix	No	No	-
Kapa PROBE FAST qPCR	Si	Si	Si

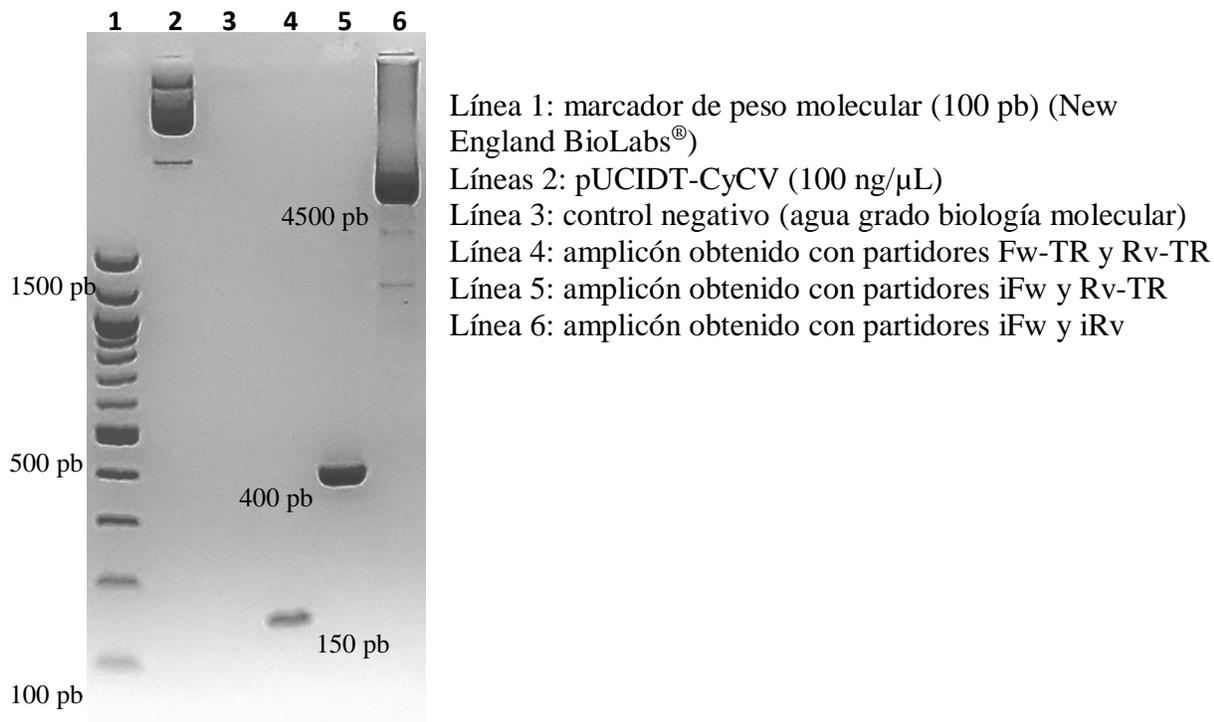
Con la enzima Kapa PROBE FAST qPCR, utilizando como material genético pUCIDT-CyCV, se obtuvo amplificación de un fragmento de 150 pb con los partidores de PCR en tiempo real y un fragmento de 400 pb en la prueba con partidores iFw y Rv-TR (figura N°1) que podría corresponder al fragmento de CyCV entre las 1009 pb y 1415 pb (Figura N°6).

Figura N°6: Corrida electroforética de los productos de PCR obtenidos de la amplificación de pUCIDT-CyCV con la enzima Kapa PROBE FAST qPCR en gel de agarosa al 2%.



