



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

TÍTULO DEL PROYECTO:

**“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y DETECCIÓN POR PCR DE LOS
VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO (hRSV) Y METAPNEUMOVIRUS
(hMPV), EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA
AGUDA”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GUADALUPE RUTH CEREZO LIRA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: **DRA. ROCÍO GABRIELA TIRADO MENDOZA**
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: **DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ**
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDÍVAR
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de abril de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **CEREZO LIRA GUADALUPE RUTH** con número de cuenta **302076170** con la tesis titulada **"AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y DETECCIÓN POR PCR DE LOS VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (hRSV) Y METAPNEUMOVIRUS (hMPV), EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA"** realizada bajo la dirección de la **DRA. ROCÍO GABRIELA TIRADO MENDOZA**:

Presidente: **DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDÍVAR**
Vocal: **DRA. BLANCA HAYDÉ RUÍZ ORDAZ**
Secretario: **DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA**
Suplente: **DRA. GABRIELA GARCÍA PÉREZ**
Suplente: **DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de mayo de 2013



DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Biológicas, por permitirme realizar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme el apoyo de beca; CVU 366739, Número de registro 254283.

A mi Comité Tutorial, Dra. Rocío Gabriela Tirado Mendoza, Dra. Leonor Huerta Hernández y Dra. Patricia Margarita Tato Zaldívar, por la asesoría, el tiempo, la paciencia, las opiniones y conocimientos que aportaron.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Rocío, la Dra. Lilian, Sandy, Enrique, la Sra. Chelo, Grace y Ara, a quienes les agradezco mucho la buena compañía, el apoyo, su confianza y todos los buenos momentos.

A la Dra. Paty Tato, quien además de haber sido una buena tutora, es una persona que me ha brindado su confianza y me ha dado la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo.

A José Agustín, Fer Carbajal, Toño, Laura Aguilar, la Dra. Lilia Robert, la Dra. Ana María Fernández, la Dra. Gaby García, Martita y América, quienes me brindaron su valiosa amistad y me hicieron sentir como en casa.

A Alice y a las Dras. Francis, Oli y Rosa Elena, por su gran disposición a ayudarme siempre.

A Ana Rodríguez, Alejandro Muñoz, Mónica, Lorena, Carlitos, Carlos, Jorge, Amanda y Tere, todos ellos mis amigos del segundo piso, he pasado muy buenos ratos con ustedes, me alegra mucho haberlos conocido!!

Y cómo se me iban a olvidar!!, Lili, Lupe, Ara, Chío, Dany, Fer Lira, Gus, Ricardo, Rosita, Luz, Jaqueline, Itzel, Maribel, Miriam, Alma, Gaby Piñón y Helivier, tengo mucha suerte de contar con amigos como ustedes.

A la Dra. Perla Castañeda y a la Q.F.B Lupita Castorena, quienes fueron un gran apoyo para llevar a cabo proyectos que me parecían difíciles de realizar, además de ello debo agradecer su confianza y apertura.

A la Lic. Erika Rodríguez Reyes, auxiliar en el Posgrado en Ciencias Biológicas, encargada de la Facultad de Medicina, por su profesionalismo y excelente atención.

A la Biol. Olivia Alicia Reynoso Ducoing, Técnico Académico Titular A de T. C., por el préstamo de equipo para cultivo celular y biología molecular.

A la M en C. Alicia Ochoa Sánchez, Técnico Académico Asociado B de T. C., por la donación de reactivos e insumos para biología molecular.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, Profesor Asociado C de T. C., por la donación de una cepa de aMPV, reactivos y uso de equipo para biología molecular.

Finalmente, gracias a todas las personas que me faltaron mencionar, pero que de manera directa o indirecta me brindaron parte de su tiempo y conocimientos para hacer más fácil mi recorrido.

DEDICATORIAS

*A mis padres, a quienes quiero y admiro profundamente,
me dan impulso y fortaleza siempre...*

A Migue, un chico único, mi mejor amigo...

*A Gelis, una chica maravillosa, algún día nos
volveremos a ver...*

INDICE

RESUMEN.....	I
ASBTRACT	III
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. GENERALIDADES DE HRSV Y HMPV	1
1.2. GENOMAS	2
1.3. ESTRUCTURAS	3
1.4. CICLO DE REPLICACIÓN.....	6
1.4.1. <i>Entrada.....</i>	6
1.4.2. <i>Eventos post-entrada.....</i>	8
1.5. PATOGÉNESIS Y RESPUESTA IMMUNE.....	10
1.5.1. <i>Respuesta inmune innata.....</i>	10
1.5.2. <i>Respuesta inmune específica.....</i>	12
1.6. TRATAMIENTO Y VACUNA	14
1.6.1. <i>TRATAMIENTOS</i>	14
1.6.2. <i>VACUNAS.....</i>	16
1.7. DIAGNÓSTICO.	18
II. ANTECEDENTES.....	20
2.1. INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS (IRA)	20
2.2. EPIDEMIOLOGÍA.	20
2.2.1. <i>Epidemiología en el continente Americano</i>	21
2.2.2. <i>Estudios epidemiológicos nacionales.....</i>	22
III. HIPÓTESIS.....	24
IV. OBJETIVOS	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1 MUESTRAS DE PACIENTES CON IRA.....	26
5.2. INFECCIÓN EN CULTIVO CELULAR.....	26
5.2.1. <i>Propagación de la línea celular</i>	26
5.2.2. <i>Propagación y titulación de hRSV de referencia.....</i>	26
5.2.3. <i>Control interno de hMPV</i>	27
5.2.4. <i>Pases ciegos en muestras clínicas.....</i>	29
5.3. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD).....	30
5.4. RT-PCR DE HMPV.	31
5.4.1. <i>Extracción de ácidos nucleicos</i>	31
5.4.2. <i>Síntesis de cDNA.....</i>	31
5.4.3. <i>Diseño de oligonucleótidos específicos para hMPV.</i>	32
5.4.4. <i>Amplificación de los genes de hMPV.</i>	32
5.4.5. <i>Electroforesis.....</i>	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1. ESTABLECIMIENTO DE CONTROL INTERNO DE HMPV.	35
6.2. INFECCIÓN <i>IN VITRO</i>, ENSAYOS DE IFD Y RT-PCR.....	38
6.2.1. <i>Infección in vitro (pases ciegos).....</i>	38
6.2.2. <i>Ensayos de IFD.....</i>	38
6.2.2.1. <i>Relación de fusogenicidad con agente(s) viral(es)</i>	39

6.2.3.	<i>Ensayos de RT-PCR para la detección de hMPV.</i>	39
6.2.4.	<i>Comparación de métodos de detección.</i>	43
6.3	ASOCIACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE LABORATORIO Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS MUESTRAS CON IRA.	44
6.3.1.	<i>Edad.</i>	44
6.3.1.1.	<i>Relación entre edad y agente(s) viral(es)</i>	44
6.3.2.	<i>Sexo.</i>	45
6.3.3.	<i>Tipo de muestra</i>	45
6.3.4.	<i>Diagnóstico clínico.</i>	46
6.3.5.	<i>Estado clínico del paciente.</i>	48
7.	DISCUSIÓN	51
7.1.	ESTABLECIMIENTO DEL CONTROL INTERNO DE HMPV.	51
7.2.	RESULTADOS DEL LABORATORIO INFECCIÓN <i>IN VITRO</i>, ENSAYOS DE IFD Y RT-PCR.	52
7.2.1.	<i>Infección in vitro.</i>	52
7.2.2.	<i>Ensayos de IFD.</i>	53
7.2.3.	<i>Ensayos de RT-PCR para la detección de hMPV</i>	54
7.2.3.	<i>Comparación de métodos.</i>	56
7.3	ASOCIACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE LABORATORIO Y LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS CON IRA.	56
8.	CONCLUSIONES	60
9.	PERSPECTIVAS	61
10.	REFERENCIAS	62
11.	ANEXOS	67

Listado de Abreviaturas

hRSV. Virus Sincitial respiratorio

hMPV. Metapneumovirus humano

IRA. Infección respiratoria aguda

IFD. Inmunofluorescencia directa

TPCK. Tripsina fenilalanilclorometilcetona

RT-PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

UASLP. Universidad Autónoma de San Luis Potosí

ETI. Enfermedad tipo influenza

InDRE. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

IRAG. Infección respiratoria aguda grave

EFAR. Exudado faríngeo

ENASO. Exudado nasofaríngeo

RESUMEN

Introducción: Los virus respiratorios son la principal causa de infección respiratoria aguda (IRA), en particular hRSV y hMPV reportan una elevada morbi-mortalidad en el sector pediátrico a nivel mundial. En México no se cuentan con estudios epidemiológicos que monitoreen estos dos patógenos de manera constante, para mantener una red de vigilancia epidemiológica actualizada. Dado su impacto en la población tanto en el sector salud como en el económico, se necesita el desarrollo de métodos de diagnóstico de virus respiratorios sensibles, costeables y rápidos

Objetivo: Caracterizar y detectar mediante una metodología específica a los virus hRSV y hMPV en muestras procedentes de pacientes pediátricos con IRA y relacionar las características clínicas con los datos epidemiológicos resultantes.

Materiales y Métodos: *Establecimiento del control interno de hMPV.* Se estandarizó el tratamiento y condiciones de tripsina para favorecer la fusogenicidad en muestras de hMPV, con ello se estableció el control interno para futuros ensayos, dado que no existe una cepa comercial de referencia.

||Aislamiento viral y caracterización de muestras. Se manejaron 124 muestras de pacientes con IRA, a las cuales se les realizaron 3 pases ciegos en células HEp-2, a las muestras que no desarrollaron fusogenicidad a lo largo de los pases, se les aplicó el tratamiento con TPCK, la cual favorece la aparición de sincitios.

||Ensayos de inmunofluorescencia directa. Con las observaciones de los pases ciegos realizados y el desarrollo de fusogenicidad, se tuvo un indicio de la presencia de los virus en las muestras. Sin embargo, para corroborar esta información se realizaron ensayos de IFD, para detectar hRSV y hMPV en las muestras.

||Amplificación. Se utilizó el ensayo de RT-PCR con oligonucleótidos específicos para confirmar la infección por hMPV por medio de la amplificación de los genes N y L. *||Asociación con características clínicas.* Se realizaron pruebas estadísticas: t-student, χ^2 o Wilcoxon según fuera el caso.

Resultados: Con una muestra obtenida en colaboración con el InDRE y la UASLP se estableció el control interno de hMPV, la fusogenicidad se favoreció con el tratamiento con TPCK. A las 124 muestras se les realizaron pases ciegos, el 18.55% desarrollaron fusogenicidad espontánea y el 16.13% inducida (con

tratamiento de TPCK). Para corroborar la presencia viral se realizaron ensayos de IFD, obteniendo un 47.58% de hRSV, 14.52% de hMPV y un 19.35% de coinfecciones. Para confirmar la infección por hMPV, se diseñaron pares de oligonucleótidos específicos para los genes N y L; al realizar la amplificación de las muestras, se observaron bandas adicionales de peso mayor o menor a las esperadas (599 pb y 447pb respectivamente), lo cual nos dio indicio de presencia de variantes virales. Con estos resultados, se realizó la comparación de métodos, en donde los ensayos de RT-PCR fueron más sensibles (93.5%) que el cultivo celular, con respecto a los ensayos de IFD. En cuanto a las características clínicas, observamos que las IRA se presentan mayoritariamente en grupos pediátricos, observamos diferencias significativas que asociaron al sexo masculino con hRSV ($p < 0.01$). También se observó la distribución de hRSV y hMPV en los estados de la República Mexicana, sin embargo cabe señalar que para que este estudio sea representativo se debe de ampliar el número de muestras. Las variantes que se asociaron con los agentes etiológicos fueron ETI con hRSV y el diagnóstico clínico de Influenza con bandas adicionales en ambos genes ($p < 0.05$). hRSV se relacionó con casos graves y hospitalizados, además las coinfecciones se asociaron con casos no graves ($p < 0.01$).

Conclusión: Se desarrollo una metodología para la confirmación de la infección de hMPV por RT-PCR, que es sensible y específica. Con los resultados se observaron frecuencias y características epidemiológicas de los virus hRSV, hMPV y coinfecciones, que resultaron ser similares a las reportadas mundialmente.

ASBTRACT

Introduction: Respiratory viruses are the leading cause of acute respiratory infection (ARI), particularly hRSV and hMPV report a high morbidity and mortality in the pediatric sector in the world, however in Mexico no epidemiological studies have monitored these two pathogens steadily, to maintain current epidemiological surveillance network. Given its impact on the population, both in the health sector and economically, we need to develop methods of diagnosis of respiratory viruses sensitive, affordable and fast

Objective: To isolate, characterize and detected by a specific methodology to hRSV and hMPV viruses in samples from pediatric patients with ARI and correlate with clinical features resulting epidemiological data.

Materials and Methods: *Establishment of internal control of hMPV.* The conditions for treatment with trypsin was standardized to favor in samples hMPV fusogenicity thereby internal control was established for future trials, since there is no commercial reference strain. || *Viral isolation and characterization of samples.* 124 samples were handled ARI patients to which underwent 3 passages on HEp-2 cells, the samples that did not develop along fusogenicity were administered TPCK treatment, which favors to appearance of syncytia. || *Direct immunofluorescence assays.* With the observations made in the passages and fusogenicity development, there was an indication of the presence of virus in samples, however, to corroborate this information IFD assays were performed to detect hMPV hRSV and in the samples. || *Amplification.* We used RT-PCR with oligonucleotides specific to hMPV infection confirmed through amplification of genes N and L. || *Association with clinical characteristics.* Statistical tests were performed: t-student, or Wilcoxon χ^2 as the case.

Results: With a sample obtained in collaboration with UASLP and InDRE established internal control hMPV, fusogenicity was favored treatment with TPCK. The 124 samples underwent blind passages, the developed fusogenicity was 18.55% spontaneous and 16.13% induced (TPCK-treated). To confirm the presence of viral assays were performed IFD, 47.58% was obtained for hRSV, 14.52% hMPV and 19.35% a co-infections. To confirm hMPV infection, we

designed specific primers pairs N and L genes, to perform the amplification of samples, additional bands were observed higher or lower weight than expected (599 bp and 447pb respectively), which gave evidence of the presence of viral variants. These results performed comparing methods, wherein the RT-PCR assays were more sensitive (93.5%) than the cell culture assays regarding IFD. In the clinical characteristics, we note that the IRA are mostly in pediatric groups, we observed significant differences associated with hRSV males ($p < 0.01$). We also observed the distribution of hRSV and hMPV in the states of Mexico, however it should be noted that for this study is representative must expand the number of samples. The variants that were associated with the etiologic agents were ILI with hRSV and influenza diagnosis with additional bands in both genes ($p < 0.05$). hRSV was associated with serious cases hospitalized; coinfections also associated with no serious cases ($p < 0.01$).

Conclusion: We developed a methodology for confirmation of infection of hMPV by RT-PCR, which is sensitive and specific. The results were observed frequency and epidemiological characteristics of hRSV, hMPV and coinfections, which were similar to those reported worldwide.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de hRSV y hMPV

El hRSV y hMPV son la primera y segunda causa, respectivamente de las infecciones respiratorias agudas a nivel mundial en menores de 5 años, personas de la tercera edad e inmunocomprometidas.^[5-7]

El hRSV fue aislado en 1956, de un chimpancé que presentaba un cuadro de infección respiratoria. Poco tiempo después, un virus muy similar fue aislado de infantes con resfriado común, estudios serológicos indicaron que el desarrollo de la infección por este virus es frecuente en menores de 5 años^[8]

El hMPV fue inicialmente caracterizado por el equipo de Osterhaus en 2001^[9], sin embargo estudios retrospectivos serológicos han revelado la existencia de anticuerpos contra hMPV en la población humana desde 1950, es por ello que se denomina un virus reemergente .

