



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL GENERAL
“DR MANUEL GEA GONZÁLEZ”

“DETERMINACIÓN DE PREVALENCIA DE METAPNEUMOVIRUS EN
NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS CON NEUMONÍA DE LA COMUNIDAD”

T E S I S
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIDAD DE PEDIATRIA

P R E S E N T A
DRA. CESIAH GARCÍA MARTÍNEZ

ASESOR:
DR. GERARDO FLORES NAVA

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Hospital General Dr. Manuel Gea González y en la Sección de virología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias bajo la Dirección del Dr. Gerardo Flores Nava.

Este trabajo de Tesis con No. PROT- 21-36-2006, presentado por la Dra. Diana Paola Franco Almaraz y que continua la sustentante Dra. Cesiah García Martínez y que se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. Gerardo Flores Nava, y la División de Investigación Clínica a cargo de la Dra. María del Pilar Mata Miranda y por con fecha del 05 de agosto del 2008 para su impresión final.

División de Investigación Clínica
Dra. María del Pilar Mata Miranda

Tutor principal
Dr. Gerardo Flores Nava

Autorizaciones

Dr. Alfonso Galván Montaña
Dirección de Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de enseñanza
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Antonio Lavallo Villalobos
Titular del curso de Pediatría
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Gerardo Flores Nava
Tutor principal
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

“Determinación de prevalencia de metapneumovirus en niños menores de 5 años con neumonía de la comunidad”

Colaboradores:

Nombre: Dra. María Eugenia Manjares Z.

Firma: _____

INDICE

Glosario	VI
Relación de figuras y tablas.....	VII
Resumen	VIII
Abstract.....	IX
1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Generalidades.....	2
2.2. Aspectos clínico.....	3
2.3. Diagnóstico virológico.....	3
3. Justificación	4
4. Hipótesis	4
5. Objetivos.....	4
5.1. Objetivo General.....	4
6. Material y Métodos.....	4
6.1. Tipo de estudio.....	4
6.2. Ubicación temporal y espacial.....	4
6.3. Criterios de selección de la muestra.....	4
6.4. Variables.....	5
6.5. Tamaño de la muestra.....	5
6.6. Procedimiento.....	6
6.7. Análisis estadístico.....	8
7. Resultados.....	8
8. Discusión	13
9. Conclusiones	14
10. Perspectivas	14
11. Bibliografía.....	15
12. Anexos.....	16
12.1. Anexo No. 1	16
12.2. Anexo No. 2.....	17

GLOSARIO

DEFINICIONES

1. NEUMONÍA: La neumonía es la infección del parénquima pulmonar producida por un agente infeccioso. La puerta de entrada del agente infeccioso suele ser la vía aérea.
2. BRONQUIOLITIS: La bronquiolitis que es una enfermedad inflamatoria de la vía aérea periférica, afecta al bronquiolo terminal y respiratorio; entidad que por lo general se encuentra presente en una amplia gama de entidades de causa conocida, así como desconocida
3. METPNEUMOVIRUS: Se trata de un virus, de la familia paramoxiviridae y se caracteriza por su genoma 3'- N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'. Se ha aislado generalmente en muestras de las vías respiratorias.
4. PROTEÍNA C REACTIVA: técnica de biología molecular mediante la cual un pequeño fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) se clona o duplica varias veces para obtener copias múltiples.
5. INMUNOELECTROFLORESIS: Es una prueba que detecta la presencia o ausencia de inmunoglobulinas en la sangre y evalúa su carácter cualitativo (monoclonal contra policlonal).
6. PREVALENCIA: es el número total de los individuos que presentan un atributo o enfermedad en un momento o durante un periodo dividido por la población en riesgo de tener el atributo o la enfermedad en ese punto en el tiempo o en la mitad del periodo.

ABREVIATURAS

1. MPVH: Metapneumovirus
2. PCR: prueba de cadena de reacción de polimerasa.
3. IRA: infección de vías aéreas altas
4. VSR: virus sincitial respiratorio
5. ECP: efecto citopático
6. EtOH: etanol
7. ADN: ácido desoxirribonucleico.
8. ARN: ácido ribonucleico
9. TMP-SMX: trimetoprim con sulfametoxazol.

RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

GRAFICA 1. Porcentaje por sexo.

TABLA 1. Datos demográficos de los pacientes.

GRAFICA 3. Síntomas.

TABLA 2. Cuadro clínico.

TABLA 3. Cultivo de matapneumovirus.

RESUMEN

Sobre la base de publicaciones acerca de la circulación de un nuevo virus respiratorio, metapneumovirus humano (MPVH), se decidió investigar su presencia en muestras respiratorias de niños ingresados en el Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Objetivo: Determinar la prevalencia de metapneumovirus en niños menores de 5 años de edad con neumonía de la comunidad o bronquiolitis.

Material y métodos: Se obtuvo una muestra de 65 pacientes, durante 2 periodos, del 1 de enero al 30 de septiembre del 2006, y del 1 de mayo del 2007 al 30 de junio del 2008. Se tomó muestra nasal y/o faríngea, realizándose prueba de cadena de reacción de polimerasa (PCR), inumoelectroforesis y cultivo del virus.

Resultados: La prevalencia de metapneumovirus fue del 6.1%. Se encontró que el cuadro clínico es variable, predominando en pacientes con muestra positiva para metapneumovirus la presencia de tos en el 50% de los casos y rinorrea hialina en el 75%. Todos los pacientes con resultado positivo fueron alimentados al seno materno. El 50% de los pacientes recibió tratamiento antimicrobiano previo a su ingreso.

Discusión: La prevalencia del metapneumovirus varía de acuerdo a la situación demográfica, desde el 5 al 20%; por lo cual podemos decir que nuestra muestra coincide con la bibliografía internacional. El cuadro clínico es similar al que podemos encontrar en otros virus, variando su severidad. Se continua utilizando antimicrobianos injustificadamente en pacientes con infecciones virales. La alimentación al seno materno parece no haber influido como factor protector contra invasión de este patógeno.

Conclusiones: El metapneumovirus forma parte la etiología de neumonía en niños, con prevalencia similar a nivel internacional. El diagnóstico mediante pruebas de laboratorio es útil ya que clínicamente puede ser indistinguible de otras entidades virales, logrando asociar al metapneumovirus a infecciones de vías aéreas que pueden ser graves y que aparentemente van en incremento y será motivo de estudio para terapéuticas preventivas.