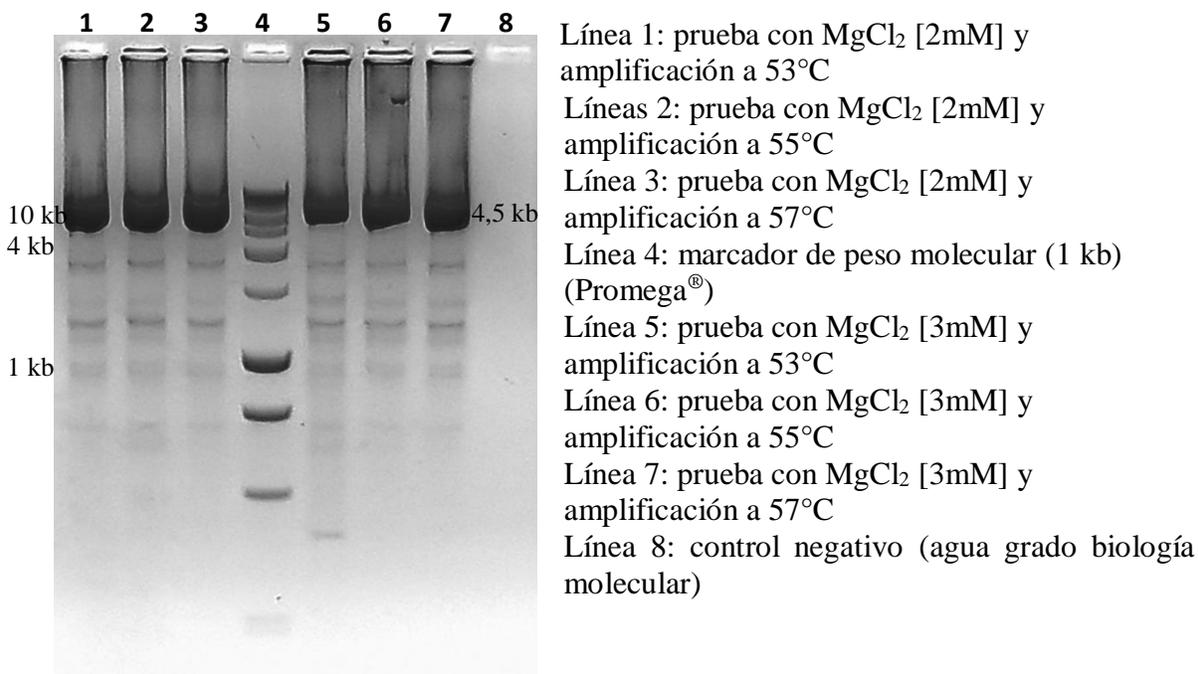
Debido a que no hubo amplificación del plasmidio pUCIDT-CyCV con las dos ADN polimerasas de alta fidelidad utilizadas anteriormente, se realizaron tres ensayos con la enzima Kapa HiFi PCR para estandarizar tres variables (concentración de $MgCl_2$, temperatura de hibridación y concentración de plasmidio) para la amplificación de pUCIDT-CyCV utilizando los partidores de iPCR. En el primer ensayo se probaron tres conjuntos de partidores distintos usando las concentraciones de reactivos y el programa de amplificación señalados en la tabla N°3, obteniéndose una única banda de 400 y 150 pb con los partidores iFw/Rv-TR y Fw-TR/Rv-TR respectivamente, además de una intensa banda de aproximadamente 4500 pb coincidente con el tamaño del plasmidio pUCIDT-CyCV y otras dos bandas más débiles de aproximadamente 2500 y 1300 pb con los partidores iFw/iRv (Figura N°7). Estas bandas de menor tamaño podrían deberse a amplificaciones inespecíficas producto de la elevada cantidad de plasmidio utilizada en la reacción (10 ng/ μ L), temperatura de hibridación baja o gran cantidad de ciclos de amplificación.

Figura N°7: Corrida electroforética de los productos de PCR inversa obtenidos de la amplificación de pUCIDT-CyCV con la enzima Kapa HiFi PCR en gel de agarosa al 2%.