Ambos virus pertenecen a la familia *Paramyxoviridae*, del orden de *Mononegvirales*, se encuentran en la subfamilia *Pneumovirinae*. En esta familia

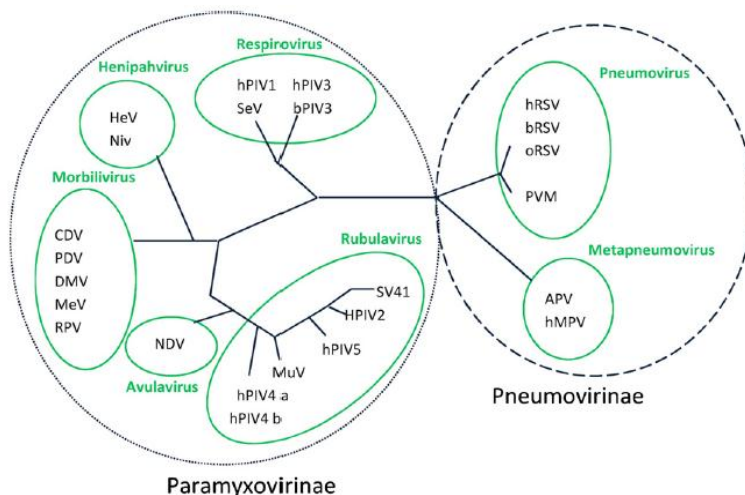


Figura 1 Distribución filogenética de virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*. hRSV (virus sincitial respiratorio humano), bRSV (virus sincitial respiratorio bovino), oRSV (virus sincitial respiratorio ovino), PMV (pneumovirus murino), hMPV (metapneumovirus humano), APV (metapneumovirus aviar), hPIV2 (virus de parainfluenza humana tipo 2), hPIV4a y b (virus de parainfluenza humana tipo 4a y b), hPIV5 (virus de parainfluenza humana tipo 5), SV41 (virus de simio 41), MuV (virus de las paperas), NDV (virus de la enfermedad de Newcastle), MeV (virus del sarampión), RPV (virus de la peste bovina), el DMV (Morbilivirus del delfín), CDV (virus del moquillo canino), HEV (virus Hendra), NiV (virus Nipah), HPIV1 (virus de parainfluenza humana tipo 1), HPIV3 (virus de parainfluenza humana tipo 3), BPIV3 (virus parainfluenza bovina tipo 3), SEV (Virus Sendai). El análisis genético se realizó utilizando el gen que codifica la nucleoproteína N. Adaptado de [1]

se incluyen los géneros *Pneumovirus*, a la cual pertenece hRSV y a *Metapneumovirus* es en donde se encuentra clasificado el hMPV.^[10]

Análisis filogenéticos de aislados revelan dos grupos principales (A y B) y cuatro sub-grupos A1, A2, B1, B2, basados en la variabilidad genética de las glicoproteínas de superficie de fusión (F) y

de anclaje (G)^[11]. La existencia de dos subgrupos adicionales, A2a y A2b también ha sido sugerida.^[12]

1.2. Genomas

Análogamente a otros miembros de la familia de paramixoviridae, hRSV y hMPV tienen RNA de cadena sencilla no segmentado de polaridad negativa, es por ello que en la clasificación de Baltimore se encuentran en el grupo V.

En el virión, el genoma se asocia a la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P) y la polimerasa (L), para formar un complejo ribonucleoproteico (RNP).

En hRSV, el RNA viral codifica para 11 proteínas, 9 estructurales y 2 no estructurales (NS1 y NS2). Tiene una longitud aproximada de 15.2 kb.

En el caso de hMPV, el genoma incluye 8 genes y 9 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican para 9 proteínas diferentes. Tiene una longitud aproximada de 13.3 kb.

Como puede observarse en la figura 2, los genomas de hMPV y hRSV son muy similares (comparten un 50% de identidad en la secuencia nucleotídica)^[5], sin embargo difieren en lo que respecta a su organización (el orden en hRSV es SH-G-F-M2 y en hMPV es F-M2-SH-G), en la ausencia de genes no estructurales en hMPV y en la longitud.

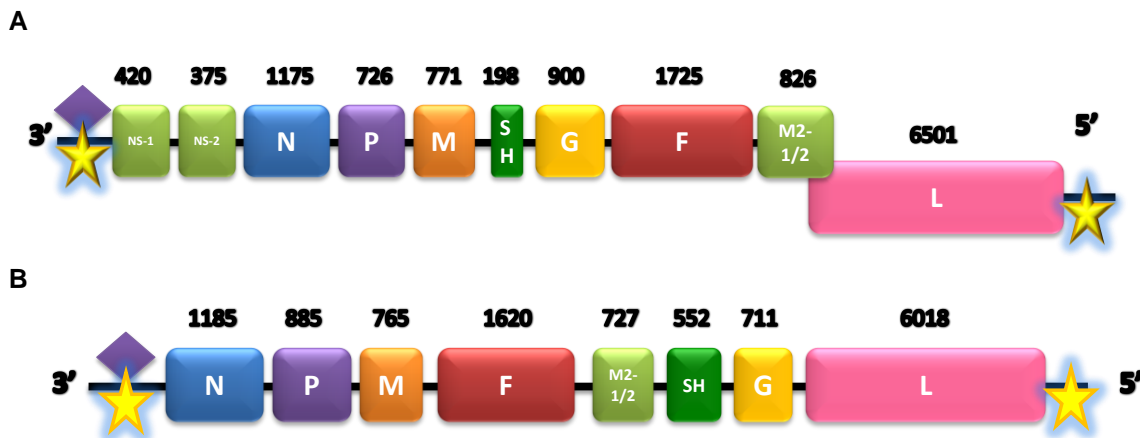


Figura 2. Esquema de la organización genómica de hRSV (A) y de hMPV (B).

NS1 y NS2: genes no estructurales 1 y 2 (ausentes en hMPV), N: gen que codifica la nucleoproteína, P: gen que codifica la fosfoproteína, M: gen que codifica la proteína de la matriz, F: gen que codifica la proteína de fusión, SH: gen que codifica la proteína pequeña hidrofóbica, G: gen que codifica la proteína de anclaje, L: gen que codifica la polimerasa. El gen M2 codifica dos proteínas: M2-1: factor de transcripción de antiterminación, M2-2: síntesis de factores de regulación de RNA. Cabe señalar que el solapamiento M2 y L en hRSV es debido a una superposición de los marcos de lectura. El rombo indica una señal de transcripción del RNA. La estrella: la señal de iniciación y terminación de la replicación. Los números en la parte superior decada esquema indican la longitud de nucleótidos que abarca cada gen. Esquema adaptado de [1]

El genoma viral contiene además regiones no codificantes entre cada marco de lectura abierto (ORF) de cada gen, que varían en tamaño desde 23 hasta 209 nucleótidos y contienen genes con señales de paro. El papel de estas regiones no

codificantes es probablemente el mismo que el de otros *Paramixovirus*, en la que secuencias de genes de inicio y el extremo de genes, controlan el inicio y la terminación de la transcripción^[1, 13].

1.3. Estructuras

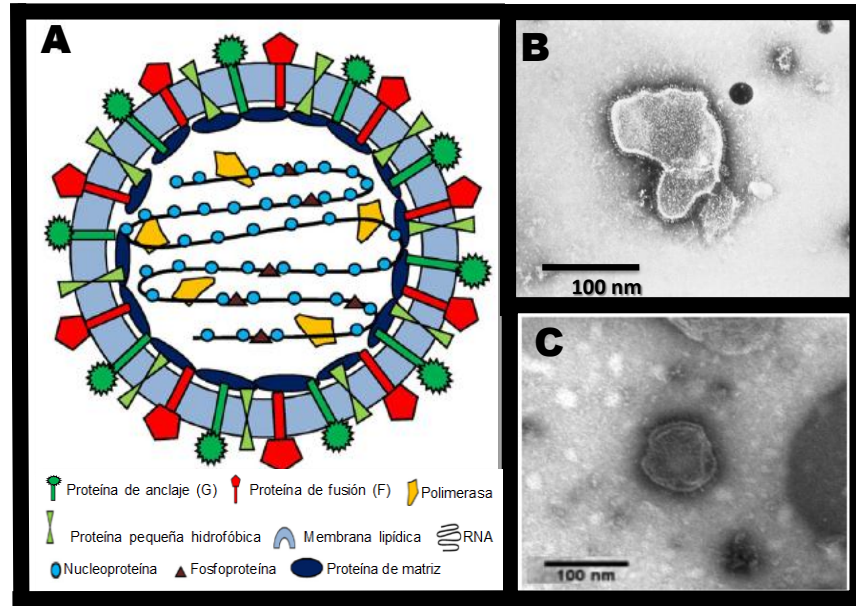


Figura 3. (A) Representación esquemática del hMPV y hRSV.(Adaptado de [1]) (B) Micrografía electrónica de hRSV (Tomada de [4]) y (C) Micrografía electrónica de hMPV (Tomada de [1]).

La morfología de los viriones, observados por microscopía electrónica (Fig. 3B y 3C) se asemeja a la de otros virus de la familia *Paramyxoviridae*. hRSV y hMPV son pleomórficos y tienen un diámetro que oscila entre los 150 y 600 nm.

Son virus envueltos, ello quiere decir que cuentan con una membrana lipídica derivada de la membrana de la célula hospedera, en la cual están ancladas tres glicoproteínas de superficie, la de fusión (F), la pequeña hidrofóbica (SH) y la de anclaje (G) que forman las espículas de 13-17 nm que cubren a la proteína de la matriz (M) (Fig. 3A).

La nucleocápside se conforma de tres proteínas, la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P) y la polimerasa viral dependiente de RNA (L) que interaccionan muy cercanamente con el RNA viral, formando un complejo ribonucleoproteico (RNP) de forma helicoidal.

Las proteínas de estos dos paramixovirus tienen diversas funciones, que se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Características de los genes y proteínas codificadas por hRSV y hMPV. Adaptada de [14-17]

Gen/ Proteína	Tamaño (nt) ¹		Masa molecular (KDa) ¹		Función
	hRSV	hMPV	hRSV	hMPV	
NS1 ^a	532	---	13.8	---	Son solo detectadas en pequeñas cantidades durante la infección de la célula hospedera. Inhiben la inducción de interferon- α/β en respuesta a la infección viral, por inhibición de la fosforilación y translocación nuclear del factor regulador del interferón 3 (IRF-3), además de bloquear la vía JACK-STAT.
NS2 ^a	503	---	14.5	---	
N ^b	1203	1206	42.5	43.5	Proteína mayoritaria en la nucleocápside. Se une al RNA viral y a su intermediario replicativo, el antígenoma, para formar nucleocápsides RNAsa resistentes.
P ^b	914	909	27.2	32.7	Se encuentra mayoritariamente fosforilada. Asociada a la nucleocápside, Forma parte del complejo de la polimerasa, actuando como cofactor, forma un complejo soluble con la proteína libre monomérica N.
M ^b	958	853	28.7	27.6	Se encuentra en la cara interna de la envoltura. Es importante en la morfogénesis del virión.
SH ^b	410	627	7.5	20.6	Proteína transmembranal localizada en la envoltura. Tiene una función desconocida. Esta proteína no es necesaria para una propagación viral eficiente en hospederos humanos.
G ^b	923	711	84-90	23.7	Glicoproteína transmembranal tipo II, localizada en la envoltura, tiene como función principal el reconocimiento y anclaje a la célula hospedera. Se ha observado que si el gen que codifica para esta proteína es deletado se producen viriones viables pero atenuados.
F ^b	1903	1644	68-70	58.5	Glicoproteína transmembranal tipo I, localizada en la envoltura. Se encarga de mediar la fusión en la penetración viral y la formación de

INTRODUCCIÓN

					sincitios. La proteína es sintetizada en una forma inactiva (F ₀), por ello debe de ser escindida por proteasas, (en hRSV son endógenas, para hMPV son exógenas) en dos subunidades que son activas (F ₁ y F ₂).
M2-1 ^b	961	746	22	21.2	Proteína asociada a la nucleocápside. Actúa como un factor de elongación transcripcional para evitar la terminación prematura de la transcripción durante la síntesis de los RNAm virales. También es un factor de procesividad y antiterminación, permitiendo el tránsito de la polimerasa a través de las regiones intergénicas para acceder a genes distantes del promotor. Desempeña un papel en la asociación de la proteína de la matriz con la nucleocápside, que inicia el ensamblaje y la gemación.
M2-2 ^b			11	8.2	Actúa como regulador del balance de la síntesis de RNA de la transcripción a replicación.
L ^b	6578	6120	200	222.8	Proteína con diversas actividades: RNA polimerasa dependiente de RNA, transcriptasa o replicasa. La transcriptasa sintetiza el RNA subgenómico, asegurando su nivelación y poliadenilación. El modo de replicasa es dependiente de la concentración intracelular de la proteína N. En este modo, la polimerasa replica el genoma viral entero sin reconocer las señales transcripcionales.

¹El tamaño de los genes y la masa molecular de las proteínas varía de acuerdo al subtipo viral, para esta tabla se utilizó el reportado hRSV-A2 y hMPV aislado CAN97-83.

^a Proteínas no estructurales sólo presentes en hRSV.

^b. Proteínas estructurales

--- No presente

1.4. Ciclo de replicación

El ciclo de replicación de estos dos virus, es muy similar al de otros virus de RNA con polaridad negativa, sin embargo cabe resaltar que aunque muchos grupos de investigación lo han estudiado, aún no queda claro el papel de diversas proteínas.

1.4.1. Entrada

a) Unión.

El primer paso de la infección consiste en la unión del virus a las células diana, las cuales pertenecen al epitelio de las vías respiratorias, sin embargo también se han encontrado vestigios de infección viral en células dendríticas, macrófagos, monocitos, leucocitos polimorfonucleares, células NK y neuronas ^[18-20]. Si bien en este paso, hRSV requiere proteínas de unión (F o G)^[21], para hMPV la proteína F también pueden estar implicada en este proceso. De hecho, varios estudios muestran que la proteína G de hMPV puede no interactuar con los receptores celulares con los cuales ya se ha caracterizado la interacción con hRSV, por ejemplo los glucosaminoglicanos (como heparán sulfato y condroitin B), así como lectinas de tipo C (proteína surfactante). La proteína F de hRSV también tiene dominios de unión a heparina y como G, se puede unir glicosaminoglicanos. Otros receptores posibles incluyen a la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) para F y el receptor de fractalcina CX3CR1, para G de hRSV ^[22]. En el caso de hMPV, se ha reportado que la integrina $\alpha\beta 1$ puede actuar como receptor celular para las proteína G y F^[23]. Este paso inicial constituye una diana terapéutica potencial y como tal, es el foco de varios estudios actuales, los cuales se mencionarán posteriormente.

b) Fusión.

El mecanismo de fusión está bien caracterizado entre los miembros de la familia *Paramyxoviridae* y se basa en sucesivos cambios irreversibles en la conformación de la proteína F^[24-26]. Esta glicoproteína de superficie de clase I ^[27] se sintetiza en forma de un precursor F₀ que después se escinde mediante una proteína celular del tipo de las furinas en dos sub-unidades, F₁ y F₂ unidas por un puente disulfuro^[28] (Fig. 4).

La subunidad F1 comprende varios dominios funcionales: (i) en el extremo N-terminal, un péptido de fusión (PF), el cual se inserta en la membrana de la célula huésped durante el proceso de fusión (ii) "interacción" de dos dominios hepta repetidos HRA y HRB que juegan un papel en el plegamiento de la proteína y durante su actividad fusogénica, (iii) una región altamente conservada, entre las dos regiones HR de la subunidad F1 (CBF₁), que participa en el plegamiento y homotrimerización de F, (iv) en el extremo C-terminal, una región transmembranal (TM) de anclaje que se inserta en la envoltura viral y una cola intracitoplasmática (C-cola).

La unidad de F2 comprende: (i) el péptido señal (PS) de la proteína en el extremo del N-terminal y (ii) una región altamente conservada (CBF₂). La función de la región CBF₂ y de hecho la proteína F2, aún tiene que ser caracterizada. Cabe señalar que en la mayoría de los virus de la familia *Paramyxoviridae*, la fusión se produce en condiciones de pH neutro^[29]. Sin embargo algunos estudios con hMPV-A, han demostrado que la fusión se estimula en pH ácido (pH=4.3-5.0)^[30].

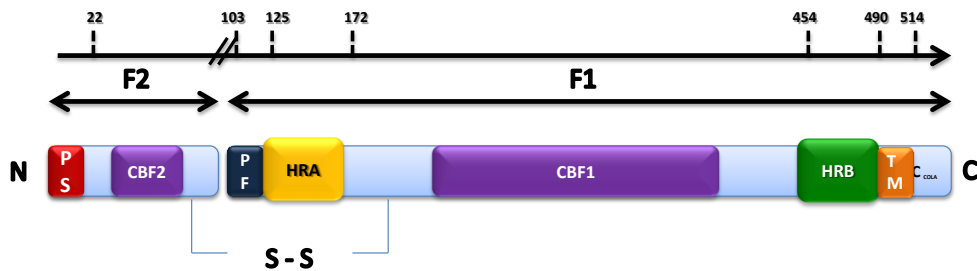


Figura 4. Representación esquemática de la proteína de fusión F. Las dos subunidades F1 y F2 son derivada de la escisión del precursor F0 en la sitio de corte. SP: péptido señal; FP: péptido de fusión; HRA: región heptada repetida A; HRB: región heptada repetida B, TM: Dominio transmembranal, C-cola: cola citoplasmática; CBF 1 y 2: dominio conservado de las dos subunidades (F1 y F2, respectivamente). Esquema adaptado de [1, 24]

Durante la fusión de la membrana celular y viral, las regiones hepta repetidas (HR) asumen una estructura de horquillas de trímero, posicionando el péptido de fusión a la región C-terminal del ectodominio. La formación de esta estructura parece conducir aposición y la posterior fusión de las membranas celulares y virales (ver figura 5).

Más tarde durante la infección, las proteínas F expresadas en la membrana plasmática de las células infectadas podría mediar la fusión con células adyacentes para formar sincitios, un efecto citopático que podría conducir a necrosis tisular [17].