ABSTRACT

On the basis of publications about the movement of a new respiratory virus, human metapneumovirus (MPVH), it was decided to investigate its presence in respiratory samples of children admitted to the General Hospital Dr. Manuel Gea Gonzalez. In Mexico there are no statistics on the frequency of metapneumovirus.

Objective: To determine the prevalence of metapneumovirus in children under 5 years of age with pneumonia or bronchiolitis.

Materials and methods: We obtained a sample of 65 patients, for two periods, from January 1 to September 30th, 2006 and from May 1st, 2007 to June 30th, 2008. Was conducted sampling and nasal pharyngeal testing of polymerase chain reaction (PCR), immunoelectrophoresis and cultivation of the virus.

Results: The prevalence of metapneumovirus was found 6.1%. The present study found that the clinical picture is variable, with a predominance for patients with positive sample for the presence of metapneumovirus cough in 50% of cases and rhinorrhea hialina at 75%. All patients with positive results were breast fed. 50% of patients received antibiotic treatment prior to their income.

Discussion: metapneumovirus prevalence varies according to the demographic situation, from 5 to 20%, we can say that coincides with the international literature. The clinical manifestations presented in our patients are very similar than we find in other viruses, varying severity. Use of antimicrobials are unjustifiably in patients with viral infections. Breast feeding does not seem to have influenced as protective factor against invasion of this pathogen.

Conclusions: The metapneumovirus is part of the etiologic agents of pneumonia in children, its prevalence is similar to that published in other countries. Extending the diagnostic laboratory is useful for identification of the etiological agent as it can be clinically indistinguishable from other viral entities, associate at the metapneumovirus infections airways that can be serious and that apparently go in and may increase in future be a matter of study for preventive steps.

1. INTRODUCCIÓN

El análisis de la etiología de las infecciones respiratorias revela una más alta frecuencia de etiología viral respecto de la bacteriana; ésta es aproximadamente del 30% en niños menores de 5 años y una importante proporción de infecciones respiratorias de este grupo etario queda sin identificación de una etiología determinada (1).

La secuencia de hechos que han conducido a la demostración de un nuevo Paramyxovirus asociado a enfermedad respiratoria: MPVH, (metapneumovirus), se descubrió por Van Den Hoogen et al en Holanda y seguidamente fue aislado en niños australianos y de América del Norte. Se cree que la infección ocurre durante la edad pediátrica en los primeros años de vida, aunque los factores de riesgo es específicos están aún por determinar. (1,2).

En México no existen estadísticas sobre la frecuencia de metapneumovirus por lo cual se efectúa un estudio ambispectivo (prospectivo y retrospectivo), descriptivo, abierto, observacional y transversal. Así, de acuerdo a la prevalencia en estudios previos, se planeó una muestra de 156 pacientes, realizándose en dos periodos de tiempo, el primero comprendido del 1 de enero al 30 de septiembre del 2006, y el segundo del 1 de mayo del 2007 al 30 de junio del 2008.

Se contó con criterios de selección, exclusión y eliminación, llevados a cabo meticulosamente al interrogatorio y en base a expediente clínico para captura de variantes, obteniéndose una muestra de 65 pacientes, 10 de la primera fase del estudio y 55 de la segunda.

Todas las muestras, nasal y/o faríngea fueron tomadas en los pacientes hospitalizados y fueron procesadas en el departamento de virología del Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias, obteniendo mediante prueba de cadena de reacción de polimerasa (PCR), inumoelectroforesis y cultivo del virus los resultados.

Mediante el análisis de las variables se describen las características clínicas, paraclínicas y terapéuticas empleadas en niños menores de 5 años de edad con diagnóstico de neumonía de la comunidad o bronquiolitis. Así mismo se establece la prevalencia para metapneumovirus en el Hospital General Manuel Gea González, durante el periodo descrito a fin de incrementar nuestro conocimiento sobre este nuevo patógeno viral respiratorio.

2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

2.1 GENERALIDADES

Las infecciones respiratorias en los humanos son causadas por numerosos agentes principalmente virus, dentro de estos la familia paramoxoviridae ocupa los primeros lugares.

La familia paramoxiviridae se divide en dos subfamilias: paramoxiviridae y pneumoviridae, esta última a su vez se divide en los géneros pneumovirus y metapneumovirus. Los pneumovirus incluyen a un grupo de los patógenos más importantes productores de infecciones respiratorias agudas (IRA) altas, así como infecciones de tracto respiratorio bajo como bronquiolitis y neumonías en niños menores de 5 años (3,4,5), el Virus Sincitial Respiratorio (VSR) es el principal representante de este grupo. La infección por VSR se ha reportado en todo el mundo y causa epidemias anuales que aparecen durante el final del otoño, invierno y primavera. La infección por VSR tiene un amplio espectro de manifestaciones respiratorias, las más severas son neumonía, bronquiolitis y traqueobronquitis.

Los virus de esta familia tiene un genoma de ARN de cadena sencilla no segmentado y de polaridad negativa, en el caso de los pneumovirus codifica para 11 proteínas, dos de las cuales son glucoproteínas: la Proteína F, responsable de la fusión de la membrana viral a la célula y de la formación de sincitios en cultivos celulares y la glucoproteína de unión o proteína G, estas proteínas son importantes ya que contra ellas va dirigida la respuesta inmune. El género metapneumovirus a diferencia de los pneumovirus carece de las proteínas no estructurales NS1 y NS2 y el origen de su genoma es para el VSR es 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5' y para el metapneumovirus es 3'- N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'. (6,7).

Los virus del género metapneumovirus no se habían asociado a enfermedad en mamíferos, pero en 2001 en Suiza, Van Den Hoogen y cols., identificaron metapneumovirus en niños con enfermedad de tracto respiratorio (8).