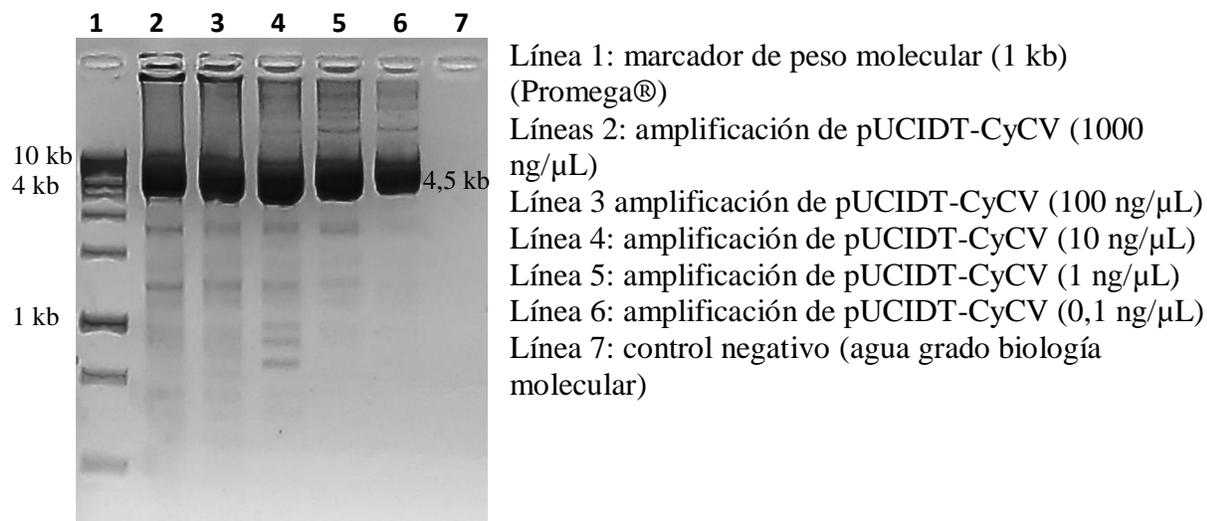
En el ensayo 2 se probaron dos concentraciones de $MgCl_2$ junto con tres temperaturas de amplificación distintas en un termociclador convencional con gradiente de temperatura (Applied Biosystems Vereti™ Thermal Cycler) como se resumen en la tabla N°3, obteniéndose un patrón de bandas entre 4500 y 750 pb similar entre las temperaturas y en las dos concentraciones de $MgCl_2$ (Figura N°8). Al igual que en el ensayo 1, se aprecia una intensa banda de aproximadamente 4500 pb que coincide con el tamaño del plasmidio pUCIDT-CyCV y otro conjunto de bandas de menor tamaño e intensidad que corresponderían a amplicones inespecíficos que podría explicarse por la elevada concentración de plasmidio.

Figura N°8: Corrida electroforética de los productos de PCR inversa obtenidos de la amplificación de pUCIDT-CyCV con partidores iFw/iRv con la enzima Kapa HiFi PCR en gel de agarosa al 2%.



En el último ensayo se probaron cinco concentraciones distintas de plasmidio pUCIDT-CyCV, utilizando las concentraciones y volúmenes de reactivos y el programa de amplificación resumidos en la tabla N°3, observándose un patrón de bandas similar al obtenido en el ensayo 2 el cual fue disminuyendo en intensidad al bajar la concentración de plasmidio con excepción de tres bandas entre 800 a 1000 pb en la línea 4 correspondiente a la concentración de 10 ng/μL de pUCIDT-CyCV (Figura N°9). Nuevamente, se destaca una banda intensa de 4500 pb que permanece presente en todos los carriles y que coincide con el tamaño del plasmidio pUCIDT-CyCV. Las otras bandas de menor tamaño podrían corresponder a productos de PCR inespecíficos, debido a una temperatura de hibridación baja o elevado número de ciclos de amplificación.

Figura N°9: Corrida electroforética de los productos de PCR inversa obtenidos de la amplificación de pUCIDT-CyCV con partidores iFw/iRv con la enzima Kapa HiFi PCR en gel de agarosa al 2%.