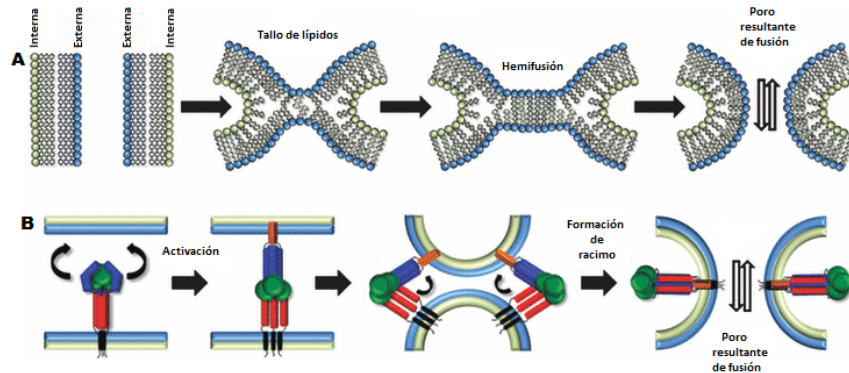


Figura 5. En el modelo actual, la proteína tiene al menos 4 estados conformacionales: pre-fusión, pre-horquilla, hemifusión (horquilla) y el post-fusión. En la figura A podemos observar como se realiza la fusión de las membranas celular y viral conforme los diferentes pasos de la fusión. En la figura B, se muestra como es que interactúa la proteína de fusión con la membrana celular, hasta obtener un poro por donde puede entrar la nucleocápside . Adaptado de [24]

1.4.2. Eventos post-entrada.

Una vez que la nucleocápside viral se encuentra en el interior del citoplasma, las proteínas P, N y L se disocian del RNA viral y se unen a su vez entre sí formando el complejo de la polimerasa.

El RNA genómico puede servir como una matriz para la transcripción y replicación viral que ocurre en el citoplasma de la célula infectada.

a) Replicación y transcripción del genoma.

Los genomas virales tienen regiones líderes en el extremo 3' y una región rica en uracilos al final de estas regiones, importantes para el inicio de la transcripción.

Hay que tomar en cuenta que se tiene un solo promotor para todo el genoma viral y si la polimerasa se encuentra con las secuencias de paro, es susceptible a disociarse del templado y reiniciar la síntesis de RNAm, volviendo a encontrarse con una secuencia de inicio (que correspondería a los primeros genes en sentido 3'-5'), esto conduce a un gradiente de RNAm, lo cual quiere decir que su concentración va disminuyendo desde el extremo 3' (en donde en hRSV se encuentran las proteínas NS1 y 2 y para hMPV se encuentra el gen N) hacia el 5' (gen L) [14].

Para la replicación del genoma, la proteína M2-2 cambia el modo operacional de la polimerasa de transcripción a replicación^[14]. Se inicia en el promotor del extremo 3' y la polimerasa prepara la síntesis del RNA ignorando las señales de inicio y de paro de los genes, creando un antígeno que es utilizado como templado para obtener el genoma de sentido negativo que se incorporará a los viriones ^[13].

b) Traducción de proteínas y gemación del virión.

Se sintetizan nuevas proteínas P, N, L, que se asocian con el genoma viral para formar nucleocápsides, que se incorporarán a los nuevos viriones durante la gemación en la membrana celular.

Las glicoproteínas de la envoltura (F, G, SH) sufren modificaciones post-traduccionales en el aparato de Golgi, para posteriormente dirigirse a las balsas lipídicas de la membrana citoplasmática de la célula hospedera. La proteína M se localiza en la cara interna de las balsas lipídicas, donde se lleva a cabo el proceso final de ensamblaje al interactuar con las proteínas de la nucleocápside, y posteriormente llevar a cabo la gemación.^[31]

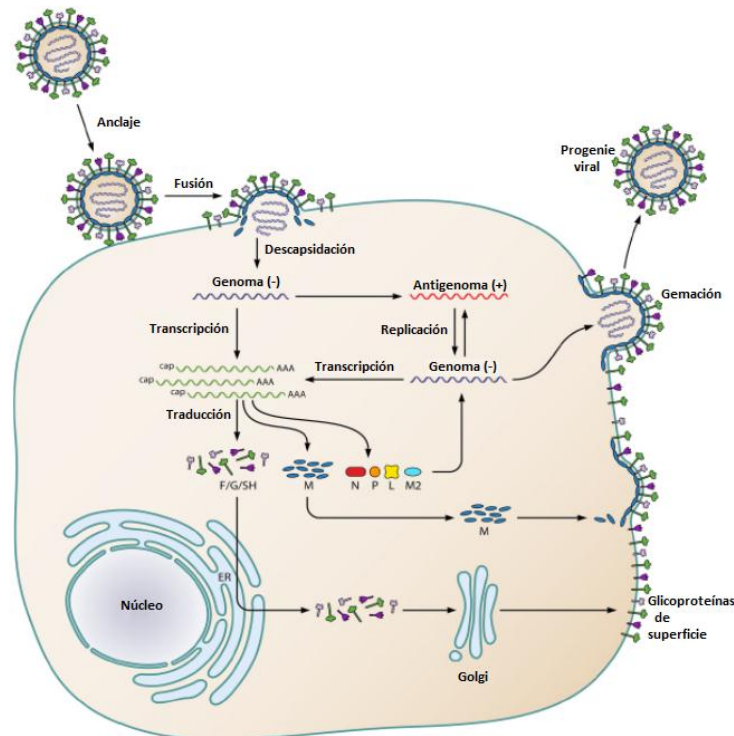


Figura 6. Representación esquemática del ciclo de replicación de hRSV y hMPV. Adaptada de [32]

1.5. Patogénesis y respuesta inmune.

hRSV y hMPV se asocian con una variedad de síntomas y diagnósticos de infecciones del tracto respiratorio superior e inferior. Si la infección es leve, la duración de los síntomas es generalmente menor a una semana; algunos estudios han sugerido que los niños propagan el virus durante 1 a 2 semanas mediante fomites^[6, 7]. Sin embargo, si la infección no es tratada correctamente y se conjuntan factores, tanto del hospedero como del virus, se pueden adquirir enfermedades graves de las vías respiratorias inferiores, como bronquiolitis, neumonía, laringotraqueobronquítis (crup) y asma^[33, 34].

Se ha observado que hRSV, además de tener tropismo por células de las vías respiratorias, también puede infectar macrófagos y monocitos, interfiriendo con sus funciones fagocíticas^[19]. Asimismo la infección de ambos agentes virales a células dendríticas, interfieren con la inducción del interferón α ^[35]. Durante la bronquiolitis, se puede observar necrosis, destrucción de células epiteliales ciliadas e infiltración de células mononucleares ^[36]. Tejidos submucosos y adventicios se vuelven edematosos y hay un exceso de moco, lo cual se conjuga con obstrucción de bronquios y alveolos, causando enfisema.

Gran parte de la patogénesis de hMPV ha sido inferida mediante la observación en animales de experimentación y por su similitud con hRSV.

1.5.1. Respuesta inmune innata.

En una infección viral aguda, se induce una respuesta mediada por interferón de tipo I (IFN-I), por ello los virus de RNA utilizan mecanismos para evadir esta respuesta antiviral. La producción de IFN-I puede deberse a la activación de la vía de señalización JAK/STAT ^[37]. Por otra parte, los receptores tipo Toll (TLRs) y las helicasas (RIG-I y MDA-5) son los receptores de reconocimiento de patrones más comúnmente activados por infecciones con virus de RNA, iniciándose una cascada de señalización que desencadena la expresión de citocinas proinflamatorias y mediadores inmunes^[38]. El TLR 7, que está situado en el compartimento celular endosomal, ayuda a la maduración de células dendríticas, mientras que RIG-I y MDA-5 son sensores citoplasmáticos que se han identificado

como esenciales para la inducción de IFN-I por varios virus^[38, 39]. La proteína mitocondrial de señalización antiviral (MAVs), es una proteína adaptadora que une a RIG-I y MDA-5 para la activación de los factores reguladores de transcripción IRF3 y NFκ-B que, en última instancia conduce a la activación de la producción de IFN-I^[40].

Se tiene bien caracterizado que las proteínas NS1 y NS2 de hRSV son las responsables de reducir la inducción de INF-I, por la inhibición del factor de transcripción IRF-3, de igual forma incrementa la degradación de STAT-2, lo cual tiene un efecto inhibitor en la vía JACK/STAT y por lo tanto del INF^[41].

Hay poca información disponible sobre la interacción de hMPV y el sistema inmune innato. En cultivos celulares, hMPV ha demostrado ser inductor de la vía de IFN de tipo I, que tiene lugar a través de la vía RIG-MAVS, sin la participación de MDA-5^[42]. Diferentes proteínas de hMPV evaden esta vía, por ejemplo, la fosfoproteína de hMPV-B ha demostrado ser un antagonista de IFN, pero curiosamente, la fosfoproteína de hMPV-A carece de esta actividad^[39]. En este estudio, se constató que la señalización de RIG-I no era bloqueada por la fosfoproteína, mientras que otros estudios sugieren que la proteína G se une a RIG-I para inhibir la vía de IFN-I^[43].

Se ha propuesto que pueden existir diferencias entre las respuestas que presentan los huéspedes ante una infección por hMPV o hRSV. Un estudio Finlandés ha encontrado mayores niveles de interleucina-8 (IL-8) y la disminución de los niveles de CCL5 (RANTES) en secreciones nasales de los niños infectados por hMPV en comparación con los niveles de niños infectados con hRSV^[44]. En contraste, se reportó que infantes infectados por hMPV produjeron niveles significativamente más bajos de IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) en lavados nasales, en comparación a lactantes infectados por hRSV o influenza^[45].

Estudios con ratones BALB/c infectados con hMPV demostraron significativamente, mayores cantidades de IFN-I que los de ratones infectados con hRSV^[19]. Estos hallazgos sugieren que el hMPV puede inducir una respuesta diferente a hRSV en el hospedero.

1.5.2. Respuesta inmune específica.

a) Respuesta humoral.

La respuesta inmune humoral juega un papel importante, aunque no definitivo, en la protección contra infecciones por hRSV y hMPV^[46]. Los niveles elevados de anticuerpos maternos transferidos prenatalmente se relacionan con la protección contra infecciones causadas por estos virus en las primeras 5- 6 semanas de vida, cuando el título de los mismos es máximo. Sin embargo, pasado este periodo tendrían un efecto negativo, ya que se ha propuesto que interfieren en el desarrollo de una adecuada respuesta de anticuerpos por parte del sistema inmune inmaduro de estos lactantes^[47]. Debido a ello, la prevalencia de anticuerpos contra hRSV y hMPV va en aumento proporcional con respecto a la edad, observándose que todos los niños mayores de 5 años ya han producido anticuerpos contra estos dos agentes^[9, 48].

Se ha demostrado que las glucoproteínas de superficie F y G son las principales proteínas virales que desencadenan una respuesta de anticuerpos neutralizantes^[46].

En el caso de hRSV los anticuerpos neutralizantes son principalmente del tipo IgA^[47]. Se ha visto que el sistema inmune de los lactantes de 1 a 2 meses de edad reconoce principalmente a la glucoproteína G de hRSV y es a esta a la que está dirigida la respuesta inmune protectora^[49]. La aparición de inmunoglobulina secretoria del tipo IgA anti-hRSV en secreciones nasales de lactantes está asociada a la disminución de la propagación del virus, mostrando el rol importante de la respuesta inmune local frente a la infección con hRSV^[50]. La inmunidad sérica contribuye en la protección contra la reinfección ya que se ha visto que los anticuerpos neutralizantes en suero contra hRSV persisten por más tiempo que las inmunoglobulinas secretoras del tipo IgA^[51].

En cuanto a los anticuerpos IgE específicos contra hRSV, se ha reportado que promueven el desarrollo de sibilancias^[34].

Para hMPV, se ha demostrado que la proteína F es el objetivo principal de anticuerpos neutralizantes^[52]. Sin embargo, se ha observado en diversos modelos animales que la duración de la protección es limitada, un estudio en macacos

mostró una disminución de la inmunidad a las 12 semanas y una pérdida completa de la protección en 8 meses ^[53].

b) Respuesta celular.

Este tipo de respuesta es esencial para limitar la replicación del virus y contribuir a la resolución de la infección. Sin embargo algunos elementos de la respuesta inmune tipo Th2, como IL-5 y RANTES, parecen estar relacionados con la fisiopatología de las infecciones respiratorias de las vías inferiores, además, de tener relación con asma en niños que padecen bronquiolitis^[48].

Dado que prácticamente todos los niños presentan infección por estos dos agentes en los primeros años de vida, pero no todos desarrollan bronquiolitis y la gravedad de esta es variable, se ha propuesto que la respuesta inmune del paciente contribuye a las diversas manifestaciones de las infecciones causadas por este virus ^[54]. La respuesta inflamatoria a la infección se inicia en las células del epitelio respiratorio, estas producen diversas citocinas y quimiocinas en respuesta a las infecciones virales. Las personas con bronquiolitis producen IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, proteína inflamatoria de macrófagos-1 α y RANTES. En respuesta a estas citocinas, se produce una infiltración de células inflamatorias predominantemente neutrófilos^[48]. Los macrófagos también participan en la respuesta inmune inicial y más tarde se atraen linfocitos B, basófilos y eosinófilos y hacia las vías respiratorias que liberan diversas moléculas como histamina, leucotrienos e IgE. Estas moléculas se relacionan con la broncoconstricción e hiperreactividad bronquial. ^[55]

Una vez iniciada la respuesta inmune, los linfocitos T cooperadores (Th) son activados, generando una respuesta adaptativa de tipo Th1 o Th2. La producción temprana de INF- γ es primordial para que se presente una respuesta predominante Th1, mientras que, una baja producción de éste, se asocia con una respuesta que es preponderantemente de tipo Th2, presentándose eosinofilia pulmonar persistente ^[55].

Se ha estudiado el perfil de activación de citocinas en pacientes con primoinfección por hRSV, comparándose los niveles de las mismas entre sujetos

con bronquiolitis y con infección respiratoria aguda alta (IRAA). Hallándose diferencias significativas entre ambos grupos, observando una mayor activación de citocinas de tipo Th2 (IL-4 y IL-10) en los pacientes que presentaron bronquiolitis en comparación con los que presentaron IRAA, en donde se observó mayor relación con la respuesta de tipo Th1 (se encontró un sesgo hacia la producción de IFN- γ e IL-12). Esto sugiere que las manifestaciones clínicas de la infección por hRSV se relacionan con el balance entre las respuestas Th1/Th2 ^[56]. Se desconoce si la tendencia al predominio de una respuesta sobre la otra es inducida por hRSV, o se debe a una tendencia determinada genéticamente. Se ha mostrado que personas con algunas variantes del receptor de citoquinas CCR5 podrían tener una mayor susceptibilidad a las infecciones por hRSV. En otros estudios, se ha encontrado que la presencia de ciertos polimorfismos de una sola base (SNP) en el TLR4 se asocia significativamente con un mayor riesgo de desarrollar una infección severa por hRSV ^[46] Además, de manera similar, el haplotipo formado con los SNP's -251T/A y 781 C/T de IL-8 también está asociado con la susceptibilidad a infecciones graves por hRSV^[57].

1.6. Tratamiento y vacuna

1.6.1. TRATAMIENTOS.

La mayor parte de los niños con infecciones respiratorias de etiología viral reciben cuidados de soporte. Para los niños que necesitan hospitalización, los tratamientos primarios son suplementación de oxígeno, hidratación intravenosa, broncodilatadores y en los casos más severos asistencia respiratoria mecánica. Los corticoesteroides son comúnmente usados como terapia antiinflamatoria, sin embargo no son muy recomendables^[46].

Gran parte de las moléculas antivirales probadas contra la infección por hRSV han mostrado eficacia contra hMPV^[1]. Las similitudes en la organización genómica y en la funcionalidad de las proteínas de superficie entre hRSV y hMPV harían suponer que ciertas estrategias terapéuticas que son eficaces contra hRSV pueden mostrar actividad inhibitoria contra hMPV^[1].

a) Rivavirina.

Es el único fármaco antiviral actualmente aprobado para hRSV, aunque no es específico para este agente. Es un análogo de nucleósidos administrado comúnmente por aerosol. Su uso se ha asociado con un mejoramiento en la oxigenación y una disminución de la inflamación asociada con sibilancias y enfermedad severa. No obstante, su uso ha sido limitado debido a que es muy costosa, a su potencial teratógeno y a los resultados contradictorios en los ensayos de eficacia, por ello su utilidad continúa siendo controvertida^[58]. Se ha utilizado también en forma terapéutica y profiláctica con infecciones en pacientes inmunocomprometidos, mostrando buenos resultados aunque no estadísticamente significativos, por lo que continúa siendo evaluada^[59].

b) Anticuerpos.

Se han administrado dos tipos de anticuerpos:

i) Policlonales

-RSV-IGIV, IgG purificado a partir de plasma de individuos sanos en alta concentración dirigido a hRSV^[51].

ii) Monoclonales

-Palivizumab: Ha sido probado en niños con alto riesgo de padecer infecciones graves por hRSV y como tratamiento para el mismo agente etiológico. Dirigido a la proteína F, se ha reportado que previene enfermedades de las vías respiratorias bajas y que es capaz de inhibir la replicación de hMPV *in vitro*^[58, 60].

-mAb 338: Anticuerpo dirigido a la proteína F de hMPV, neutralizó las cepas prototípicas de los cuatro sub-grupos de hMPV^[1].