En México como en todo el mundo, las infecciones respiratorias agudas son un grave problema de salud pública, principalmente en los niños, por lo tanto es muy importante conocer la etiología de las neumonías de la comunidad. En general, las neumonías en este grupo de edad se han asociado con alta frecuencia al origen viral, específicamente con VSR, que se ha encontrado hasta en el 30% de las neumonías, sin embargo en algunos casos no se logra identificar al agente por lo que se asume que pueden existir otros agentes virales aun no identificados, dentro de los cuales seguramente se encuentra el metapneumovirus. Según distintos estudios se ha logrado determinar que MPVH produce entre 5-20% de los cuadros respiratorios en niños donde otro agente viral no ha podido ser reconocido.

2.2 ASPECTOS CLÍNICOS

Los datos clínicos útiles que describen la enfermedad causada por MPVH indican un espectro de enfermedad que van desde una infección asintomática hasta una bronquitis grave. El primer aislado de este virus se obtuvo de muestras respiratorias sometidas a cultivo viral durante invierno (8).

Estudios de seroprevalencia desarrollados en muestras séricas archivadas desde 1958, revelan que el 25% de todos los niños que fueron analizados en Holanda de entre 6 y 12 meses tienen anticuerpos frente a MPVH; en niños de 5 años, el 100% de los pacientes mostraron evidencia de infección pasada. Esto se repitió en varios países, y sus contribuciones apuntan a que las focalidades preponderantes son la bronquiolitis y las infecciones de vías respiratorias bajas, y según la información adicional relacionada con la patogénesis y la epidemiología, el patrón de curso en brotes será probable en los próximos años (1).

Entre otros hallazgos, estos niños pueden presentar rinorrea, congestión nasal, eritema faríngeo, mialgia, tos y fiebre; y, en casos más graves, sibilancias, disfonía, estridor, dificultad respiratoria, bronquiolitis, neumonía y fallo respiratorio (9,10).

2.3 DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

El descubrimiento de MPVH fue resultado del cuidadoso análisis molecular desarrollado por Van Den Hoogen, et al (8), en un cultivo celular que estos autores mantenían con la finalidad de aislar un paramixovirus. A partir de los aislados se identificaron secuencias virus-específicas usando una modalidad de técnica de amplificación molecular basada en PCR.

Poco a poco se van optimizando reactivos que posibilitan la detección genómica de MPVH en muestras clínicas o en cultivos celulares inoculados con muestras respiratorias.

El diagnóstico se ha realizado mediante cultivo celular, serología y microscopía electrónica; sin embargo, nuevas técnicas moleculares como la detección de ácidos nucleicos parecen ser el método ideal de detección. La técnica de reacción de cadena de la polimerasa (PCR) en este momento es la prueba ideal para el diagnóstico y, dentro de éstas, la nueva RT-PCR (real time PCR) o PCR de tiempo real es la más recomendada y la de mayor sensibilidad (11).

En la actualidad, no existe tratamiento médico disponible, y muchas interrogantes permanecen sin respuesta. Por ahora los esfuerzos se concentran en el desarrollo y perfeccionamiento de nuevas técnicas de aislamiento y detección, el tratamiento médico y el desarrollo de una vacuna eficaz; esta última quizá como el mejor método de prevención para la infección por MPVH.

3.JUSTIFICACIÓN.

La neumonía de la comunidad y la bronquiolitis son padecimientos que frecuentemente requieren hospitalizar a los niños que las padecen, su etiología es variable, los virus ocupan los primeros lugares a esta edad. El metapneumovirus es un agente cuya frecuencia en estos padecimientos aun no se ha determinado, sobre todo en México.

En México no existen estadísticas sobre la frecuencia con que el metapneumovirus es el agente etiológico en los niños con neumonía de la comunidad o con bronquiolitis. Por lo tanto sería de gran utilidad conocer dicha frecuencia.

4. HIPÓTESIS.

No requiere

5. OBJETIVO.

5.1 Objetivo General

Fue determinar la prevalencia de un nuevo género metapneumovirus como agente etiológico en un grupo de niños menores de 5 años de edad con neumonía de la comunidad o bronquiolitis que ingresaron al Hospital General Dr. Manuel Gea González en el periodo comprendido del 1 de enero del 2006 al 30 de septiembre del 2006 y del 1 de mayo del 2007 al 30 de junio del 2008.

6. MATERIALES Y MÉTODO.

6.1 TIPO DE ESTUDIO.

- a) Ambispectivo (Prospectivo y retrospectivo)
- b) Descriptivo.
- c) Abierto.
- d) Observacional.
- e) Transversal.

6.2 UBICACIÓN TEMPORAL Y ESPACIAL (Universo de estudio).

Los niños menores de 5 años de edad que ingresaron con diagnóstico de neumonía de la comunidad (incluye bronquiolitis), en el área de hospitalización del Hospital General Dr. Manuel Gea González, del 1º de enero de 2006 al 30 de septiembre del 2006 y del 1 de mayo del 2007 al 30 de junio del 2008.

6.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA:

Criterios de Inclusión.

Todos los niños menores de 5 años de edad que ingresaron con diagnóstico de neumonía de la comunidad (incluye bronquiolitis) en el área de hospitalización de Pediatría de la División de Pediatría Clínica del Hospital General Dr. Manuel Gea González del 1º de enero del 2006 al 30 de septiembre del 2006 y del 1 de mayo del 2007 al 30 de junio del 2008.

Criterios de exclusión.

Pacientes con neumonía de la comunidad cuyos padres no aceptaron firmar el consentimiento informado.

Pacientes con neumonía de la comunidad con algún padecimiento pulmonar crónico (mucoviscidosis, asma bronquial, displasia broncopulmonar, etc).

Pacientes con neumonía de la comunidad con alguna malformación pulmonar congénita o síndrome que altere la función pulmonar.

Criterios de eliminación.

Pacientes a quienes se les tomó la muestra de aspirado nasal, pero cuyo resultado se reporte como “muestra insuficiente o inadecuada para el estudio”.

Pacientes con neumonía de la comunidad incluidos inicialmente pero que decidieron retirarse del estudio en cualquier momento.

Aquellos expedientes que no contaron con la documentación completa.