Finalmente, las concentraciones y volúmenes de reactivos y agua para amplificar pUCIDT-CyCV fueron: 5 μL de 5X Kapa HiFi Buffer (que contiene una concentración final de MgCl₂ de 2mM), 0,75 μL de Kapa dNTP Mix (10mM), 0,75 μL de cada partidor directo y reverso para la iPCR (10 μM), 0,5 μL de Kapa HiFi DNA Polymerase (1 U/μL), 2 μL de pUCIDT-CyCV (0,1 ng/μL) y 15,25 μL de agua con grado de biología molecular para completar 25 μL. Por otra parte, el programa considerado óptimo para la amplificación del plasmidio pUCIDT-CyCV incluye un ciclo de denaturación inicial a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos a 98°C por 20 segundos (denaturación), 55°C por 15 segundos (hibridación) y 72°C por 2 minutos (extensión) y un paso de extensión final de un ciclo a 72°C por 3 minutos.

5.- Relación entre antecedentes clínicos y CyCV en adultos con NAC

Para determinar diferencias entre los antecedentes clínicos de los 105 adultos con NAC con y sin detección de cyclovirus, se compararon 23 parámetros agrupados en cuatro grupos: estado de gravedad, diagnóstico de ingreso, antecedentes clínicos y evolución clínica. La

única diferencia estadísticamente significativa fue la menor mediana de días de evolución en los adultos con NAC CyCV positivos respecto a los sin CyCV ($p=0,034$) (Tabla N°10).

Tabla N°10: Comparación de los antecedentes clínicos de los adultos con NAC de acuerdo a la detección de cyclovirus.

	Con CyCV (%)	Sin CyCV (%)	Valor p
Estado de Gravedad			
Hospitalización	56 (98,2%)	46 (97,9%)	0,5
Diagnostico de ingreso			
Insuficiencia respiratoria	2 (3,51%)	2 (4,17%)	1,0
Infección urinaria	1 (1,76%)	2 (4,17%)	0,59
Cardiopatía coronaria	2 (3,51%)	1 (2,01%)	1,0
Desnutrición	1 (1,76%)	1 (2,01%)	1,0
Antecedentes clínicos			
Fibrosis pulmonar/ Enfisema	2 (3,51%)	0 (0,0%)	0,5
Hipertensión arterial	33 (57,9%)	20 (41,7%)	0,12
Diabetes	13 (22,8%)	11 (22,9%)	1,0
EPOC	25 (43,9%)	26 (54,2%)	0,33
Asma	2 (3,51%)	3 (6,25%)	0,66
Insuficiencia Cardíaca	14 (24,6%)	6 (12,5%)	0,14
Daño hepático	1 (1,76%)	1 (2,01%)	1,0
Insuficiencia renal	4 (7,02%)	5 (10,4%)	0,73
Neoplasia	0 (0,0%)	2 (4,17%)	0,21
Enfermedad neurológica	3 (5,26%)	3 (6,25%)	1,0
Días de evolución (mediana)	4,07	4,7	0,03
Evolución			
Ventilación mecánica	2 (3,51%)	3 (6,25%)	0,66
Falla renal aguda	1 (1,76%)	1 (2,01%)	1,0
Insuficiencia respiratoria	5 (8,77%)	5 (10,4%)	1,0
Derrame pleural complicado	3 (5,26%)	1 (2,01%)	0,62
Falla hepática	2 (3,51%)	1 (2,01%)	0,5
Oxigenoterapia	8 (14,0%)	12 (25,0%)	0,21
Fallecimiento	0 (0,0%)	2 (4,17%)	0,21

Se aplico la prueba exacta de Fisher en todas las comparaciones.

DISCUSION

Esta es la primera vez que se reporta la detección de cyclovirus en muestras respiratorias de adultos con y sin enfermedad respiratoria, encontrándose un mayor número de CyCV-ChileNPA en individuos con NAC que en adultos sin sintomatología respiratoria, considerando a cyclovirus como un posible agente causante de enfermedad respiratoria en adultos

Previamente solo se había detectado CyCV en muestras respiratorias de niños chilenos en menores de dos años con enfermedad respiratoria aguda con una incidencia del 3,3% (3). Por otro lado, el 2017 se publicó el único estudio de detección de este agente infeccioso en población exclusivamente adulta infectada con otros virus (VHB, VHC o VIH) (19).