-Motavizumab: Anticuerpo IgG1, derivado de Palivizumab. Tiene una mayor afinidad por la proteína F de hRSV y una mejor capacidad neutralizante, es aproximadamente veinte veces más potente que el Palivizumab^[51].

c) Otros tratamientos:

Los inhibidores de fusión se dirigen a los primeros pasos del ciclo de replicación viral. Se han obtenido resultados prometedores contra la infección por hRSV, con

el fármaco VP14637, que se encuentra en estudios clínicos^[61, 62]. Desafortunadamente, hasta ahora ningún inhibidor de la fusión sintético que sea eficiente contra hRSV ha obtenido alguna actividad inhibitoria contra hMPV^[58].

Se ha probado la utilidad de varios péptidos inhibidores, que son secuencias homólogas a los dominios HRA y HRB de hMPV, mostrando una potente actividad inhibitoria *in vitro*. Entre ellos, un péptido mostró eficacia en la administración intranasal en ratones^[63].

Una nueva terapia para el tratamiento de infecciones virales, es el RNA de interferencia (RNAi). Esta técnica se basa en la regulación de la expresión de genes en las células y es dependiente de la acción de los pequeños RNA's no codificantes que inhiben la traducción del RNAm. Un RNAi dirigido al RNAm que codifica para la proteína N de hRSV (ALN-RSV01) ha mostrado un gran potencial inhibitorio en monos y en humanos^[64].

Recientemente, se han probado varios RNAi para la inhibición de la expresión de proteínas N y P de hMPV *in vitro*, algunos han mostrado una buena actividad inhibitoria^[65].

1.6.2. VACUNAS.

El reto principal para el desarrollo de una vacuna efectiva contra hRSV y hMPV, es inducir una respuesta inmune duradera. Se han realizado diversas estrategias, como el uso de virus atenuados, quiméricos y las que son generadas con proteínas recombinantes y subunidades.

En cuanto a la vacunación contra hRSV, las proteínas F,G y M han sido probadas para inmunogenicidad y protección^[66].

La primer vacuna diseñada, consistió de un virus inactivado tratado con formalina. Desafortunadamente, su aplicación en los años 60 se asoció con una enfermedad más severa en niños infectados con hRSV circulante. Se ha propuesto que el mecanismo responsable fue la inmunopotenciación de la infección y un desequilibrio de las reacciones Th1/Th2 con un sesgo hacia el perfil Th2^[67]. Por ello, se prefiere experimentar con vacunas construidas a partir de virus atenuados.

Se han evaluado virus atenuados a partir de la replicación a bajas temperaturas, algunas se encuentran en estudios clínicos de fase I con diferentes resultados^[68].

También se ha utilizado la genética reversa, que consiste en hacer las mutaciones directamente sobre la secuencia del RNA viral. De esta manera se han construido cepas mutantes con proteínas deletadas a partir de las cepas atenuadas sensibles a la temperatura (Δ SH, Δ NS1 y Δ NS2)^[68].

Del mismo modo se han desarrollado vacunas basadas en subunidades. Varios estudios en fase I y II mostraron que la vacuna BBG2Na basada en la glicoproteína G de hRSV resultó ser prometedora en seguridad e inmunogenicidad para este virus. Se encuentra en fase III^[69].

Actualmente, para hRSV, se están realizando vacunas basadas en virosomas, que son partículas parecidas a virus, sin nucleocápsides o ácidos nucleicos. Estas partículas pueden reconstituirse con algunos adyuvantes como el tripéptido palmitolado (P3CSK4, ligando de TLR-2) y, recientemente obteniendo mejores resultados con monofosforil lípido A (MPLA, ligando de TLR-4), en donde en modelos animales, se observó una respuesta sesgada hacia el tipo Th1 (con producción de IFN- γ y IgG2a)^[70].

Para hMPV, se sigue buscando una vacuna, hay que tomar en cuenta que es un virus re-emergente, con un descubrimiento reciente y que aún falta investigación, sin embargo dada su importancia, se han realizado diversos estudios para el desarrollo de una vacuna eficiente.

En uno de los primeros trabajos, se evaluó la eficacia de un vector de virus quimérico construido con el virus de la parainfluenza bovina de tipo 3 (bPIV3) que contiene los genes F y HN de PIV3 humano y que expresan la proteína F de hMPV. En este estudio, se ha mostrado que los anticuerpos producidos desarrollan una buena protección^[71].

Se han evaluado otras vacunas quiméricas en donde se han sustituido las proteínas N y P de hMPV por las de aMPV subtipo C. Posterior a la vacunación intranasal, se observaron niveles altos de anticuerpos neutralizantes y tras el reto con hMPV, los títulos virales fueron reducidos en comparación de los controles a los 3 días posteriores al desafío^[72].

También se han propuesto vacunas con virus atenuados a bajas temperaturas (como se mencionó con hRSV), sin embargo al probarse en hámsters, no se observó una inducción de altos títulos anticuerpos protectores^[73].

La proteína F se ha utilizado para desarrollar vacunas de subunidades. La vacunación de hámsters con la proteína F soluble ha demostrado inducir la inmunidad protectora contra hMPV A y B^[74]. Además, la vacunación de DNA con un plásmido que lleva el gen F o la vacunación con una proteína F purificada soluble que carece del dominio transmembranal, ha inducido inmunidad protectora^[75].

1.7. Diagnóstico.

a) Cultivo celular.

Las líneas celulares derivadas de epitelio humano son las más efectivas y permisivas para la replicación *in vitro* de hRSV, sin embargo, se ha reportado que también puede infectar linfocitos, monocitos y células dendríticas^[76]. No obstante, la línea celular que se considera la más eficiente para la replicación de hRSV es la HEP-2, proveniente de carcinoma de laringe humano, en donde se observa su ECP característico: la formación de sincitios.

Aunque el hMPV ha estado circulando cuando menos 40 años en la población, la dificultad de su aislamiento en cultivo es la razón por la que hasta recientemente se identificara. Este virus requiere la adición de tripsina a las líneas celulares habituales para su crecimiento *in vitro*. hMPV tiene afinidad por algunas líneas celulares, comúnmente se cultiva en una línea celular de mono *Rhesus* (LLC-MK2) y en células de riñón de mono verde africano (Vero).^[9] A-549, HEP-2 y HEP-G2 pueden apoyar la replicación de algunos subtipos de hMPV.^[77] Su crecimiento en cultivo celular es lento y los efectos citopáticos son variables. Suele presentarse redondeo de las células infectadas, desprendimiento de la monocapa y en algunas ocasiones, sincitios.

b) Ensayos de Inmunofluorescencia.

El diagnóstico de la infección se basa en la detección directa de componentes virales (proteínas, partículas, o RNA); con sensibilidades aceptables^[78].

Además existen kits que detectan todo un panel de virus respiratorios.

c) Ensayos Moleculares.

Actualmente, no existe un "estándar de oro" ni un ensayo consenso para la detección de hMPV en muestras clínicas, sin embargo las técnicas basadas en ensayos de RT-PCR son generalmente los métodos de elección para la detección de ambos agentes ^[79].

Los ensayos moleculares detectan los genotipos virales y dependen en regiones conservadas (generalmente se utilizan regiones del gen N, para la detección de todos los subgrupos). Están disponibles diversos ensayos comerciales en varias compañías de diagnóstico. Estos ensayos incluyen tanto RT-PCR (Por ejemplo, ensayos por GenProbe / Prodesse, San Diego, CA) y NASBA (bioMe'rieux, Marcy l'Etoile, Francia) ^[80].

La mayoría de los ensayos multiplex para la detección de virus respiratorios incluyen a hRSV y hMPV, dada su importancia.

El panel de virus respiratorios xTAG (RVP; Luminex, Toronto, Canadá) ha recibido Aprobación de la FDA, que es un requisito previo para su uso preferente en diagnósticos de rutina de laboratorio en los Estados Unidos.

Un método alternativo de detección múltiple para patógenos respiratorios es la tecnología RespiFinder (Pathofinder, Maastricht, Países Bajos), que se basa en PCR múltiple, analizado por electroforesis capilar en gel. En esta tecnología hacen uso de la sonda de amplificación multiplex ligadura-dependiente (MLPA) y emplea dos sondas que hibridan exclusivamente en presencia del objetivo específico de secuencias complementarias. Este ensayo ha demostrado tener una alta sensibilidad (98,2%) y especificidad (100%) en un estudio que investigó 144 muestras clínicas ^[81]. Sin embargo, para llevar a cabo este ensayo se debe de contar con un equipo de secuenciación por capilar. Actualmente existen otras tecnologías novedosas.

Algunos ejemplos son los microfluídos que incluyen ensayos con chips ^[82].

II. ANTECEDENTES

2.1. Infecciones respiratorias agudas (IRA)

Las IRA son las infecciones más frecuentes a lo largo de toda la vida del ser humano, con una variación en cuanto a su etiología, condicionada fundamentalmente por la edad, las circunstancias medioambientales, el ámbito asistencial y la enfermedad de base.

Se definen como todo proceso infeccioso de menos de 15 días de evolución, que compromete el aparato respiratorio. Se caracterizan por rinorrea, congestión nasal y tos o dificultad respiratoria. Se dividen en infección respiratoria alta y baja. Las infecciones respiratorias altas son: otitis media aguda, rinitis, sinusitis y faringoamigdalitis. Las infecciones respiratorias bajas son: crup (laringotraqueobronquitis), bronquitis, bronquiolitis y neumonía.^[83]

Se han identificado más de 200 virus diferentes distribuidos en seis familias implicados en la patogenia de las infecciones del tracto respiratorio.

2.2. Epidemiología.

Las infecciones respiratorias persisten como problema de salud pública y económico, debido a que presentan la tasa de morbi-mortalidad más alta en niños menores de cinco años,

La mortalidad por IRA se estima en 3,9 millones de muertes al año. En niños menores de 5 años causa 1,9 millones de muertes por año.^[84]

Se estima que en países en desarrollo ocurren 151,8 millones de casos nuevos anuales (95% de la incidencia mundial en menores de cinco años); 7 a 13% de los casos resultan en hospitalización^[85].

Las estadísticas en México nos reportan que las IRA constituyen la segunda causa de mortalidad infantil en niños entre 1 y 4 años de edad y la tercera causa en menores de un año^[86], en el 2010 se reportaron 26, 712, 790 casos de IRA^[87].

Aunque la etiología de estas infecciones puede ser bacteriana, se estima que más del 50% es de origen viral. hRSV y hMPV son la primera y segunda causa respectivamente, responsables de las infecciones respiratorias agudas a

nivel mundial en menores de 5 años, personas de la tercera edad e inmunocomprometidas.^[5-7]

De las infecciones virales respiratorias que requieren hospitalización, el 40% se debe a hRSV y el 10% a hMPV. ^[88].

Entre las características epidemiológicas que comparten ambos virus se encuentran:

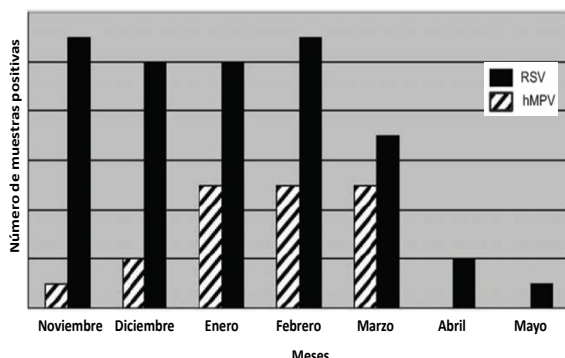


Figura 7. Distribución estacional de hRSV y hMPV. Adaptado de [2]

encuentran:

(i) Están presentes en todos los continentes.

(ii) Tienen una distribución estacional con ocurrencia principal en invierno y primavera (Ver figura 7)

(iii) Se transmiten mediante fomites.

Del 30 al 85% de los niños hospitalizados con ambos virus, tienen enfermedades crónicas, tales como asma, enfermedad pulmonar crónica debido al nacimiento prematuro, enfermedad cardíaca congénita o cáncer ^[5, 33, 34]. Los adultos sanos que son infectados, pueden mostrar síntomas de resfriado.

La reinfección puede producirse nuevamente, debido a la variedad de cepas que circulan según la temporada^[89, 90].

Estadísticas a nivel mundial, nos indican que hRSV es la primer causa de bronquitis y neumonía viral, con 17-18.5 admisiones por cada 1000 niños, además, es responsable de 64 millones de infecciones y 160,000 muertes anuales, en donde 10,000 son reportadas en adultos mayores y personas inmunosuprimidas. hMPV es la segunda causa de bronquiolitis y neumonía viral, con 3.2 admisiones hospitalarias por cada 1000 niños, en adultos mayores es responsable del 8% de las infecciones y reporta un índice de mortalidad del 7%^[5, 6].

2.2.1. Epidemiología en el continente Americano

En el continente americano se cuenta con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), que se encarga de controlar y coordinar políticas que promuevan la salud y el bienestar en los países de este continente. Como parte de

la actualización, emite boletines con datos recopilados de los Estados Miembros, para vigilar distintos rubros concernientes a la salud pública. El boletín que recientemente publicó (2012), está más enfocado al monitoreo de la influenza, sin embargo también se han recopilado datos de otros virus respiratorios. Se reporta que hRSV tiene un 32.44% de incidencia en el periodo 2011-2012, mientras que para hMPV, se reporta una incidencia menor al 1%^[3] (ver figura 8).

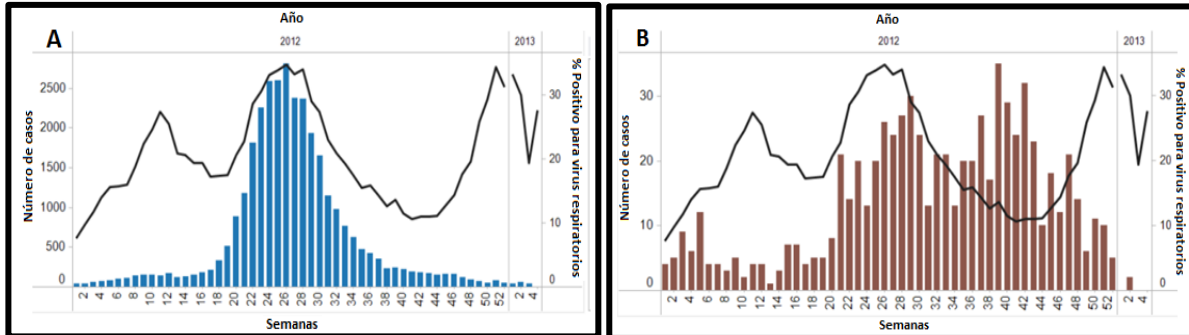


Figura 8. Datos epidemiológicos de la distribución por semanas de hRSV y hMPV en el continente Americano, la línea ubicada en la parte superior de los histogramas, representa el patrón de las infecciones virales totales reportadas en el periodo de 2011-2012. A. Frecuencia epidemiológica de hRSV. B. Frecuencia epidemiológica de hMPV. Adaptado de [3]

2.2.2. Estudios epidemiológicos nacionales.

Destacan diversos estudios epidemiológicos recientes. En el primero, el grupo de Noyola, realizó un estudio de epidemiología molecular para hMPV, relacionado a características clínicas en el estado de San Luis Potosí en el año 2005^[91]. El segundo trabajo pertenece Cabello y colaboradores, que realizaron la caracterización y detección viral de muestras de pacientes pediátricos en una localidad del distrito de Tlalpan en la Ciudad de México en el año 2006^[92]. En el 2007 se realizó otro estudio por Ayora en Yucatán, detectando diversos virus respiratorios mediante RT-PCR durante los meses de verano^[93].

En el 2009 se llevó a cabo un trabajo de detección de los principales virus respiratorios en el Instituto Nacional de Pediatría (INP), relacionándolo con diversas manifestaciones clínicas^[94].

En 2010 se reportó que en el periodo de 2004-2006, en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, Wong-Chew y colaboradores, monitorearon la frecuencia de virus respiratorios por ensayos de IFD en el hospital^[95].

Uno de los últimos reportes epidemiológicos, fue publicado en 2012, concierne al periodo de 2004-2008, fue realizado por Rodríguez y colaboradores en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” mediante la detección por IF de un panel de virus respiratorios, sin embargo cabe destacar que hMPV, al no ser incluido en dicho panel comercial, no fue detectado^[96].

Debido a la pandemia presentada en el 2009, surgió una red de vigilancia web nombrada “REPORTA” del Sistema Ciudadano de Monitoreo de Enfermedades Respiratorias, que mediante una encuesta, consolida una base de datos, que permite conocer la presencia y ubicación de enfermedades respiratorias en la población residente en México^[97].

Dada la importancia e impacto de las IRA en la población nacional, en México se debería tener una vigilancia epidemiológica nacional actualizada de los virus respiratorios que la causan (además de la Influenza), sin embargo no se encuentran previstos en la “NOM-017-SSA-1994, Para la vigilancia epidemiológica” ni en la “NOM-031-SSA2-1999, Para la atención a la salud del niño”, lo que sin duda refleja el gran subregistro e inoperatividad de un sistema general basado en la cuenta de casos y dependiente de la situación sociocultural, política y financiera del momento.