6.4 VARIABLES

DEFINICIÓN DE VARIABLES

Independientes. Neumonía y datos clínicos		Dependientes. Anticuerpos contra metapneumovirus	
Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)	Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)
Edad	Meses o años (ordinal)	Positividad por PCR a metapneumovirus	Si, no. (nominal)
Sexo	Masculino o femenino (nominal)		
Diagnóstico	Neumonía o bronquiolitis (nominal)		
Datos clínicos	Tos, fiebre, etc. (nominal)		
Tiempo de evolución	Días (ordinal)		
Días hospital	ordinal		

6.5 TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Para calcular el tamaño de la muestra se tomó en base que la frecuencia con que se presenta el evento es de 260 casos en un tiempo similar previo al estudio, con un margen de error 5% y un nivel de confianza del 95%, se obtuvo un tamaño de muestra de 156; actualmente se cuenta con una muestra de 65 pacientes, 10 pacientes del primer periodo de estudio y 55 pacientes del segundo periodo. Se valorara complementar la muestra en estudios posteriores.

6.6 PROCEDIMIENTOS (MÉTODOS DE LABORATORIO)

A todos los pacientes se les tomó una muestra de 3 a 4ml de moco por aspirado nasal con una bomba de vacío para determinar anticuerpos contra metapneumovirus mediante prueba de cadena de reacción de polimerasa (PCR), inumoelectroforesis y cultivo del virus.

La muestra se colocó en un medio transporte y se trató con N-acetil- cisteína con el fin de disolver el moco y que se libere la mayor cantidad de células. Posteriormente se llevó a un tubo de ensayo con medio de transporte Leibowitz o una solución balanceada de sales y enriquecidas con 0.5% de proteínas (albúmina o gelatina) y antibióticos. Por cada mililitro de muestra se adicionó 0.1ml de una solución que contiene 10,000 UI/ml de penicilina y 50,000 ug/ml de estreptomina, también se adicionó anfotericina B en una concentración final de 10ug/ml. Posterior a éste se metió a cultivo celular, el VSR en células Hep-2 y el metapneumovirus en células vero, se separó el efecto citopático (ECP) correspondiente (células gigantes multinucleadas o sincitios) y se extrajo en ARN y se tipificaron ambos virus por RT-PCR.

RT-PCR.

Para esta prueba se requirió la propagación viral utilizando células HEp-2 para el VSR, con una multiplicidad de infección de 0.01. Para el Metapneumovirus se utilizaron células vero con la misma multiplicidad de infección. Cuando el ECP fue apreciable se inició la extracción del ARN. Como control se utilizó otra botella de Hep-2 y Vero sin infectar y tratadas bajo las mismas condiciones para VSR y Metapneumovirus respectivamente.

EXTRACCION DE ARN.

Entre el tercer y décimo día de detectado el ECP se pudo extraer el ARN total, con el fin de estandarizar tiempos, utilizamos las células en el primer día en que apareció el ECP. La monocapa de células se lavo 2 veces con PBS. Se utilizó 1 ml de trizol (GIBCO BRL) por cada 10cm² o 10⁷ células a temperatura ambiente. Con ayuda de un gendarme, se desprendieron las células de la base de la caja y se transfirieron a un tubo Eppendorf libre de ARNasa. Se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 200µl de cloroformo por cada mililitro de trizol, agitándose suavemente 15 segundos y se incubaron de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase inferior era el cloroformo y la fase superior correspondió a la fase acuosa que contiene el ARN. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo se agregó 500µl de isoproterenol (GIBCO BRL) por cada mililitro de trizol, se agitó suavemente y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, para luego centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C, de lo cual se obtuvo una pastilla gelatinosa. Se quitó el sobrenadante y la pastilla de ARN se lavó tres veces con 10µl de etanol (EtOH) al 70% diluido con agua de dietil bicarbonato (DEPC). Se centrifugó a no más de 7500 rpm por 5 minutos a 4°C. La pastilla de ARN se secó extrayendo el EtOH al 70% con una pipeta Pasteur afilada de la punta y auxiliada por una bomba de vacío. Para asegurar que no quedaran

residuos de EtOH al 70%, se dejó secar de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se disolvió el botón en 30µl de agua DEPC. Cuando fue difícil resuspender se colocaron los tubos 10 minutos a 55°C. Se incubaron con ADNasa (GIBCO BRL) libre de ARNasa a 37°C por 30 minutos. Se incubaron a 90°C por 10 minutos para inactivar la acción de la ADNasa. Finalmente se cuantificó el ARN total por espectrometría a una densidad óptica de 260nm. (3)

RETROTRANSCRIPCIÓN.

Se prepararon tubos con los reactivos y cantidades necesarias. Se incubó a 70°C por 10 minutos y se pasó a hielo por un minuto. Por separado se preparó una mezcla etiquetada como MIX, se agregó 7µl de MIX a cada uno de los tubos muestra, control positivo y control negativo y se agitó suavemente. Los tubos se incubaron 5 minutos a 42°C. A cada tubo se le adicione 1µl (200U) de enzima transcriptasa reversa SuperScript II (GIBCO BRL). Suavemente se mezcló y se incubó durante 50 minutos a 42°C. Para detener la reacción se incubó a 70°C por 15 minutos y se pasó a hielo. Se agregó a cada tubo 1µl de ARNasa (GIBCO BRL) y se incubó a 20 minutos a 37°C para obtener el ADNc. A partir de esta reacción se pudo iniciar la PCR. (3)

PCR.

Para esta prueba, se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Gottshalk con ligeras modificaciones. A partir del ADNc obtenido en la retrotranscripción, se corrió la muestra con el fin de encontrar las bandas correspondientes al subtipo del virus; 217 y 283 pares de bases para el tipo A o B de VSR respectivamente. Se preparó un tubo de Ependorf etiquetado con MIX y la muestra correspondiente para la tipificación del VSR y el Metapneumovirus.

Las secuencias de los diferentes oligonucleótidos para VSR fueron: RSV1 (5'ATGCAACAAGCCAGATCAAG3') que amplificaron el segmento del gen de la proteína G que se encuentra entre las 248 y 267 pares de bases del VSR tipo A; RSV2 (5'ACTCATCCAACAACCCACA3') para el segmento del gen de la proteína G antisentido contenido entre 511 y 530 pares de bases.

También se utilizaron iniciadores para el control de la PCR CI y CII.