Se realizó la detección de cyclovirus chileno en muestras respiratorias de niños y adultos con y sin enfermedad respiratoria mediante PCR en tiempo real, encontrándose una frecuencia significativamente mayor de CyCV entre los adultos con NAC (54,3%) que entre adultos sin sintomatología respiratoria (17,3%), por lo que surge la necesidad de investigar si este virus tiene un rol patogénico en enfermedad respiratoria en adultos, lo que debiera confirmarse con estudios posteriores.

Al comparar la frecuencia de detección de CyCV entre adultos y niños con enfermedad respiratoria, sorprende la significativa mayor positividad en adultos con NAC (54,3%) que en niños con ERA (14,9%), lo que podría deberse a una efectiva mayor incidencia en adultos, aunque no existen estudios en que comparen la detección de este agente en población con alguna patología. Otras explicaciones de esta diferencia podrían ser: a) diferencias en el cuadro clínico, por cuanto aunque todas eran enfermedades del tracto respiratorio inferior, entre los niños con ERA se incluyó a pacientes con bronquiolititis (35,6%), neumonía (29,7%) y síndrome bronquial obstructivo (8,9%) mientras que todos los adultos estudiados tenían una neumonía o, b) distintos períodos del año estudiados, dado que los adultos se estudiaron durante todo el año (a excepción del mes de febrero y por más de 2 años) mientras que sólo se estudiaron casos de niños con ERA en un periodo de 7 semanas (entre el 15 de junio al 31 de julio del 2016). Aunque se detectó CyCV en

15/29 (51,7%) de adultos con NAC entre junio y julio (similar periodo al estudiado en niños con ERA), se requiere establecer un patrón anual de infección de este virus en el grupo de niños para realizar una adecuada comparación entre ambos grupos.

También se encontró una mayor proporción de adultos con NAC y CyCV respecto de los sin CyCV en los meses de marzo, abril y mayo, tendiendo a igualarse el resto del año con excepción de agosto, mes en que se invierte esta diferencia debido a que aumentan los casos sin CyCV. Debido a que no hay estudios publicados de detección anual de cyclovirus, se propone establecer un patrón anual de infección de este agente infeccioso, realizando una detección durante todo el año de CyCV en los otros tres grupos de estudio. Además, para realizar una mejor comparación estadística entre individuos con y sin cyclovirus, se podría aumentar el tamaño muestral sobre todo en los meses donde no se analizaron muestras y donde la cantidad de individuos analizados fue baja. No se han publicado estudios de detección anual de CyCV en ningún tipo de muestra animal ni humana

La detección de cyclovirus en niños sin sintomatología respiratoria (48,1%) fue significativamente mayor que entre los niños con ERA (14,9%) por lo que relacionar la presencia de este virus con enfermedad respiratoria en niños no es factible. El aumento de casos de CyCV entre los niños sin sintomatología respiratoria puede deberse a un brote de este virus en el mes de diciembre, periodo en el cual no se procesaron muestras de niños con ERA, por esta razón se debería realizar un seguimiento semanal durante un año de ambos grupos para establecer dónde ocurre el máximo periodo de infección. Por otra parte, el 46% de los niños sin sintomatología respiratoria con CyCV tenía enfermedad digestiva y, en estudios anteriores, se estableció la presencia de este virus en muestras de heces de pacientes con enfermedad gástrica (18) lo que podría explicar la presencia de CyCV en las muestras respiratorias de estos niños considerando que se ha detectado material genético de este virus en muestras de heces y respiratorias (3,18). Por esto último, es recomendable utilizar como grupo de comparación niños sin enfermedad respiratoria ni digestiva.