Debido a ello, en nuestro país se han realizado realmente pocos estudios epidemiológicos representativos, la mayoría de ellos realizados mediante ensayos de IF, que es una metodología aceptable pero depende de diversos factores. Por lo tanto, para poder fortalecer las redes de vigilancia epidemiológica que permitan establecer la presencia, prevalencia e impacto de las infecciones de hRSV y hMPV como agentes etiológicos virales de enfermedades del tracto respiratorio, se necesita el desarrollo de métodos de diagnóstico de virus respiratorios sensibles, costeables y rápidos, ello repercutirá no sólo en la contribución de datos de estos agentes infecciosos, también dará impulso al estudio epidemiológico de otros virus respiratorios, además de una mejor elección de tratamiento para los pacientes.

III. HIPÓTESIS

El desarrollo de metodologías específicas, sensibles y rápidas como el ensayo de RT-PCR, permitirá realizar, confirmar el diagnóstico y contribuir con datos epidemiológicos de virus respiratorios, en particular hMPV, debido a su relevancia en población pediátrica como agente etiológico de IRA.

IV. OBJETIVOS

General

Caracterizar y detectar mediante una metodología específica a los virus hRSV y hMPV en muestras procedentes de pacientes con infección respiratoria aguda.

Particulares

1. Aislar e iniciar con la caracterización de un control interno de referencia para hMPV, obtenido de aislados virales de muestras de pacientes.
2. Aislar hRSV y hMPV a partir de muestras de origen respiratorio, lo cual permitirá la obtención de un banco de aislados.
3. Realizar ensayos de inmunofluorescencia directa a los aislados virales para detectar la presencia de hRSV y hMPV en las muestras.
4. Diseñar pares de oligonucleótidos específicos para fragmentos de los genes N, M, L, y F del hMPV.
5. Estandarizar las condiciones apropiadas para la amplificación de los genes mencionados anteriormente.
6. Corroborar la infección por hMPV mediante ensayos de RT-PCR con los oligonucleótidos diseñados.
7. Comparar diversos métodos de detección de virus respiratorios.
8. Relacionar la frecuencia y características virales con características clínicas en las muestras.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MUESTRAS DE PACIENTES CON IRA.

Este estudio se llevó a cabo con muestras obtenidas en colaboración con el InDRE y la Facultad de Medicina de la UASLP.

Se formó un banco con 124 muestras respiratorias, la mayoría pertenecientes a menores de 5 años que se obtuvieron por de exudado faríngeo o nasofaríngeo. Fueron tomadas en los años 2004, 2006, 2008-2011 (Ver anexo I).

Se conservaron en medio esencial mínimo (MEM) con estabilizadores, en tanques de nitrógeno líquido o en un ultracongelador a -80°C.

5.2. INFECCIÓN EN CULTIVO CELULAR.

5.2.1. Propagación de la línea celular

Se utilizó la línea celular de carcinoma epitelial de laringe HEP-2 de origen humano, la cual se propagó en Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) completo (se suplementó con 5% v/v de suero fetal bovino (SFB), 2mM de glutamina y antibióticos: penicilina: 100UI/mL y estreptomina 100mg/mL) con la finalidad de obtener una cantidad suficiente de células para realizar los pases ciegos de las muestras, obtener un control interno de hMPV, realizar estandarizaciones y las metodologías subsecuentes.

5.2.2. Propagación y titulación de hRSV de referencia

La propagación y titulación de hRSV de referencia (cepa long ATCC, VR-26) se llevó a cabo en monocapas semiconfluentes de células HEP-2 en DMEM incompleto (suplementado con 2mM de glutamina y antibióticos). Posteriormente de dos horas de adsorción viral a 37°C en atmosfera húmeda y 5% de CO₂, se retiró el sobrenadante y se colocó medio DMEM incompleto fresco.

La monocapa infectada se mantuvo en atmósfera húmeda y 5% de CO₂, se observó cada 24 horas, para observar la aparición del efecto citopático (ECP), que se presenta aproximadamente de 72-96 horas posterior a la infección.

Para obtener el virus, el sobrenadante de las células infectadas se colecta y clarifica por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, posteriormente se transfirió a tubos nuevos. La infectividad viral se estabilizó añadiendo $MgSO_4$ a una concentración final de 0.1M. Se conservó a $-70^{\circ}C$ hasta su utilización.

La titulación de la infectividad viral se evaluó por $TCID_{50}$ (denominado así por sus siglas en inglés Tissue culture infectious dose affecting 50% of the cultures). La suspensión viral obtenida previamente se diluyó en una proporción 1:3 de manera serial en medio DMEM incompleto, para realizar la infección se utilizaron placas de 96 pozos con monocapas celulares HEp-2 semiconfluentes. Para cada dilución se utilizaron 50 μ L/pozo. La placa se incubó por dos horas para permitir la adsorción viral, posteriormente el medio se reemplazó por 150 μ L de medio DMEM incompleto y se incubó hasta por 96 horas (dependiendo de la presencia de sincitios).

El título viral se determinó utilizando la fórmula de Kärber, la cual se expresa la dosis media infectiva por mililitro ($TCID_{50}/mL$):

$$TCID_{50} = -\Delta + [-\delta(S - 1/2)]$$

Dónde:

Δ : es el log10 de la última dilución con el 100% de los pozos con el efecto citopático.

δ : es el log10 del factor de dilución

S: es la suma de los pozos que presentan ECP, tomando en cuenta la dilución en la que el total de pozos presenta ECP y hasta la primer dilución en la que ningún pozo presenta ECP.

5.2.3. Control interno de hMPV

En el caso de hMPV, no existe una cepa comercial que pueda ser utilizada como referencia, por lo cual, a partir de dos muestras clínicas presuntamente positivas para hMPV, proporcionadas en colaboración con el InDRE y la Facultad de Medicina de la UASLP, se estandarizaron las condiciones apropiadas para facilitar la detección del efecto citopático, lo cual nos permitió calcular el título viral y observar la infección viral.

-Estandarización de condiciones para favorecer fusogenicidad.

Se probaron diversas condiciones, como: concentración, tratamiento y tipo de tripsina, en placas de 24 pozos con monocapas confluentes de células HEp-2, las condiciones se describen a continuación:

a) PREAMBIVACIÓN:

1. Incubar la muestra en un tubo eppendorf, agregándole tripsina comercial a una concentración final de 0.02%, por una hora a 37°C.
2. Realizar dos lavados de la monocapa celular con 1mL de PBS.
3. Realizar la infección de monocapas confluentes (aproximadamente del 90%) de la línea HEp-2 con la muestra que previamente se incubó.
4. Incubar por dos horas a 37°C en atmosfera húmeda y 5% de CO₂.
5. Retirar inóculo y agregar medio DMEM incompleto.
6. Observar cada 24 horas, hasta observar algún cambio en la monocapa celular.

b) TRIPSINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES, DURANTE LA ADSORCIÓN VIRAL:

1. Realizar dos lavados de la monocapa celular con 1mL de PBS.
2. Realizar la infección de monocapas confluentes (aproximadamente del 90%) de la línea HEp-2 con la muestra y la tripsina comercial a las concentraciones finales requeridas (0.01% y 0.005%)
3. Incubar por dos horas a 37°C en atmosfera húmeda y 5% de CO₂.
4. Retirar inóculo y agregar medio DMEM incompleto.
5. Observar cada 24 horas, hasta observar algún cambio en la monocapa celular.

c) TRIPSINA+0.0005% TRIPSINA:

1. Realizar dos lavados de la monocapa celular con 1mL de PBS.
2. Realizar la infección de monocapas confluentes (aproximadamente del 90%) de la línea celular HEp-2 con una muestra que previamente tuvo tratamiento con tripsina comercial en la adsorción viral.
3. Incubar por dos horas a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

4. Retirar inóculo y agregar medio DMEM incompleto, adicionándole tripsina comercial a una concentración final de 0.005%.
5. Observar cada 24 horas, hasta observar algún cambio en la monocapa celular.

d) TPCK:

1. Realizar dos lavados de la monocapa celular con 1mL de PBS.
2. Realizar la infección de monocapas confluentes (aproximadamente del 90%) de la línea HEp-2, con la muestra sin tratamiento.
3. Incubar por dos horas a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂.
4. Retirar inóculo y agregar medio DMEM incompleto, suplementándolo con tripsina TPCK (SIGMA No.T1426) a una concentración final de 0.2 µg/mL.
5. Observar cada 24 horas, hasta observar algún cambio en la monocapa celular.

-Ensayo de inmunofluorescencia directa.

Para corroborar la presencia de hMPV, se le realizó un ensayo de inmunofluorescencia directa (IMAGEN™ hMPV, ver metodología en siguiente bloque).

-Propagación y titulación de control interno de hMPV.

La propagación y titulación de hMPV se llevó a cabo de manera similar a la de hRSV.

5.2.4. Pases ciegos en muestras clínicas.

En colaboración, con el InDRE y la Facultad de Medicina de la UASLP, se nos proporcionaron 124 muestras. Se les realizaron tres pases ciegos en placas de 24 pozos, con monocapas semiconfluentes de células HEp-2 propagadas en medio DMEM con 5% de SFB. Para llevar a cabo el primer pase, se realizó la infección de las células con 150 µL de la muestra y se dejó adsorber dos horas en atmósfera húmeda 5% de CO₂, posteriormente se retiró el inóculo y se colocó medio DMEM incompleto fresco. Se incubaron hasta por una semana, para realizar la colecta de los sobrenadantes.

En el segundo y tercer pase, se realizó la infección de las células con 150 μ L del aislado correspondiente y se incubaron hasta por una semana, para realizar la colecta de los sobrenadantes. Con los aislados del tercer pase se realizaron observaciones de la infección para notar si desarrollaban fusogenicidad, si no presentaban efecto citopático, se les aplicaba el tratamiento con TPCK previamente estandarizado con el control interno de hMPV.

Cabe notar que si la monocapa se encontraba dañada por la tripsina, se realizaba un pase posterior al tratamiento, en donde otra monocapa de células HEp-2 se infectaba con 150 μ L de aislado tratado con TPCK, dejándolo adsorber por dos horas, posteriormente se colocó medio DMEM incompleto fresco. Se realizaron observaciones hasta por una semana.

Todos los aislados fueron colectados y conservados en un ultracongelador a -80°C .

5.3. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD).

Se utilizaron cubreobjetos circulares estériles en placas de 24 pozos, con aproximadamente 50×10^3 células HEp-2 propagadas en medio DMEM completo, las cuales fueron infectadas con 150 μ L de aislado viral. Para los virus de referencia la infección se llevó a cabo con una moi de 2. Después de dos horas de adsorción viral a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO_2 , se retiró el sobrenadante y se colocó medio DMEM incompleto fresco.

La monocapa infectada se mantuvo en incubación a 37°C , en atmósfera húmeda y 5% de CO_2 durante 48 horas, posteriormente se retiró el medio y se fijaron las células con metanol/acetona. A continuación, se realizó el bloqueo añadiendo 1mL de la solución de ABS 1%-5% SFB-PBS a cada muestra, que se incubó por 12 horas a 4°C .

Al término de la incubación se prosiguió a retirar la solución de bloqueo y a realizar tres lavados con la solución de ABS 0.1%-0.3 Tween 20-PBS, durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación constante.

Se procedió a añadir el anticuerpo; para detectar hRSV se realiza una dilución 1:10 del anticuerpo monoclonal (Oxoid IMAGEN TM hRSV) con la solución de

lavado, en el caso de hMPV la dilución con el anticuerpo monoclonal es 1:15 (Oxoid IMAGEN™ hMPV), posteriormente se incubó por una hora en agitación constante, a temperatura ambiente y con protección de la luz.

Al término de la incubación se procedió a retirar la solución con el anticuerpo y a realizar tres lavados para evitar uniones inespecíficas.

Los cubreobjetos fueron fijados en portaobjetos para su observación mediante un microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS BX60).

Como controles se utilizaron: 1) IFD de RSV, se utilizaron como control positivo células infectadas con cepa long ATCC, VR-26, 2) Para la IFD de hMPV, como control positivo se utilizó el control interno obtenido de una muestra de paciente. En ambos casos como control negativo se utilizaron células HEp-2 sin infectar.

5.4. RT-PCR DE hMPV.

5.4.1. Extracción de ácidos nucleicos.

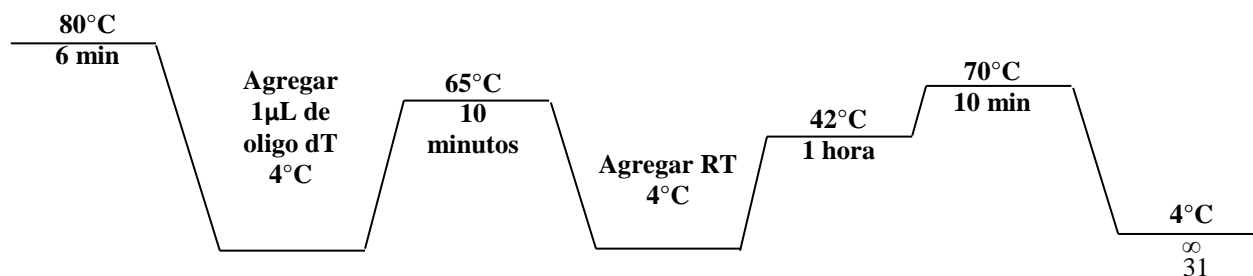
La extracción de RNA total de los virus de referencia y de las muestras, se realizó mediante el método descrito por Chomezynski y Sacchi ^[98] a las 48 horas posterior a la infección con el último pase realizado de la muestra.

5.4.2. Síntesis de cDNA

El cDNA fue sintetizado en un tubo eppendorf de 0,2 mL:

Componente	1x [μ L]	Concentración final
Buffer 5X	4	1x
DTT 0.1 M	2	0.01
dNTP's 10 mM	1	0.5
RNAasa inhibitoria 40U/ μ L	0,5	1 U
RNA	Ajustar a 5 μ g	0.25 μ g/ μ L
Agua DEPC	Ajustar vol. a 20 μ L	-----
TOTAL	20 μL	

Con la siguiente programación de temperaturas y tiempos:



5.4.3. Diseño de oligonucleótidos específicos para hMPV.

Se realizó el diseño de primers específicos para hMPV utilizando el programa Primer3 Plus para la detección de fragmentos de genes N, M, F y L.

Se realizó una revisión exhaustiva de alineaciones de oligonucleótidos con una secuencia consenso construida a partir de secuencias completas de aislados reportados en el Genbank de los cuatro subtipos: A1(NL/1/100), A2(NL/00/17), B1(NL/1/99) y B2(NL/94/01) de hMPV.

De igual manera se examinó la formación de dímeros o estructuras secundarias y BLAST con secuencias nucleotídicas en la base de datos del NCBI, para observar si existía inespecificidad al reconocer genes de otros organismos o regiones.

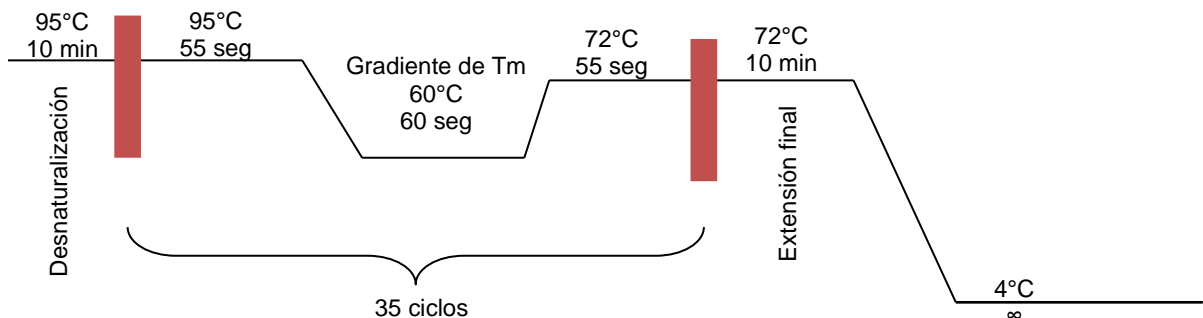
5.4.4 Amplificación de los genes de hMPV.

a) Gen N

La amplificación ya estandarizada del fragmento del gen N de hMPV fue realizada en un tubo eppendorf (Axigen) de 0,2 mL, donde se agregaron los siguientes reactivos:

Componente	1x [μ L]	Concentración final
Buffer 10x	5	1x
MgCl ₂ 50 mM	3	3.0 mM
dNTP's 10 mM	1	0.2 mM
Taq 5U/ μ L	0.2	1 U
Primers 100 pmol/ μ L (FW y RV)	4 c/u	8 pmol/ μ L
Agua [μ L]	25.8	-----
cDNA	7	-----
Volumen final [μL]		50

Con la siguiente programación de temperaturas y tiempos en un termociclador iCycler de BIO-RAD:



Los oligonucleótidos se diseñaron para amplificar un producto de 599 pb que comprende la región entre los nucleótidos 148-747 del genoma de hMPV.