CI (5'GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC3') y CII (5'GATGAGTTCGTGTCCGTAGAAAGTGG3) que amplificaron 500 pares de bases del gen del fago λ. Para comprobar el producto de amplificación se corrió una electroforesis en gel de azarosa al 1% y para teñir el ADN se utilizó Bromuro de Etidio y se observó en un sistema Ultralum Electronic Multi Wave Transiluminator. (3) Se consideró como neumonía por metapneumovirus cuando la muestra de PCR, inmunoelectroforesis o cultivo fueron positivos al mismo.

6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO (VALIDACIÓN DE DATOS).

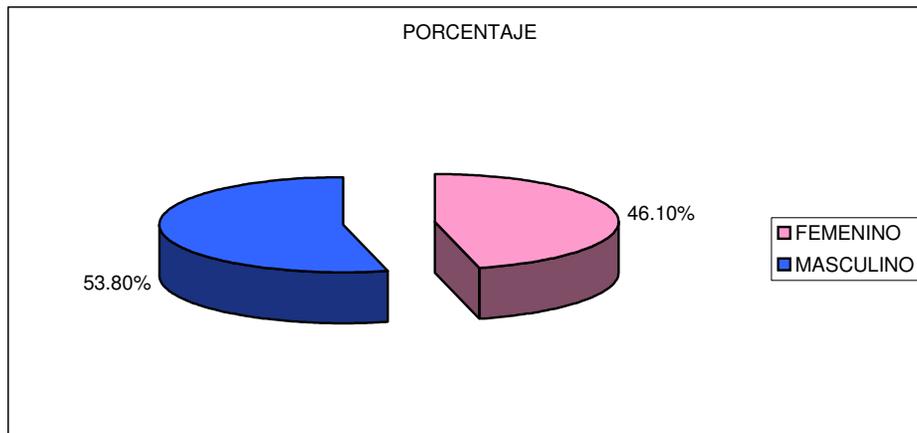
Se utilizó estadística descriptiva: se obtuvieron medidas de tendencia central y dispersión: rango, media, mediana, moda, desviación estándar, proporciones o porcentajes.

Se determinaron cuáles son las características clínicas del grupo de niños con metapneumovirus positivos.

7. RESULTADOS.

En las fechas antes mencionadas se obtuvieron 10 muestras de pacientes en el primer periodo y 55 muestras, incluyéndose el total de estas y obteniendo los siguientes resultados.

Se obtuvieron 65 muestras de pacientes los cuales 30 fueron mujeres y 35 hombres (gráfica 1), quienes tenían una edad promedio de 13.2 meses con una edad mínima de 1 mes y una máxima de 60 meses.



GRAFICA 1. Porcentaje por sexo

El peso de los pacientes tuvo un promedio de 8.2 kg, con un peso mínimo de 1.820 kg. y un peso máximo de 14.5 kg., cabe mencionar que se presentó además una desnutrición del 30.8% en los pacientes.

TABLA 1. Datos demográficos de los pacientes

Edad (meses)	13.2 +/- 12.2* (1-60)**
Peso(kg)	8.2+/-2.8* (1.82 14.5)**
Sexo (F:M)	30:35 (1:1.1)
Días de estancia	5.6+/-4.5*(1-30)**

*Media +/- Desvest

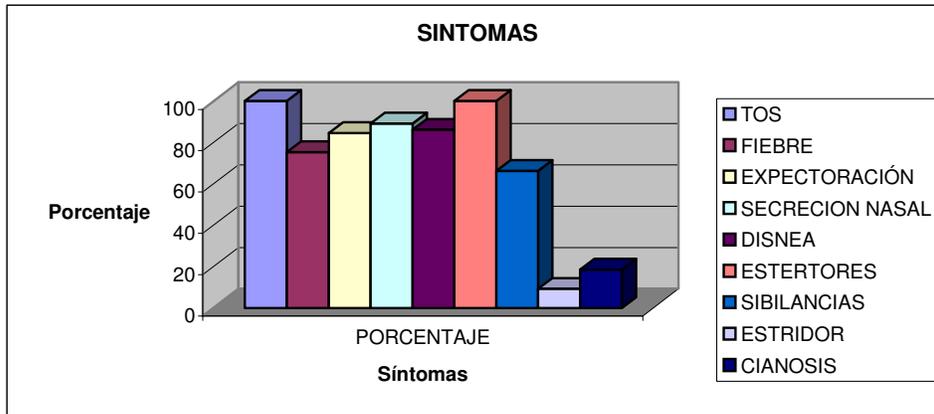
** Rango

Como un antecedente de importancia, se tomó en cuenta el tiempo que los pacientes estuvieron alimentados al seno materno, se reportó por medio de la encuesta un promedio de 7 meses con un tiempo mínimo de 1 meses y un tiempo máximo de 48 meses; el 23% de los pacientes no fueron alimentados al seno materno.

Se interrogó a la madre sobre episodios previos de infecciones de vías aéreas superiores, 22% de los pacientes no había presentado IVAS previas, el resto se reporta un promedio de 1.4 episodios previos, cabe mencionar que un paciente presentaba un antecedente de 6 episodios de IVAS previas

Sobre Infecciones de vías aéreas bajas 42 pacientes (64.6%) presentaron este antecedente con 4 episodios máximos y 1 episodio previo como mínimo.

En cuanto al cuadro clínico se observó lo siguiente:



GRAFICA 3. Síntomas

La tos se presentó en el 100% de los pacientes con 9 días en promedio con un mínimo de 1 días de evolución, hasta un máximo de 90 días, . Se reportó tos productiva en un 84.6%, de la cual presentaba expectoración blanquecina en un 50.9% , amarilla en un 34.6% y verdosa en el 12.7% .

Se reportó fiebre con un promedio de duración de 3.5 días con una duración máxima de 15 días y en 16 pacientes no se presentó fiebre ningún día.

Secreción nasal se presentó en un 89.2% de los pacientes de los cuales 55.2% tenía características hialinas, 34.5% amarilla Y 10.3% verdosa (gráfica 3).

A todos los pacientes se les evaluó datos de dificultad respiratoria por medio de la valoración de Silverman encontrándose un promedio de 2.3 puntos con un mínimo de Silverman de 1 y un máximo de 4, solo un paciente no presentó dificultad respiratoria.

De los pacientes 86.2% se presentaron con disnea y 13.8% sin disnea.

El 100% de los pacientes presentó estertores, estridor 9.2%, cianosis 18.5% y sibilancias 66.2%.