Este trabajo es el primero donde se detecta cyclovirus utilizando PCR en tiempo real con sonda de hidrólisis, detectándose en un porcentaje entre 2 y hasta 15 veces mayor al publicado en todos los otros estudios. Las metodologías utilizadas por las otras

publicaciones como secuenciamiento completo del genoma (WGS) y PCR convencional tienen una sensibilidad menor que la PCR en tiempo real utilizando sonda de hidrólisis (21), lo que podría explicar los mayores porcentajes de detección de cyclovirus humano en las muestras respiratorias estudiadas.

El secuenciamiento de 79 productos de PCR obtenidos de la amplificación de CyCV desde material genético de muestras respiratorias de niños y adultos con y sin enfermedad respiratoria confirman que se ha detectado un fragmento de 149 pb correspondiente al gen de la proteína Rep exclusiva de las 4 cepas chilenas de cyclovirus, lo que valida el diseño utilizado para detectar exclusivamente CyCV-ChileNPA en este tipo de muestras, por lo que los porcentajes de detección de este agente podrían ser mayores a los publicados hasta la presentación de esta tesis si se sigue utilizando la misma metodología de detección de CyCV (1-6, 17, 18,19).

En el análisis de la secuencia de consenso se observó una sustitución nucleotídica de una guanina por una timina en el 64,6% (n=51) de los casos. Esta mutación no produce un cambio aminoacídico en la proteína Rep, pero es una variación genética de la cepa chilena de cyclovirus que no produce ningún impacto de funcionalidad a nivel proteico (3). Mutaciones en dos, cinco y seis nucleótidos se encontraron en las cepas CyCV-ChileNPA 2-4 respecto de CyCV-ChileNPA1 y solo se encontraron dos sustituciones en el gen de Rep de CyCVChile-NPA4 que modifican la secuencia aminoacídica de esta proteína (3).

La estandarización de las condiciones para la amplificación del plasmidio que contiene la secuencia completa de la cepa 7046A de CyCV-ChileNPA mediante PCR inversa en un termociclador convencional permite establecer las condiciones para amplificar la secuencia completa de la cepa chilena de cyclovirus en aquellas muestras positivas para la detección de este virus y posteriormente, purificar, secuenciar y genotipificar las posibles variantes de CyCV-ChileNPA en las muestras respiratorias estudiadas. La baja cantidad o deterioro del material genético de CyCV, la presencia de material genético celular, además de la existencia de algunos interferentes, podrían modificar las condiciones óptimas establecidas para la amplificación de pUCIDT-CyCV para amplificar la secuencia completa de

cyclovirus desde los extractos de ácidos nucleicos totales de las muestras respiratorias positivas para CyCV.

Al respecto, una de las limitaciones de esta tesis fue la imposibilidad de cumplir con la genotipificación de las variantes genéticas de cyclovirus chileno en las muestras respiratorias estudiadas, correspondiente al objetivo 2. Diversas circunstancias explican esta dificultad tales como:

a) El exceso de recursos (tiempo y reactivos) invertidos para la selección de la enzima adecuada para la amplificación del plasmidio que contiene la secuencia completa de CyCV-ChileNPA; b) dificultad para adquirir la enzima Kapa HiFi una vez seleccionada y c) necesidad de cumplir con el plazo de entrega sugerido de la tesis. Estas limitaciones están estrechamente relacionadas con las dificultades de desarrollar investigación en nuestro país como: escasez de recursos económicos y exceso de trámites administrativos para adquirir los insumos, deficiente apoyo monetario (tanto al estudiante como a la institución) para promover la investigación básica y el escaso interés nacional en fomentar y potenciar el desarrollo científico.