Sentido: 5'-CAACAGCAGTGACACCCTC-3'

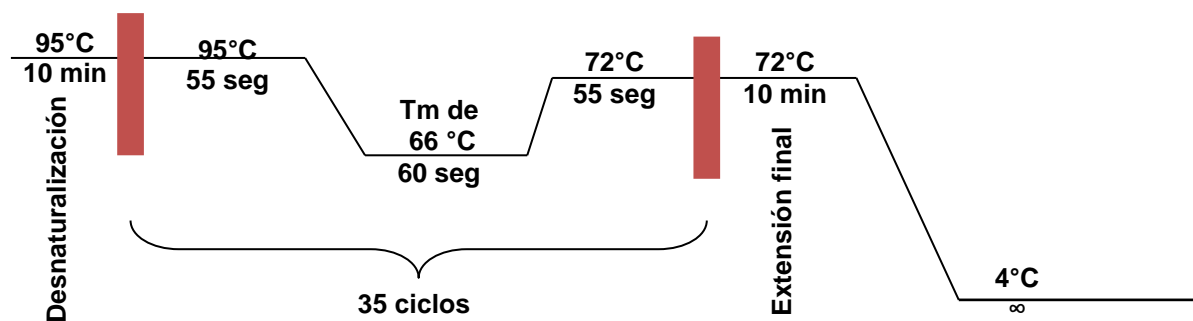
Antisentido: 3'-ACTCATACCGTTTCGTAA-5'.

b) Gen L

La amplificación ya estandarizada del fragmento de L de hMPV fue realizada en un eppendorf de 0,2 mL, donde se agregaron los siguientes reactivos:

Componente	1x [μ L]	Concentración final
Buffer 10x	5	1x
MgCl ₂ 50 mM	2.5	2.5 mM
dNTP's 10 mM	1	0.2 mM
Taq 5U/ μ L	0.2	1 U
Primers 100 pmol/ μ L (FW y RV)	4 c/u	8 pmol/ μ L
Agua [μ L]	26.3	-----
cDNA	7	-----
Volumen final [μ L]		50

Con la siguiente programación de temperaturas y tiempos en un termociclador iCycler de BIO-RAD:



Los oligonucleótidos se diseñaron para amplificar un producto de 447 pb, que comprende la región entre los nucleótidos 8920 y 9367 del genoma de hMPV.

Sentido: 5'-GCCATAGCCCAAACCATA- 3'

Antisentido: 3'-CCCTGTAACGACTAGACT-5'

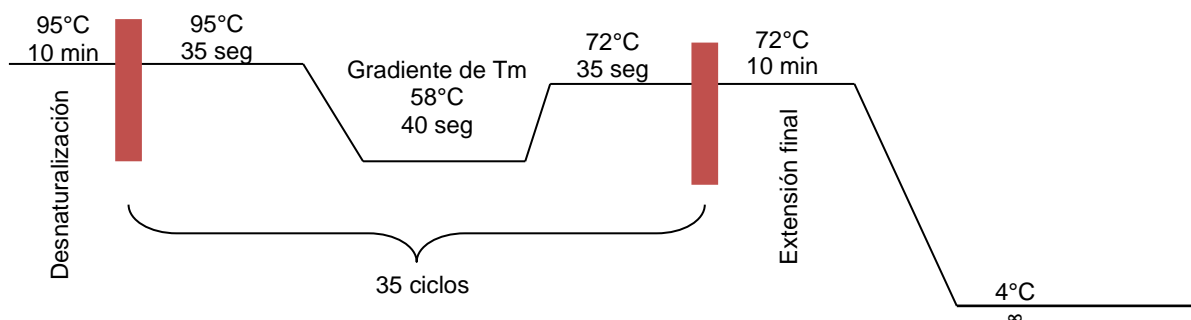
Cabe mencionar que en cada reacción de amplificación se utilizaron como control positivo, el control interno establecido en este estudio y como controles negativos, células sin infectar y un control de reacción, que sustituía el cDNA por agua.

c) Gen control (β -Actina)

El control del ensayo de RT-PCR fue β -actina, la amplificación del gen generó un producto de 205pb. Fue realizada en un eppendorf de 0,2 mL, donde se agregaron los siguientes reactivos:

Componente	1x [μ L]	Concentración final
Buffer 10x	5	1x
MgCl ₂ 50 mM	1.5	1.5 mM
dNTP's 10 mM	1	0.2 mM
Taq 5U/ μ L	0.2	1 U
Primers 100 pmol/ μ L (FW y RV)	1 c/u	2 pmol/ μ L
Agua [μ L]	35.3	-----
cDNA	5	-----
Volumen final [μL]	50	

Con la siguiente programación de temperaturas y tiempos en un termociclador iCycler de BIO-RAD:



5.4.5. Electroforesis.

Los productos de amplificación se observaron en geles de agarosa de 1.5%, teñidos con bromuro de etidio; las imágenes se visualizaron y documentaron en un transiluminador bajo luz UV. Fueron analizadas con el software Quantity One.

6. RESULTADOS

Se han dividido en tres secciones:

- a) Establecimiento del control interno de hMPV.
- b) Infección *in vitro*, ensayos de IFD y RT-PCR.
- c) Asociación entre los resultados obtenidos y las características de las muestras con IRA.

6.1. ESTABLECIMIENTO DE CONTROL INTERNO DE hMPV.

El hRSV cuenta con cepas de referencia comerciales, sin embargo como ya se había mencionado, hMPV aún no cuenta con ellas. Para nuestro trabajo era de fundamental importancia establecer un control con el cual realizar un dictamen acerca de la presencia o ausencia de los virus en las muestras.

Se conoce que ambos virus pueden presentar ECP *in vitro*, sin embargo se ha reportado que hMPV debe utilizar proteasas externas para formar sincitios, por ello decidimos hacer uso de tripsina en diversas concentraciones y condiciones en muestras que no habían desarrollado algún ECP, para favorecer la fusogenicidad, lo cual nos daría un indicio de presencia viral.

A continuación se presentan las observaciones que se realizaron:

Tabla 2. Observaciones de la estandarización de tratamiento con tripsina, para facilitar la detección del efecto citopático.

Tratamiento	Observaciones
Preactivación	
Infección con tripsina [0.01%], durante la adsorción viral	La monocapa celular se encontraba muy dañada, se observaba una gran cantidad de células desprendidas.
Infección con tripsina [0.005%], durante la adsorción viral	La monocapa celular se encontraba con menos células desprendidas que en los tratamientos de preactivación y con tripsina al 0.01%.
Tripsina [0.005%] + tripsina [0.005%]	La monocapa celular se encontraba poco dañada, se observaron pequeños sincitios.
TPCK	La monocapa celular se encontraba poco dañada se observaron pequeños sincitios. La morfología de las células adheridas en monocapa cambió, se observaban alargadas y agrupadas.
Sin tratamiento	La monocapa celular se mantuvo adherida.

Para poder elegir un tratamiento que no dañara sustancialmente la monocapa y permitiera la formación de sincitios, de los dos tratamientos en los cuales se observó un efecto positivo (Tripsina [0.005%]+tripsina [0.005%] y TPCK), se realizó un ensayo en placa, con la finalidad de observar cual era el tratamiento más eficiente (Ver figura 8).

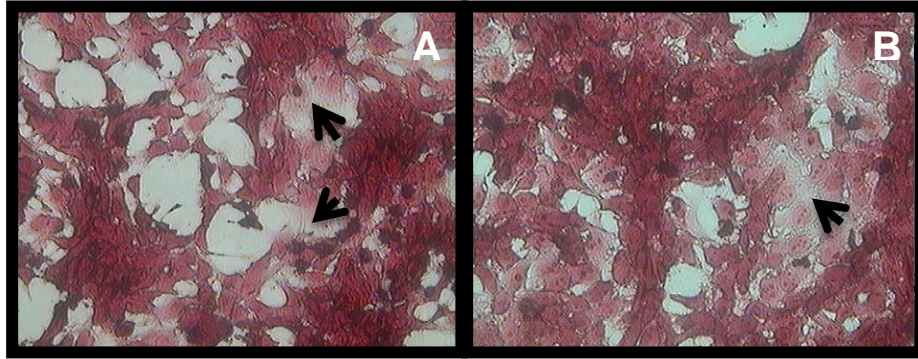


Figura 8. Fotografía de los ensayos en placa realizados con diferentes tripsinas observados mediante tinción con rojo neutro. A. Tripsina [0.005%]+tripsina [0.005%], nótese que la monocapa celular se encuentra dañada. B. Tripsina TPCK a una concentración final de 0.2 µg/mL. Los sincitios se encuentran indicados por flechas negras. Aumento 20x.

Se determinó que el tratamiento más eficiente para realizar la propagación de virus y facilitar la aparición de sincitios, fue el de la TPCK a una concentración de 0.2 µg/mL, debido a que presentó sincitios más grandes, mayormente distribuidos y no se presentó gran afectación en la monocapa celular.

En colaboración con el InDRE, se obtuvieron dos muestras presuntivas para hMPV, a las cuales se les aplicó el tratamiento con TPCK con las condiciones previamente estandarizadas. Sólo una de las muestras desarrolló sincitios (ver figura 9).

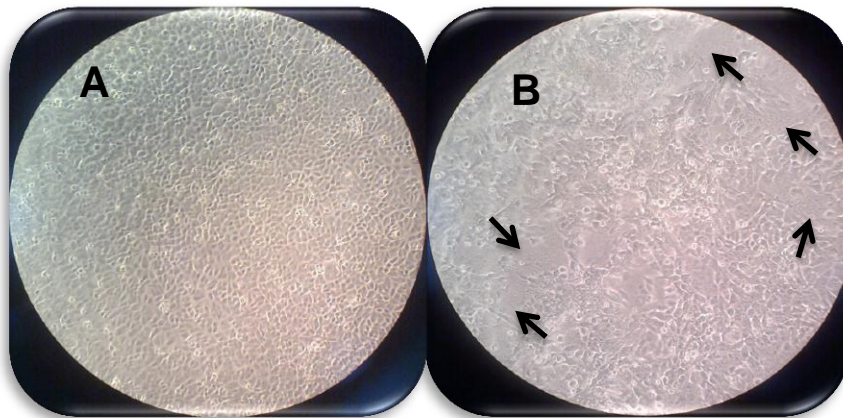


Figura 9. Fotografías del ECP desarrollado por la muestra tratada con tripsina TPCK A. Control negativo de células HEP-2 sin infectar y sin tratamiento. B. Muestra clínica que desarrolló fusogenicidad con el tratamiento. Los sincitios se encuentran indicados por flechas negras. Aumento 10x.

Para corroborar la presencia de hMPV en la muestra que desarrolló el efecto citopático, se le realizó un ensayo de inmunofluorescencia directa (con anticuerpos monoclonales conjugados con FITC). Como se puede observar en la figura 10, se obtuvo un resultado positivo.

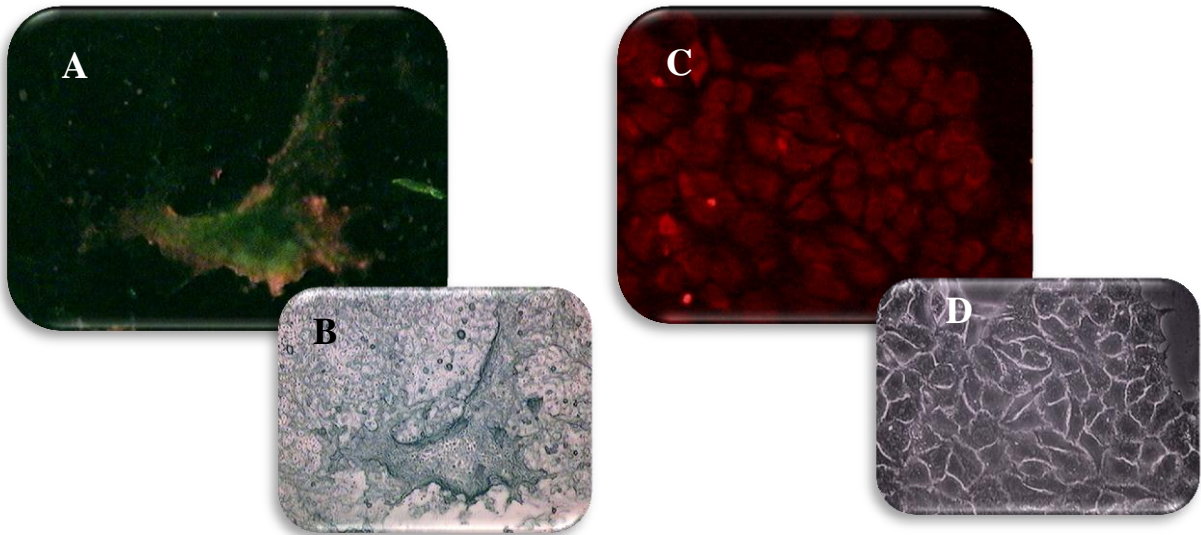


Figura 10. Ensayo de inmunofluorescencia directa para la detección de hMPV; A. Fotografía de sincitio de hMPV, la zona verde es positiva, se puede observar que la marca esta distribuida en el sincitio. B. Fotografía en campo claro de la zona que presentó inmunofluorescencia. C. Fotografía de control negativo (monocapa de células sin infectar). D. Fotografía en campo claro del control negativo. Aumento 20x.

Finalmente, se realizó la propagación y titulación por TCID₅₀ del control interno para hMPV, obteniendo un título viral de $3.43 \cdot 10^5$ TCID₅₀/mL (ver figura 11).

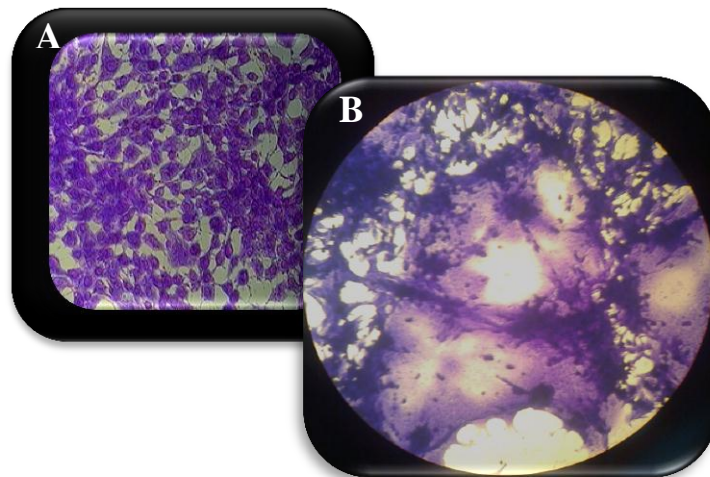


Figura 11. Fotografía de dos pozos del ensayo de TCID₅₀, observados mediante tinción con cristal violeta. A. Monocapa de células HEp-2 sin infecta. B. Efecto citopático desarrollado en la monocapa celular por la muestra que se estableció como control interno para hMPV. Aumento 10x.

6.2. INFECCIÓN *IN VITRO*, ENSAYOS DE IFD Y RT-PCR.

6.2.1. Infección *in vitro* (pases ciegos).

Se nos proporcionaron 124 muestras provenientes de pacientes con cuadros infecciosos respiratorios agudos (ver anexo II).

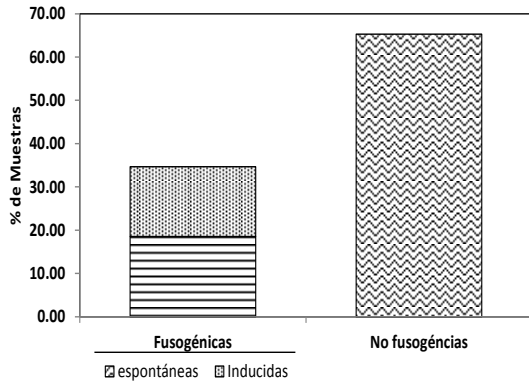


Gráfico 1. Porcentaje de muestras que desarrollaron fusogenicidad.

Para la identificación de los agentes virales se realizaron tres pases ciegos por cada muestra para enriquecer el título viral. Después del tercer pase solo las muestras que no presentaron fusogenicidad se trataron con TPCK para facilitar su desarrollo (inducida 16.13% n=20). El resto de las muestras presentó fusogenicidad (denominada espontánea, 18.55% n=23). Esta característica es

importante, debido a que nos dio un indicio de la presencia viral.

El resto de las muestras (65.32%, n= 81) no desarrolló actividad fusogénica aún posterior al tratamiento. Ver gráfico 1.

6.2.2. Ensayos de IFD.

Para corroborar la infección viral, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia

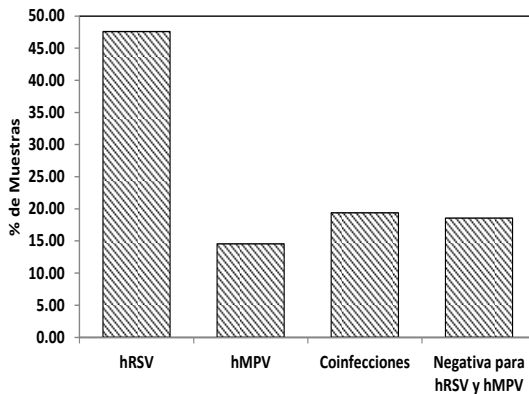


Gráfico 2. Agentes virales identificados en las muestras con IRA.

directa (ver anexo II), detectamos hRSV (47.58% n=59) y hMPV (14.52% n=18) o coinfección (con ambos agentes) 19.35% n=24. Al realizar el análisis, nos percatamos que habían muestras que no resultaron positivas para hRSV o hMPV por este método, por lo cual se les denominó como “Negativa para hRSV y hMPV”, para este rubro se obtuvo un 18.55% n=23. Ver gráfico 2.