TABLA 2. Cuadro Clínico	No. de pacientes
Tos	65 (100%)
Fiebre	49 (75.3%)
Expectoración	55 (84.6%)
Secreción nasal	58 (89.2%)
Disnea	59 (86.2%)
Estertores	10 (100%)
Sibilancias	43 (66.2%)
Estridor	6 (9.2%)
Cianosis	12 (18.5%)

Se reportó que un 46.2% de los pacientes había sido tratado previamente con esquema antibiótico; el 26.6%(8) con amoxicilina simple, el 13.3%(4) con amoxicilina con clavulanato, 3.3%(3) con penicilina, 1.5%(1) con clindamicina, 1.5%(1) con cefalotina, 1.5%(1) con cefalexina, 1.5%(1) desconocían el medicamento. En el 13.3%(1) se utilizó doble esquema antimicrobiano.

Durante su hospitalización se dio tratamiento antibiótico al 55.4%, 47.2%(17) de estos recibieron cefuroxima, 27.7%(10) claritromicina , 2.7%(1) clindamicina y 2.7%(1) ampicilina. El 13.8%(5) recibieron doble esquema antimicrobiano.

A su ingreso se les realiza radiografía de tórax en la cual se observa infiltrado bilateral difuso en el 63%(41), infiltrado parahiliar acompañado de hiperinsuflación en el 13.9%(9), infiltrado micronodular bilateral en el 12.3%(8), condensación basal en el 4.6%(3), atelectasia en el 4.6%(3) y derrame paraneumónico en el 1.5%(1). Todos los pacientes se encontraron hospitalizados con un promedio de estancia hospitalaria de 5.6 días, con un mínimo de 1 días y un máximo de 30 días.

Todos los pacientes tuvieron tratamiento de soporte con nebulizador, 86.1%(47) con micronebulizaciones de los cuales a 66.2%(43) se le administró broncodilatador y al 29.3% (19) esteroide.

Se les realiza toma de muestra de secreciones, se reportaron cultivos de los cuales 6.2%(4) se reportaron Metapneumovirus positivo y 93.8%(61) negativos.

Tabla 3. Cultivos de Metapneumovirus	
Positivos	4 (6.2%)
Negativos	61 (93.8%)

Pacientes con cultivos positivos.

Se obtuvieron 4 muestras positivas de los cuales 3 fueron mujeres y 1 hombre, quienes tenían una edad promedio de 34 meses con una edad mínima de 2 meses y una máxima de 60 meses.

El peso de los pacientes tuvo un promedio de 11.7 kg, con un peso mínimo de 7.35 kg. y un peso máximo de 14.5 kg., cabe mencionar que de estos pacientes, 25% (1) presentaban desnutrición. Estos pacientes se les dio alimentación por seno materno al 100% en un promedio de 4.7 meses con un tiempo mínimo de 1 mes y un tiempo máximo de 7 meses.

Solo el 50%(2) de los pacientes tenían antecedentes de IVAS con una uno de ellos con 6 episodios y el otro con 2 episodios previos. Ninguno tenía antecedente de infección de vías aéreas bajas.

En cuanto al cuadro clínico se observó lo siguiente:

La tos con una presencia de 6 días en promedio, con un mínimo de 6 días de evolución, hasta un máximo de 15 días. Se reportó tos productiva en un 50%(2), el cual presentaba expectoración blanquecina.

Secreción nasal se presentó en un 75%(3) de los pacientes, con características hialinas. Se reportó fiebre con un promedio de duración de 2.2 días con una duración máxima de 4 días.

Su valoración de Silverman presentó un promedio de 2, con Silverman máximo 3 y mínimo de 2.

El 50%(2) de los pacientes presentaron disnea, el 100%(4) presentó estertores, el 25%(1) sibilancias y el 25%(1) cianosis. Ninguno presentó estridor.

Se reportó que 50% (2) de los pacientes había sido tratado previamente, uno con amoxicilina simple y el otro no especificado. Durante su hospitalización se dio tratamiento antibiótico al 50%(2) de los pacientes, con esquema distinto, uno cefuroxima y el otro claritromicina.

Todos los pacientes tuvieron tratamiento de soporte con nebulizador, 100%(4) con micronebulizaciones, 75%(3) con mucolítico y 25%(1) con broncodilatador, a ninguno se le dio esteroide.

Pacientes con cultivos negativos.

Se obtuvieron 61 muestras negativas de las cuales 27 fueron mujeres y 33 hombres, quienes tenían una edad promedio de 11.9 meses con una edad mínima de 1 mes y una máxima de 48 meses.

El peso de los pacientes tuvo un promedio de 8kg, con un peso mínimo de 21.820 kg. y un peso máximo de 13.3 kg., cabe mencionar que de estos pacientes 31.1% (19) presentaban desnutrición.

De estos pacientes se les dio alimentación por seno materno al 75.4%(46); en un promedio de 7.2 meses con un tiempo mínimo de 1 mes y un tiempo máximo de 48 meses.

Las infecciones de vías aéreas superiores se presentaron en 80.3% (49) de los pacientes con un mínimo de un episodio y un máximo de 5 episodios previos.

El 68.8%(42) de los pacientes tenían el antecedente de episodios previos de infecciones aéreas bajas.

En cuanto al cuadro clínico se observó lo siguiente:

La tos con una presencia de 9.3 días en promedio, con un mínimo de 1 día de evolución, hasta un máximo de 30 días. Se reportó tos productiva en un 86.8%(53), de la cual presentaba expectoración blanquecina en 42.7%(26), verdosa en el 11.5%(7) y amarilla en el 32.8%(2).

Secreción nasal se presentó en un 90.1%(55) de los pacientes, 52.7%(29) de características hialinas, 36.4%(20) amarillas y 10.9%(6) verdosas.

Se reportó fiebre con un promedio de duración de 3.6 días con una duración máxima de 15 días.

Su valoración de Silverman se presentó un promedio de 2.4, con Silverman máximo de 4 y mínimo de 1.

En el 54% de los pacientes se presentó disnea, 100% de los pacientes presentó estertores, el 18% cianosis, el 8.2% estridor y el 68.8% presentaron cianosis.