Esta tesis permitió contribuir a los estudios de detección de cyclovirus en muestras humanas, planteando la interrogante de si este virus es causante de enfermedad respiratoria en adultos. Determinar si el material genético de la cepa chilena de cyclovirus detectada en las muestras respiratorias de niños y adultos chilenos con y sin enfermedad respiratoria corresponde a variantes genéticas de dicha cepa; realizar ensayos con distintas líneas celulares para lograr el aislamiento viral de CyCV-ChileNPA y obtener una mayor cantidad de partículas virales infectivas; detectar material genético de cyclovirus en otras muestras de origen humano como heces y líquido cefalorraquídeo y establecer una frecuencia de infección anual por cyclovirus en niños y adultos chilenos y relacionarlos con los distintos brotes de enfermedades respiratorias serían las distintas líneas de estudio a seguir para darle continuidad a los resultados presentados en esta tesis.

CONCLUSIÓN

Por primera vez se detecta CyCV en muestras respiratorias de adultos, con y sin enfermedad respiratoria con una frecuencia significativamente mayor en adultos con NAC que en adultos sin enfermedad respiratoria, por lo que corresponde investigar un posible rol patógeno respiratorio en esta población. Además, no se puede establecer una relación entre enfermedad respiratoria y presencia de CyCV en niños con ERA debido a una diferencia significativamente mayor en lactantes sin enfermedad respiratoria.

Adicionalmente, se establecieron las condiciones para amplificar posibles variantes genéticas de CyCV desde extractos de ácidos nucleicos provenientes de muestras respiratorias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele OS, Wang C, Shaukat S, et al. Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *Journal of Virology*. 2010;84(4):1674-82. doi: 10.1128/JVI.02109-09. PubMed PMID: 20007276; PubMed Central PMCID: PMC2812408.
2. Tan le V, van Doorn HR, Nghia HD, Chau TT, Tu le TP, de Vries M, et al. Identification of a new cyclovirus in cerebrospinal fluid of patients with acute central nervous system infections. *mBio*. 2013;4(3):e00231-13. doi: 10.1128/mBio.00231-13. PubMed PMID: 23781068; PubMed Central PMCID: PMC3684831.
3. Phan TG, Luchsinger V, Avendano LF, Deng X, Delwart E. Cyclovirus in nasopharyngeal aspirates of Chilean children with respiratory infections. *The Journal of General Virology*. 2014;95(Pt 4):922-7. doi: 10.1099/vir.0.061143-0. PubMed PMID: 24421114; PubMed Central PMCID: PMC3973479.
4. Phan TG, Mori D, Deng X, Rajindrajith S, Ranawaka U, Fan Ng TF, et al. Small circular single stranded DNA viral genomes in unexplained cases of human encephalitis, diarrhea, and in untreated sewage. *Virology*. 2015;482:98-104. doi: 10.1016/j.virol.2015.03.011. PubMed PMID: 25839169; PubMed Central PMCID: PMC4461510.
5. Smits S. L. et al. Novel cyclovirus in human cerebrospinal fluid, Malawi, 2010–2011. *Emerg. Infect. Dis*. 2013;19, 1511–1513, doi: 10.3201/eid1909.130404.
6. Li L, Shan T, Soji OB, Alam MM, Kunz TH, Zaidi SZ, et al. Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. *The Journal of General Virology*. 2011;92(Pt 4):768-72. doi: 10.1099/vir.0.028704-0. PubMed PMID: 21177928; PubMed Central PMCID: PMC3133700.
7. Rosario K, Marinov M, Stainton D, Kraberger S, Wiltshire EJ, Collings DA, et al.

Dragonfly cyclovirus, a novel single-stranded DNA virus discovered in dragonflies (Odonata: Anisoptera). *The Journal of General Virology*. 2011;92(Pt 6):1302-8. doi: 10.1099/vir.0.030338-0. PubMed PMID: 21367985.

8. Dayaram A, Potter KA, Moline AB, Rosenstein DD, Marinov M, Thomas JE, et al. High global diversity of cycloviruses amongst dragonflies. *The Journal of General Virology*. 2013;94(Pt 8):1827-40. doi: 10.1099/vir.0.052654-0. PubMed PMID: 23596268.