6.2.2.1. Relación de fusogenicidad con agente(s) viral(es)

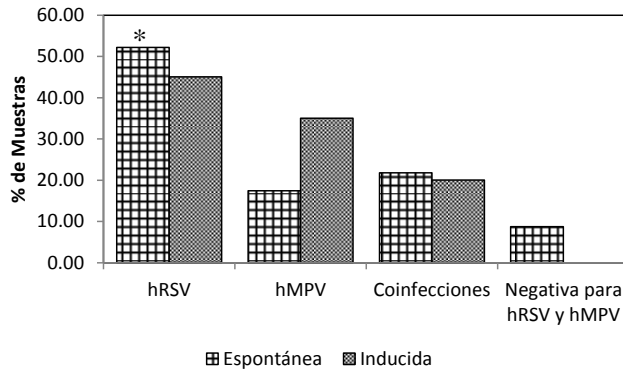


Gráfico 3. Agentes virales identificados en las muestras con IRA.*p<0.01

Con los resultados obtenidos en el cultivo celular y los agentes virales identificados en cada muestra, se procedió a relacionarlos con el tipo de fusogenicidad que se presentó durante los pases ciegos. Como puede notarse en el gráfico 3, en hMPV se observa una mayor

proporción de muestras fusogénicas inducidas por el tratamiento con tripsina TPCK, sin embargo, no hubo alguna diferencia significativa que nos indicara esta relación ($z=2.12, p=0.0678$); en donde sí observamos una diferencia, comparada con las demás categorías (hMPV, coinfecciones e indeterminado) fue en la presencia de muestras fusogénicas espontáneas con hRSV ($z=13.7, p<0.01$). Ver gráfico 3.

6.2.3. Ensayos de RT-PCR para la detección de hMPV.

6.2.3.1. Diseño de oligonucleótidos específicos.

Para el diseño y elección de los oligonucleótidos específicos, se tomaron en cuenta diferentes características que se enlistan a continuación: %G-C mayor al 35%, temperatura de alineamiento de 56-60°C, tamaño de 22-27nt, sin formación teórica de estructuras secundarias y especificidad para el gen seleccionado. Tomando en cuenta estas características, a continuación se muestra un listado de los oligonucleótidos seleccionados.

Tabla 3. Características de los pares de oligonucleótidos específicos para cada gen.

Gen	Subtipo	Sentido	Oligonucleótidos	Estructura secundaria Energía libre [kcal/mol]	Tm [°C]	BLAST y Alineamiento con secuencia consenso	Tamaño del producto pb
N	GENERAL	FW	5' CAACAGCAGTGACACCCTC3'	0	36.55	++	599
		RV	3' ACTCATACCGTTTCGTAA5'	-0.48	33.05	++	
M		FW	5' ATGCGACTGTAGCACTTGACG3'	-1.09	34.92	+++	365
		RV	3' TACTTGTAGGGTTTCCGT5'	-0.16	31.11	++	
L		FW	5' CAACCAGGAAAACAGCGACA 3'	0	32.24	+++	619
		RV	3' GCCATAACTTCTACCACAG 5'	0	32.3	++	
F		FW	5' AAGTGCAGACATTGATGACCT 3'	0	35.63	++++	196
		RV	3'GACCAACGAACGATGTTTCC 5'	0.05	38.77	++++	
F	B	FW	5' GCCATAGCCCAAACCATA 3'	0	38.93	++	447
		RV	3' CCCTGTAACGACTAGACT 5'	0	35.81	++	

FW. Forward; RV. Reverse

Nota: Las cruces en la columna de BLAST y alineamiento fueron colocadas según la homología observada con la secuencia consenso: ++++100-90%; +++90-80% y ++80-70

6.2.3.2. Amplificación de los genes de hMPV.

Se realizaron ensayos de estandarización de condiciones de amplificación, para cada par de oligonucleótidos específicos pertenecientes a los genes N, M, F y L, para ello se utilizaron como controles: 1) Positivo, el control interno establecido a partir de una muestra clínica, 2) Negativos: Células HEp-2 sin infectar, hRSV subtipo A y B y aMPV (Metapneumovirus aviar) y, finalmente 3) Control de reacción, donde se substituyó del cDNA por agua grado biología molecular.

Los oligos que mostraron mejores resultados fueron los que amplificaban N y L, en el caso de M y F no se observó ningún amplicon.

En la estandarización de condiciones para la amplificación del fragmento de F se esperaba una banda de 196pb. Cuando se realizó la electroforesis, se obtuvo un fragmento de amplificación de menor peso que era fácilmente confundido con oligonucleótidos residuales, por ello se descartó la amplificación con estos pares de oligos.

Con las condiciones previamente estandarizadas para amplificar a los genes N y L, se llevó a cabo la confirmación de la infección en los aislados de pacientes que fueron positivos para hMPV por los ensayos de IFD (n=42). La muestra fue

considerada como positiva cuando hubo amplificación por lo menos en alguno de los genes. A continuación se muestra la distribución en la amplificación de las muestras (Ver gráfico 4).

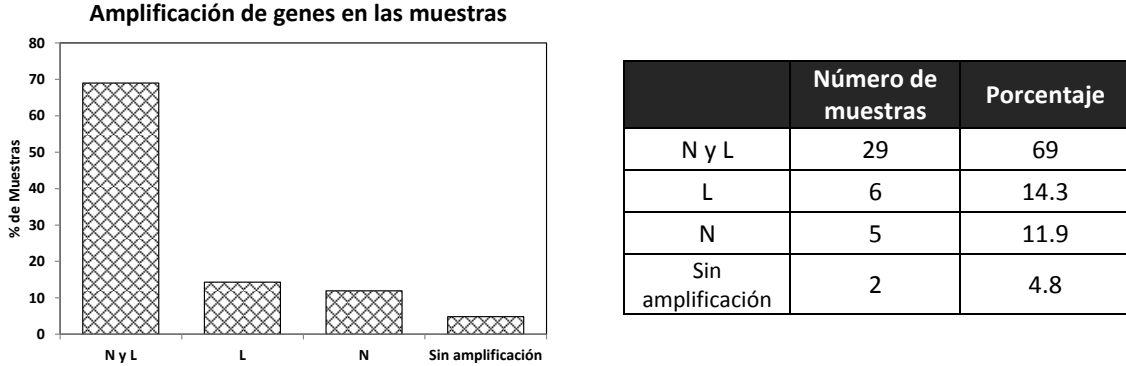


Gráfico 4. Distribución de la amplificación de los genes en las muestras

Como puede observarse, en la mayoría de las muestras se obtuvo amplificación en ambos genes.

En la figura 12 se observa un ejemplo con tres muestras, en las que se utilizaron los genes β -Actina (205pb) para probar la integridad del RNA, L (447 pb), y N (599pb) para corroborar infección por hMPV.

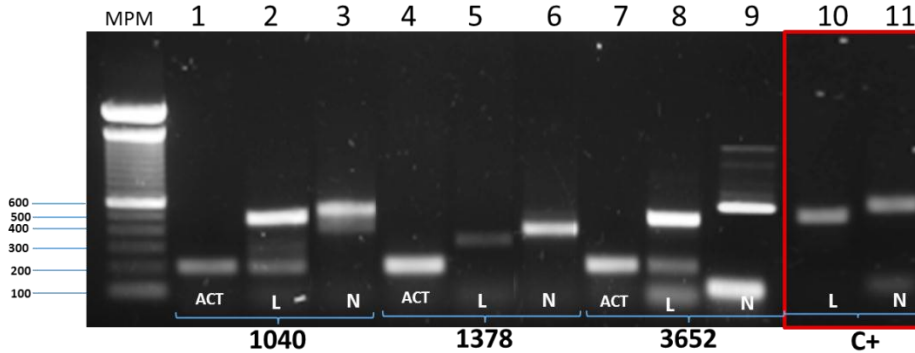


Figura 12. Gel obtenido con primers específicos para genes de β -Actina, L y N con las condiciones previamente estandarizadas, los carriles se indican a continuación .MPM Marcadores de Peso Molecular;1. Gen de β -Actina de la muestra 1040; 2. Gen L de hMPV de la muestra 1040; 3. Gen N de hMPV de la muestra 1040; 4. Gen de β -Actina de la muestra 1378; 5. Gen L de hMPV de la muestra 1378 ; 6. Gen N de hMPV de la muestra 1378; 7. Gen de β -Actina de la muestra 3652; 8. Gen L de hMPV de la muestra 3652; 9. Gen N de hMPV de la muestra 3652; 10. Gen L de hMPV del control positivo; 11. Gen N de hMPV del control positivo.

Se observó que algunos de los productos de amplificación de ambos genes no sólo presentaban una sola banda, algunas muestras presentaban bandas con un peso inferior o superior (ver anexo III), lo cual nos sugiere la presencia de variantes en los genes, como se muestra en la figura 12.

Para el gen N, las muestras que sólo amplificaron 1 banda de 599pb representaron el 11.9% (n=5), el porcentaje de las que presentaron bandas adicionales fue 69.52% (n=29) y las que no presentaron banda alguna (n=8), correspondiente a un 19.057%. Ver gráfico 4

De forma similar, para el gen L, las muestras que sólo amplificaron 1 banda de 447pb representaron el 23.81% (n=10), el porcentaje de las que presentaron bandas adicionales fue 59.52% (n=25) y las que no presentaron banda alguna (n=7), correspondiente a un 16.67%. (Ver gráfico 5).

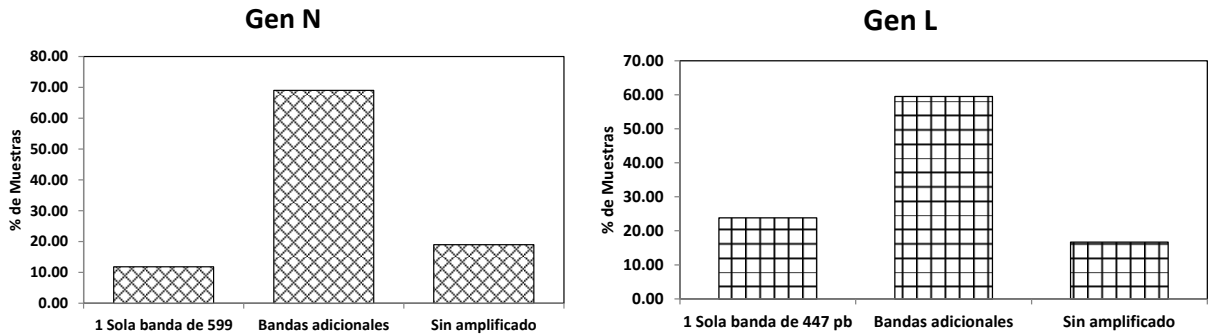


Gráfico 5. Bandas observadas en la amplificación de los genes N y L.

6.2.3.3. Relación de bandas observadas con fusogenicidad.

Se deseaba investigar si la ausencia o tipo de fusogenicidad tenía alguna relación con la amplificación de una o varias bandas en los genes N y L, sin embargo, no hubo alguna diferencia significativa que nos indicara esta relación en ambos genes (Wilcoxon, $p > 0.90$). (Ver gráfico 6 y 7).

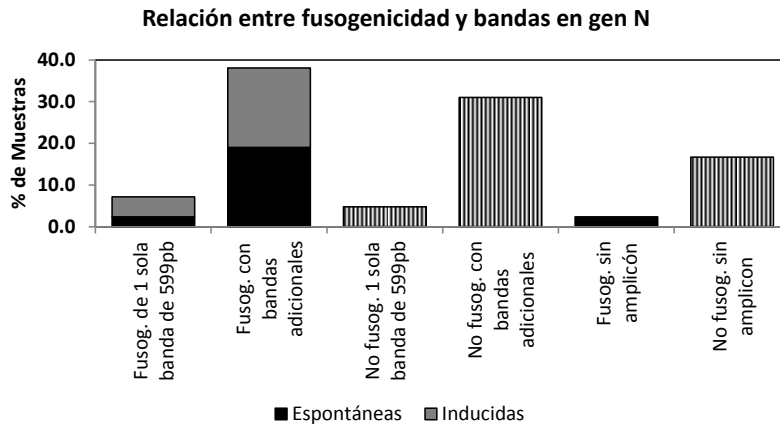


Gráfico 6. Relación de fusogenicidad con bandas observadas en gen N. En las bandas donde se presentó fusogenicidad (fusog), existe una división, que denota si ésta característica fue espontánea (en tercer pase) o inducida con tratamiento de tripsina TPCK).

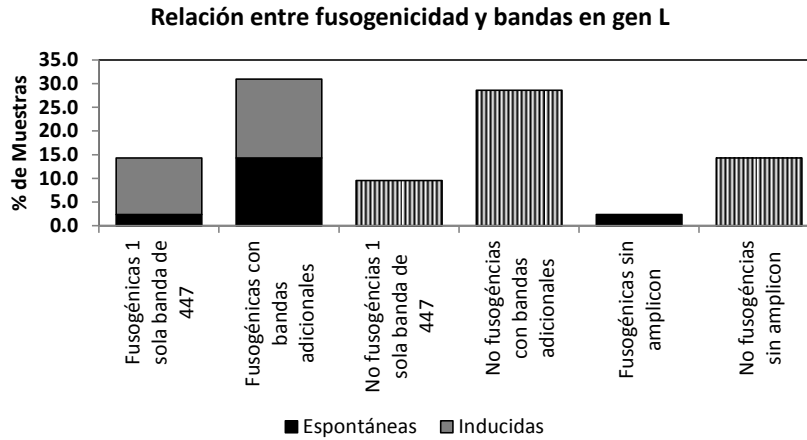


Gráfico 7. Relación de fusogenicidad con bandas observadas en gen L. En las bandas donde se presentó fusogenicidad, existe una división, que denota si ésta característica fue espontánea (en tercer pase) o inducida con tratamiento de TPCK).

6.2.4. Comparación de métodos de detección.

Para la realización de este trabajo se utilizaron los tres métodos principales para el diagnóstico de virus respiratorios.

De acuerdo a los resultados de los ensayos de IFD, se puede calcular la efectividad de los métodos estandarizados en el laboratorio, para el diagnóstico de hMPV.

El desarrollo de la fusogenicidad inducida, presentada durante la infección en el cultivo celular, se consideró indicativo de la presencia de hMPV en las muestras. De las 42 muestras positivas para hMPV por ensayos de IFD, sólo 11 presentaron desarrollo de sincitios (26.2%). En cambio, en los ensayos de RT-PCR, se obtuvieron 40 muestras positivas, (95.3%). La diferencia fue estadísticamente significativa ($z=4.79$; $p<0.01$). Ver gráfico 8.

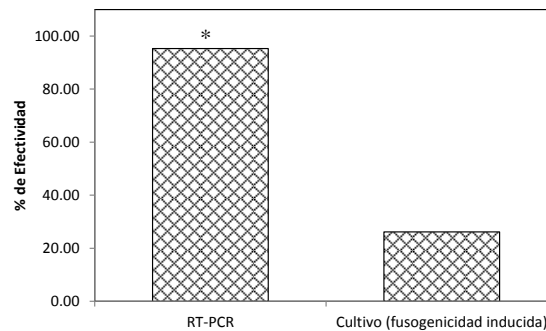


Gráfico 8. Comparación de la efectividad de métodos. Como referencia se tomó el ensayo de IFD.* $p<0.01$ comparada con Cultivo.

6.3 ASOCIACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE LABORATORIO Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS MUESTRAS CON IRA.

Es importante describir las características clínicas de las muestras, debido a que posteriormente algunos rasgos se podrán relacionar con la frecuencia de los agentes etiológicos.

6.3.1. Edad.

Como se mencionó con anterioridad, hRSV y hMPV se presentan principalmente en pacientes pediátricos, personas inmunosuprimidas y adultos mayores. En nuestro trabajo se pudieron observar tres cohortes principales: pacientes pediátricos (0-11 años, 79.5% n=62), población joven (12-60 años, 12.8% n=10) y adultos mayores (mayores de 60 años, 7.7% n=6).

Como se observa, el mayor porcentaje se concentra en la primer cohorte (Gráfico 9A). De acuerdo a diversos estudios, la mayor incidencia de hRSV y hMPV es en pacientes pediátricos, por lo cual, en nuestra población de estudio describimos de manera detallada este grupo. Observamos que la incidencia de IRA es mayor en el rubro de 7 meses a 2 años (0.6<2), con un 48.7% n= 38; en segundo lugar están los niños menores a seis meses con 23.1% n=18 (Gráfico 9B).

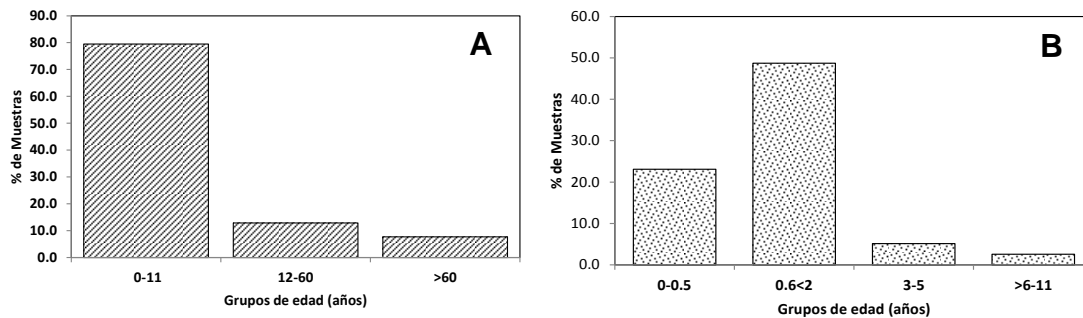


Gráfico 9. Porcentaje de incidencia de IRA en las diferentes cohortes incluidas en el estudio. A. En la totalidad de la población estudiada. B. En la población pediátrica.