Se reportó que 45.9% (28) de los pacientes había sido tratado previamente, se administró en el 25% (7) amoxicilina simple, en el 17.8%(5) amoxicilina con clavulanato, en el 10.7%(3) claritromicina, 10.7%(3) penicilina y en el 3.6%(1) se administró cefalotina, cefalexina, fosfomicina, TMP-SMX, clindamicina y gentamicina para cada uno de ellos . el 10.7% (3) se trató con doble esquema antimicrobiano

Durante su hospitalización se dio tratamiento antibiótico al 55.7%(34) de los pacientes, con esquema de claritromicina en el 26.5%(9), cefuroxima en el 17.6%(6), ampicilina y clindamicina en el 2.9%(1) para cada uno de ellos. En el 14.7% (5) se utilizó doble esquema antimicrobiano.

Todos los pacientes tuvieron tratamiento de soporte con nebulizador, con micronebulizaciones, 70.5%(43) y con broncodilatador 68.8%(42) En el 31.1%(19) de pacientes se administró esteroide.

8. DISCUSIÓN

Los datos sobre la prevalencia de la infección por metapneumovirus es distinta dependiendo los métodos de cálculo utilizados. La tasa que se reporta en los países es variable; Australia 1.5%, Israel 28%, Estados Unidos 20% y en Italia hasta 25%. La incidencia en Canadá es similar a la que se ha encontrado en este estudio, con una incidencia de 7.1 %. En nuestra serie al momento se reporta el 6.2%.

El cuadro clínico en todos los países es similar, caracterizado por dificultad respiratoria, tos y rinorrea principalmente. Se han reportado casos en los que se ha requerido ventilación mecánica, en nuestro protocolo se reportaron 3 pacientes que lo requirieron.

Se tomaron las muestras, en su mayoría, durante el periodo de invierno y a principio de la primavera, ya que es la mayor incidencia de neumonías en nuestra institución, tal como se describe en la bibliografía nacional e internacional, por lo que se valorará continuar con la investigación durante este periodo para incrementar el tamaño de la muestra. Parece no haber factor protector para metapneumovirus en niños alimentados al seno materno, ya que en nuestra muestra todos los niños que resultaron positivos habían recibido seno materno entre 1 y 7 meses, sin embargo, este rubro debe evaluarse en una muestra mayor de pacientes.

Durante nuestro estudio se reportó un promedio de estancia de 7.1 días, en contraste con los estudios previos de Monrrow, et al. , en el que se reporta un promedio de 17 días de estancia.

En otros estudios se ha reportado también corta estancia y una evolución benigna de la enfermedad. Mientras tanto, el MPVH se convierte en un nuevo agente

etiológico que debe considerarse en el abordaje diagnóstico del niño con bronquiolitis o infección del tracto respiratorio superior e inferior.

9.CONCLUSIÓN.

Los datos que se obtuvieron en el estudio confirman que el metapneumovirus es agente etiológico de neumonías de la comunidad en niños menores de 5 años. La prevalencia varía de acuerdo al país de 5 al 20%, por lo cual nuestros resultados coinciden con la bibliografía internacional. La sintomatología es muy variada ya que puede ir desde una infección de vías aéreas superiores hasta una bronquiolitis o una neumonía o bronquiolitis, en nuestra muestra solo se vieron pacientes con datos de dificultad respiratoria que requirieron hospitalización, aunque dentro de éstos la gravedad fue variada. La infección por metapneumovirus es similar a la causada por otros agentes virales, sobre todo con el virus sincitial respiratorio, ya que forman parte de la misma familia de virus, sin embargo con diferencia genómica; de ahí la importancia de determinar el impacto del metapneumovirus en nuestra población, a fin de promover estudios futuros para implementar terapéutica preventiva en grupos etarios vulnerables. Este estudio permitirá establecer la incidencia en nuestra población de metapneumovirus y considerarlo como agente etiológico.

10. PERSPECTIVAS

Se valorará continuar el estudio durante los meses siguientes, ya que se ha reportado su mayor incidencia durante invierno e inicios de primavera y a fin de culminar la muestra establecida. Se debe ampliar las posibilidades etiológicas en nuestro medio y para ello ya se cuentan con métodos diagnósticos en estos momentos para el aislamiento de virus, sin embargo el estudio de los mismos continúa siendo un reto por las mutaciones en su genoma, por lo cual el universo de estudio es amplio para futuros estudios en nuestro país así como el valorar el impacto de este patógeno para determinar la gravedad e inicio de investigación en cuanto a su prevención. Se cuenta en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” con la población necesaria para llevarlo a cabo, así como el apoyo de instituciones vecinas para dichos estudios virológicos como lo tuvimos en este estudio.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Mallimaci MC, Espul C, Sijvager C, Martínez N, Lazbal M, Cuello H, Cadario ME, Matson DO, Sabih .Infección respiratoria aguda por metapneumovirus humano en Ushuaia, Argentina, descripción del primer caso. Arch. argent. pediatr, 2006; 104(2):150-2
2. Eiros JM, Moreno ML, Bachiller R. Metapneumovirus: modelo de virus emergente en pediatría. Ped.rur.ext. 34(321), 2004: 256:260.
3. Peret CT, Hall CB, Schanabel KC, Golub JA and Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. J.Gen. Virol. 1998; 79 (Pt9):2221-9.
4. Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, Mc Connochie KM, Hildreth SW, et al. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. J. Infect. Dis. 1990; 162(6):1283-90
5. Cane PA, Pringle CR. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: a review of the use of reverse transcription- polymerase chain reaction in the analysis of genetic variability. Electrophoresis. 1995;16(3):329-33.
6. Collins PL, Mc Itosh K, Chanock R. Respiratory syncytial virus: In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Virology. 1st edition. Philadelphia – New York: Lippincott-Raven, 1996:1313-51
7. Pasty MK, Crowe Jr, JE and Graham BS. RhoA Interacts with the Fusion Glycoprotein of Respiratory Syncytial Virus and Facilitates Virus- Induced Syncytium Formation. J. Virol. 1999; 73(9):7262-70.
8. Van Den Hoogen B, C. De Jong J, Groen J, Kuiken T, De Groot R., A.M. Fouchier R, D.M.E. Osterhaus A. A New discovered human pneumovirus isoletes from young children with respiratory tract disease, Nat Med. 2001; 7:719-24
9. Brenda M Monrrow, Mark Hatherill, Heidi EM Smuts, Jane Yeats, Richard Pitcher, Andrew C Argent. Clinical Course of Hospitalised Children infected with Human Metapneumovirus and respiratory syncytial virus. Hurnal of Pediatrics and Child Health 2006, 42:174-178.
10. Liora Regev, Musa Hindiyeh, Lester M. Shulman, Asher Barak, Virginia Levy, Roberto Azar, Yael Shalev, Zehava Grossman y Ella Mendelson. Characterization of Human Metapneumovirus infections in Israel., Journal of Clinical Microbiology, Abril, 2006. 1484-1489.
11. Jartti T, Van den Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus ADME, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. Lancet 2002;360:1393-4.
12. Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. J Infect Dis 2003;187:785-90
13. Mackay IM, Jacob KC, Woolhouse D, Waller K, Syrmis MW, Whiley DM, et al. Molecular assays for detection of human metapneumovirus. J Clin Microbiol 2003;41:100-5.