9. Padilla-Rodriguez M, Rosario K, Breitbart M. Novel cyclovirus discovered in the Florida woods cockroach *Eurycotis floridana* (Walker). *Archives of Virology*. 2013;158(6):1389-92. doi: 10.1007/s00705-013-1606-x.

10. Sato G, Kawashima T, Kiuchi M, Tohya Y. Novel cyclovirus detected in the intestinal contents of Taiwan squirrels (*Callosciurus erythraeus taiwanensis*). *Virus genes*. 2015;51(1):148-51. doi: 10.1007/s11262-015-1217-6. PubMed PMID: 26089292.

11. Zhan W, Li L, Deng X, Kapusinsky B, Pesavento PA, Delwart E. Faecal virome of cats in an animal shelter. *J. Gen. Virol.* 2014; 95:2553-264, doi: 10.1099/vir.0.069674-0.

12. Ge X, Li J, Peng C, Wu L, Yang X, Wu Y, et al. Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. *Journal of General Virology*. 2011;92(11):2646-53. doi:10.1099/vir.0.034108-0.

13. Lima FE, Cibulski SP, Dos Santos HF, Teixeira TF, Varela AP, Roehe PM, et al. Genomic characterization of novel circular ssDNA viruses from insectivorous bats in Southern Brazil. *PloS one*. 2015;10(2):e0118070. doi: 10.1371/journal.pone.0118070. PubMed PMID: 25688970; PubMed Central PMCID: PMC4331541.

14. Wu Z, Yang L, Ren X, He G, Zhang J, Yang J, et al. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *ISME J*. 2016; 10:609–620, doi: 10.1038/ismej.2015.138.

15. Male MF, Kraberger S, Stainton D, Kami V, Varsani A. Cycloviruses, gemycircularviruses and other novel replication-associated protein encoding circular viruses in Pacific flying fox (*Pteropus tonganus*) faeces. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 39:279–292, doi: 10.1016/j.meegid.2016.02.009.
16. Li L, Giannitti F, Low J, Keyes C, Ullmann LS, Deng X, et al. Exploring the virome of diseased horses. *Journal of General Virology.* 2015;96(9):2721-33. doi: 10.1099/vir.0.000199.
17. Chan MC, Kwok SW, Chan PK. False-positive PCR detection of cyclovirus Malawi strain VS5700009 in human cerebrospinal fluid. *J. Clin. Virol.* 2015; 68:76-8. doi: 10.1016/j.jcv.2015.05.007.
18. Garigliany MM, Hagen RM, Frickmann H, May J, Schwarz NG, Perse A, et al. Cyclovirus CyCV-VN species distribution is not limited to Vietnam and extends to Africa. *Scientific reports.* 2014;4:7552. doi: 10.1038/srep07552. PubMed PMID: 25518947.
19. Macera L, Focosi D, Vatteroni ML, Manzin A, Antonelli G, Pistello M, et al. Cyclovirus Vietnam DNA in immunodeficient patients. *Journal of Clinical Virology.* 2016;81:12-5. doi: 10.1016/j.jcv.2016.05.011. PubMed PMID: 27270127.
20. Bartlett JMS, Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: Bartlett JMS, Stirling D, editors. *PCR Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2003. p. 3-6.
21. Watson, J, D.; Baker, T. A. (2004). *Molecular Biology of the Gene (Fifth edition).* San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 0-321-22368-3.
22. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215:403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2. PubMed PMID: 2231712.
23. Madden TL, Tatusov RL, Zhang J. Applications of network BLAST server. *Meth.*

Enzymol. 1996, 266:131-141. PubMed PMID: 8743682.

24. McGinnis S, Madden TL. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2004,32:W20-W25. doi: 10.1093/nar/gkh435. PubMed PMID: 15215342. PMCID: PMC441573.

25. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, et al. A Prediction Rule to Identify Low-Risk Patients with Community-Acquired Pneumonia. *New England Journal of Medicine.* 1997; 336(4):243-50. doi: 10.1056/NEJM199701233360402. PubMed PMID: 8995086.