12. ANEXOS

12.1 Anexo 1

HOJA DE COLECCIÓN DE DATOS.

Nombre de estudio: Determinación de prevalencia de metapneumovirus en niños menores de 5 años con neumonía de la comunidad"

Fecha de ingreso: _____ Fecha de egreso: _____
Fecha de toma de la muestra: _____
Nombre del paciente _____
Registro _____ Cama _____ Edad _____ Sexo _____
Peso al nacer _____ Peso actual _____ Percentila _____
Talla actual _____ Percentila _____
Desnutrición (No) (Si) grado _____
Tipo de desnutrición _____ Nombre del informante _____ Padre () Madre () Otro ()
Alimentado al seno materno (si) (no) cuanto tiempo: _____
Vacunas aplicadas
Sabin 1ª dosis () 2ª dosis () 3ª dosis () 1º refuerzo ()
Pentavalente 1ª dosis () 2ª dosis () 3ª dosis () 2ª refuerzo ()
BCG () Otras: _____

Cuadro y examen clínico.

Tos (No) (Si) días _____
Seca (No) (Si) Expectoración (No) (Si) Blanca (No) (Si) Amarilla (No) (Si) Verde (No) (Si) Estornudos (No) (Si)
Secreción nasal (No) (Si) Hialina (No) (Si) Amarilla (No) (Si) Verde (No) (Si)
Dolor retroauricular (No) (Si) Secreción ótica (No) (Si) Serosa (No) (Si) Amarilla (No) (Si) Fiebre (No) (Si) días _____
Disnea (No) (Si) Sibilancias (No) (Si) Estridor (No) (Si) Cianosis bucal (No) (Si) Estertores (No) (Si) Silverman: _____
Adenomegalias (No) (Si) Faringe roja (No) (Si) Amígdalas hipertróficas (No) (Si) Placas blanquecinas en faringe (No) (Si)
Tímpano normal (No) (Si) Tímpano rojo (No) (Si) Tímpano abombado (No) (Si)
Antibióticos previos (No) (Si) Cuales _____
Diarrea (No) (Si)
Cuadros previos de IVAS cuantos _____ en meses _____
Bronquiolitis previas (No) (Si), cuantos _____
Antecedente de importancia? _____
Hospitalización previa de IVA Bajas (No) (Si) cuantos: _____
Rayos X de tórax : _____
Días hospital: _____
Tratamiento: antibiótico (No) (Si), cual _____
Nebulizador (No) (Si), micronebulizaciones (No) (Si) con
Broncodilatador (No) (Si) cual _____
Esteroides (No) (Si), vía (oral) (IV) (inhalado)
Comentarios: _____

12.2 Anexo 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki y con la Ley General de Salud, título segundo. De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, CAPITULO I Disposiciones Comunes, Artículos 13 y 14.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio de respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como de investigación en menores de edad o incapaces de acuerdo con los artículos 34-39, Título Segundo, Capítulo III; con riesgo mínimo de acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los siguientes aspectos mencionados con el artículo 21:

Se me ha informado que en el Hospital General Dr. Manuel Gea González se está llevando a cabo un estudio para aislar e identificar un virus que se llama metapneumovirus en una población de niños menores de 5 años de edad con neumonía de la comunidad.

El estudio consiste en tomar una muestra de 3 a 4 mililitros de secreciones (flemas) de la faringe (garganta) a mi hijo que padece Neumonía, el primer día de su hospitalización en el piso de Pediatría. Esta muestra se enviará al laboratorio de virología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias para su proceso y el material que sobre de la muestra será desechado.

Este estudio se tiene un riesgo mínimo para la vida del paciente la vida del paciente (se puede presentar leve lesión de la mucosa al introducir sonda de aspiración) y no tiene costo alguno, es gratis.

Se me ha informado también que los resultados de dicho estudio serán publicados en algún medio de comunicación escrita u oral (revistas médicas, congresos, internet, etc.) y que se mantendrá el anonimato de mi hijo en todo momento.

En caso de no aceptar que mi hijo(a) ingrese a ese estudio, el Hospital me garantiza que recibiré el mismo tratamiento que los pacientes que si ingresan al estudio.

También estoy enterado de que puedo retirar a mi hijo del estudio, en cualquier momento y por cualquier circunstancia, a pesar de que ya se le hayan tomado las muestras.

Con fecha _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación en el proyecto, acepto participar en el estudio titulado: "Determinación de prevalencia de metapneumovirus en niños menores de 5 años con neumonía de la comunidad"

Nombre del niño (a) _____ Registro _____
Nombre del familiar responsable legal _____
Domicilio _____
Testigo 1 Nombre y firma _____
Domicilio _____
Testigo 2 Nombre y firma _____
Domicilio _____
Investigador responsable o principal
Nombre y firma _____

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador. En caso de alguna duda o pregunta favor de comunicarse con: Dr. Gerardo Flores Nava. Jefe de la División de Pediatría Clínica. Tel. (01 55) 55281830. Dra. Cesiah García Martínez. Residente de Tercer año de Pediatría. (01 55) 5528824357. Dr. Simón Kawa. Vicepresidente de la Comisión de Ética y de Investigación. Tel. (01 55) 56 66 60 21.