6.3.1.1. Relación entre edad y agente(s) viral(es)

Dentro de los grupos de edad se observó que estos agentes etiológicos se presentan mayoritariamente en la población de 0-11 años (gráfico 10A), por ello, dentro de este rubro, se desglosaron diferentes cohortes (ver gráfico 10B). Como puede observarse hRSV se presenta con una

incidencia mayor a edades más tempranas (0-2 años), mientras que hMPV se presenta a edades más tardías (posterior a los 6 meses).

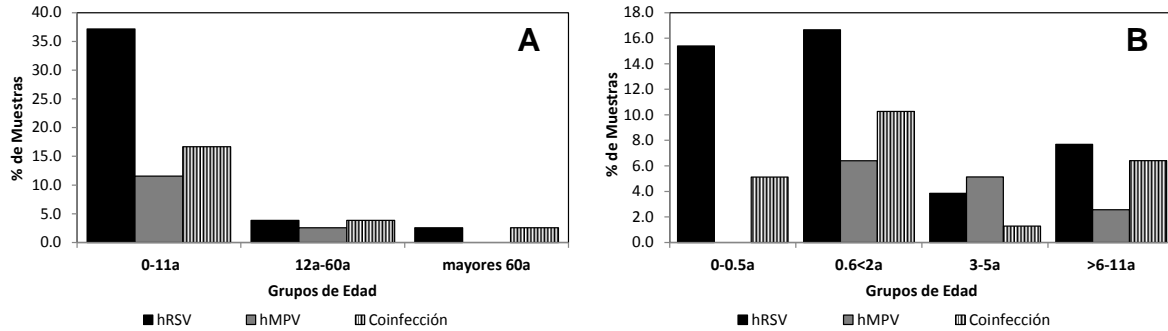


Gráfico 10. Porcentaje de incidencia de IRA en las diferentes cohortes de edad, catalogada por agente etiológico. A. En la totalidad de la muestra. B. En la cohorte pediátrica.

6.3.2. Sexo.

Obtuvimos un 39.3% (n=33) de muestras pertenecientes al sexo femenino y un 60.7% (n=51) al masculino. Las frecuencias se clasificaron por agente etiológico (Gráfico 11B), se observó que hRSV afecta en mayor proporción a los individuos de sexo masculino ($z=13.39$; $p<0.01$).

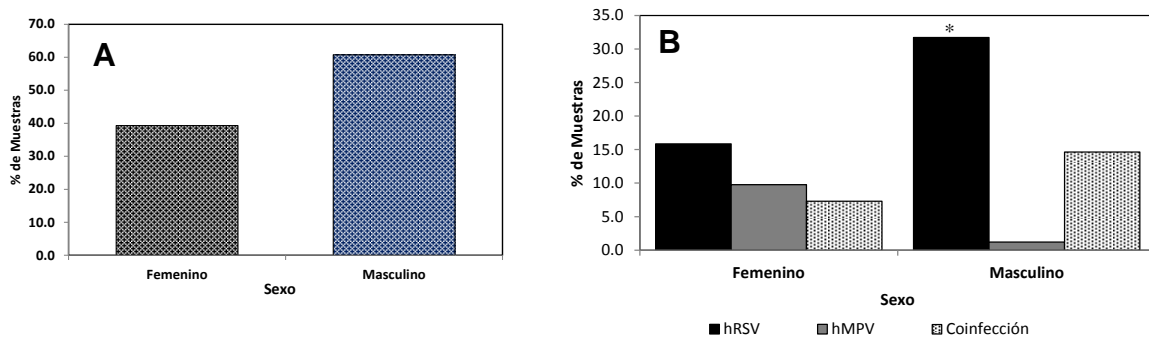


Gráfico 11. Porcentaje de incidencia de IRA catalogada por sexo. A. En la totalidad de la muestra. B. Por agente etiológico.* $p<0.01$.

6.3.3. Tipo de muestra

Para conocer el agente etiológico de una infección respiratoria se debe obtener una muestra de los fluidos del tracto respiratorio, en nuestro caso las muestras se obtuvieron por exudado faríngeo (EFAR, 52.1% n=38), exudado nasofaríngeo

(ENASO 6.8% n=5) y sobrenadante, del cual no se tiene claro el origen de la obtención de la muestra (EFAR o ENASO 41.1% n=30) .Gráfico 12.

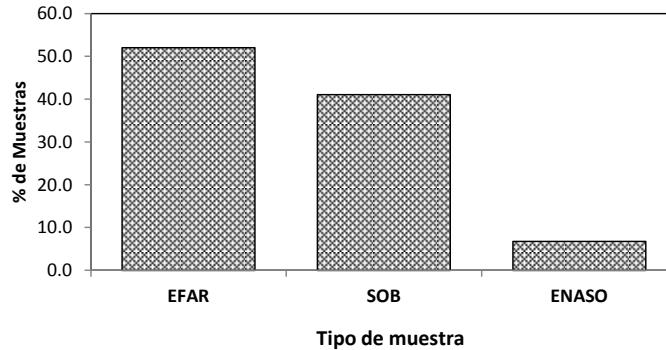


Gráfico 12. Tipo muestra para identificar IRA.

6.3.4. Diagnóstico clínico.

Como se mencionó en las secciones de antecedentes e introducción, las IRA tienen diversos agentes etiológicos y pueden presentar numerosas patologías. En esta sección se expone el diagnóstico por el cual se les realizó la toma de muestra para determinar el agente etiológico.

En el gráfico 13 podemos observar que las causas más comunes son Influenza con un 29.8% (n=25), posteriormente nos encontramos a la Enfermedad Tipo Influenza (ETI) que presenta un 26.2% (n=22), en tercer lugar se localiza la Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG) con un 17.9% (n=15), posteriormente está la Infección Respiratoria Aguda (IRA) con un 13.1% (n=11). Finalmente se encuentra Bronquiolitis y Neumonía con 7.1% (n=6) y 6% (n=5) respectivamente.

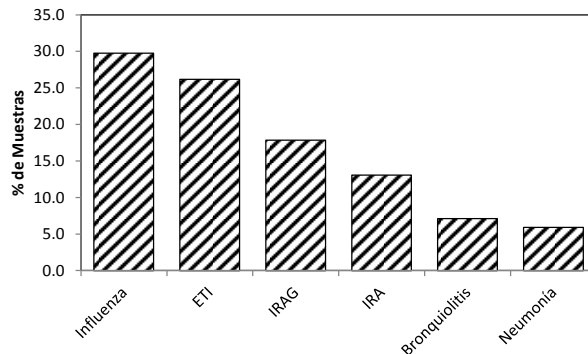


Gráfico 13. Distribución del porcentaje de muestras de acuerdo al diagnóstico presentado para realizar la toma de muestra.

6.3.4.1. Relación del diagnóstico clínico con agente(s) viral(es).

Para conocer si alguno de los agentes virales identificados en las muestras tenían relación con el diagnóstico clínico, se realizaron pruebas estadísticas.

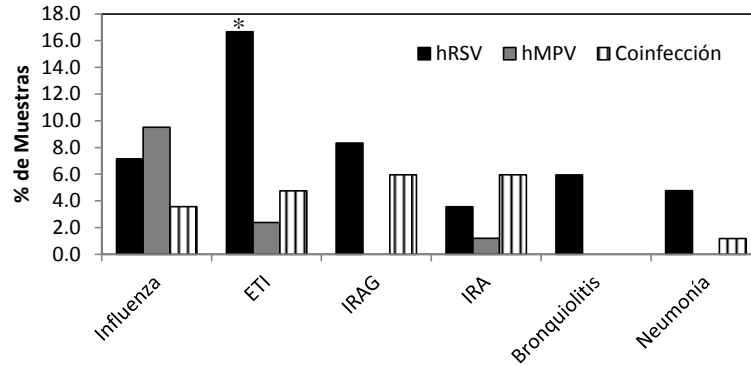


Gráfico 14. Distribución de agente(s) etiológico(s) en las muestras de acuerdo al diagnóstico presentado para realizar la toma de muestra. * $p < 0.01$

En el gráfico 14 podemos observar que en ETI, encontramos mayoritariamente a hRSV como agente etiológico (16.7%, $n=14$). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($z=7.33$ $p < 0.01$).

También hay que notar que hMPV no se presentó en IRAG, bronquiolitis y neumonía.

6.3.4.2. Relación del diagnóstico clínico con fusogenicidad.

No se encontró alguna diferencia significativa que nos indicara relación entre alguno de los diagnósticos clínicos con la fusogenicidad espontánea o inducida ($z=1.57$; $p=0.1147$). Ver gráfico 15.

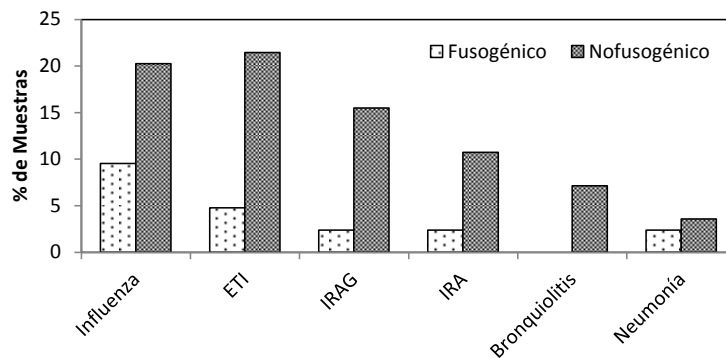


Gráfico 15. Relación de diagnóstico clínico y fusogenicidad.

6.3.4.3. Relación del diagnóstico clínico con bandas amplificadas en los genes N y L de hMPV.

El número de bandas en los genes amplificados, sugiere la presencia de variantes virales, las cuales deben ser confirmadas posteriormente por secuenciación. Sin embargo, decidimos comprobar si existía alguna relación entre estas “variantes” y el diagnóstico clínico.

Al observar el gráfico 16A, notamos que prevalecen las bandas adicionales, en particular en Influenza se presentan más frecuentemente que en los demás diagnósticos; esta diferencia fue significativa ($z=4.79$; $p<0.05$).

En el gráfico 16B observamos que aparece con mayor frecuencia “una banda de 447pb” en los diversos diagnósticos. En el análisis estadístico de los resultados para este gen, se encontró que la diferencia significativa se presentaba en los datos de Influenza, ($z= 4.79$; $p<0.05$)

Cabe notar que en IRAG y Neumonía, solo se presentaron bandas adicionales.

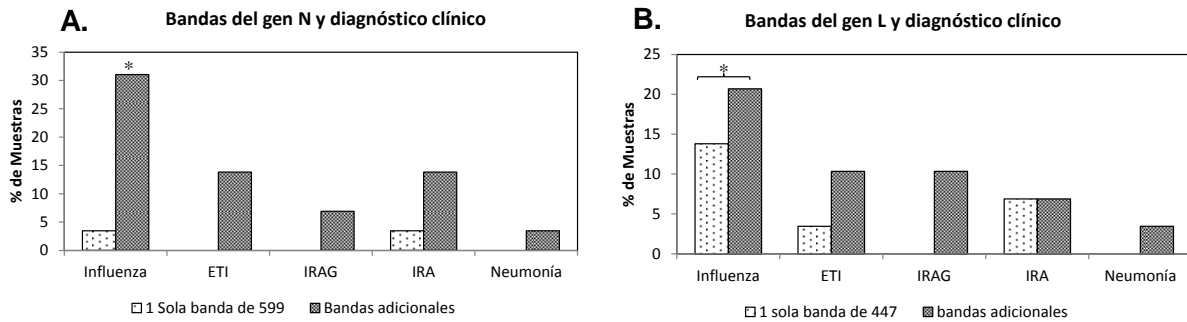


Gráfico 16. Relación de diagnóstico clínico y bandas. A. En gen N. B. en gen L.* $p<0.05$ en ambos casos.

6.3.5. Estado clínico del paciente

Las IRA pueden presentar diversas manifestaciones, que son de gran importancia para el sector salud, debido a que las atenciones que se brindan a la población para el mejoramiento de la salud, varían de acuerdo al estado clínico del paciente. En las muestras, observamos que los pacientes hospitalizados/Casos graves, se presentaron con 59% ($n=36$), seguidos por los casos no graves con un 34.4%

(n=21) y finalmente la frecuencia de las personas en tratamiento o que reportaron defunción fueron 3.3% (n=2 cada uno). (Ver gráfico 17)

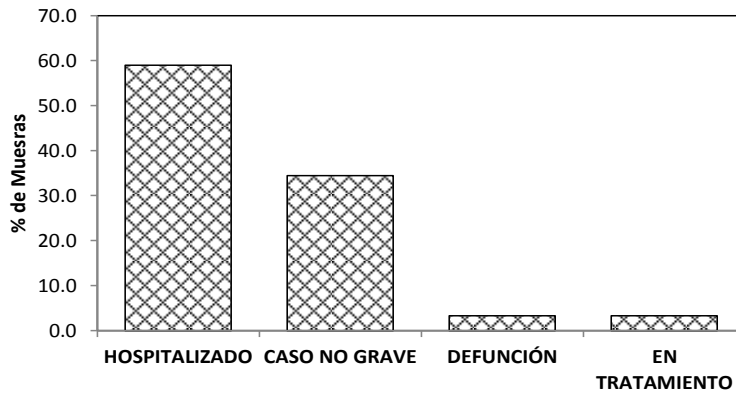


Gráfico 17. Distribución del porcentaje de muestras de acuerdo al estado del paciente con IRA.

6.3.5.1. Relación del estado del paciente con agente(s) viral(es).

Como puede observarse en el gráfico 18, hRSV (36.1%, n=22) se asocia a pacientes hospitalizados ($z=14.3$; $p<0.01$). Además, encontramos que las coinfecciones (16.4%, n=10), se relacionan con los casos no graves ($z=5.05$; $p<0.01$). No se observó alguna asociación significativa relacionada con hMPV.

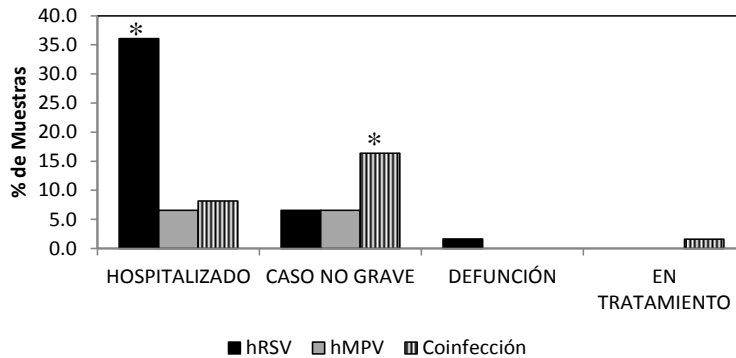


Gráfico 18. Distribución de agente(s) etiológico(s) en las muestras de acuerdo al estado clínico del paciente. * $p<0.01$

6.3.5.2. Relación del estado del paciente con fusogenicidad.

Al analizar la relación entre la fusogenicidad y el estado clínico, se encontró una diferencia significativa entre la no fusogenicidad con las muestras procedentes de pacientes hospitalizados o en casos graves ($z=9.81$; $p<0.01$).

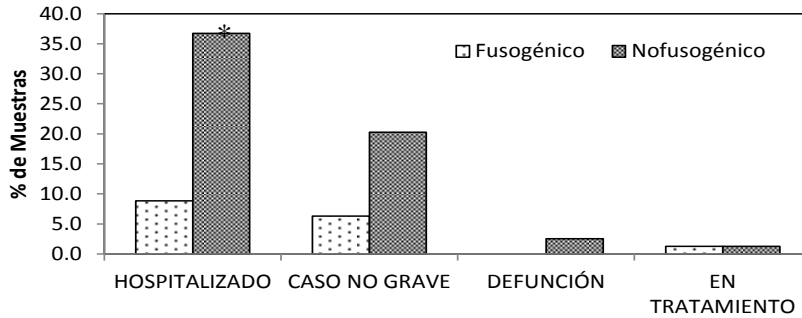


Gráfico 19. Relación de estado clínico del paciente y fusogenicidad. * $p<0.01$

6.3.5.3. Relación del estado clínico del paciente con bandas amplificadas en los genes N y L de hMPV.

La relación del estado clínico del paciente con variantes virales es de gran importancia, por ello decidimos comprobar si existía alguna asociación.

Al observar el gráfico 20A, notamos que prevalecen las bandas adicionales, encontramos diferencia significativa al comparar a los pacientes hospitalizados y los casos no graves con los que se encuentran en tratamiento ($z=4.94$, $p<0.01$). En el gráfico 20B, observamos mayor frecuencia del rubro de una banda del peso esperado (447pb), sin embargo no se encontró diferencia significativa entre los diferentes estados clínicos ($z=1.41$; $p=0.3146$).

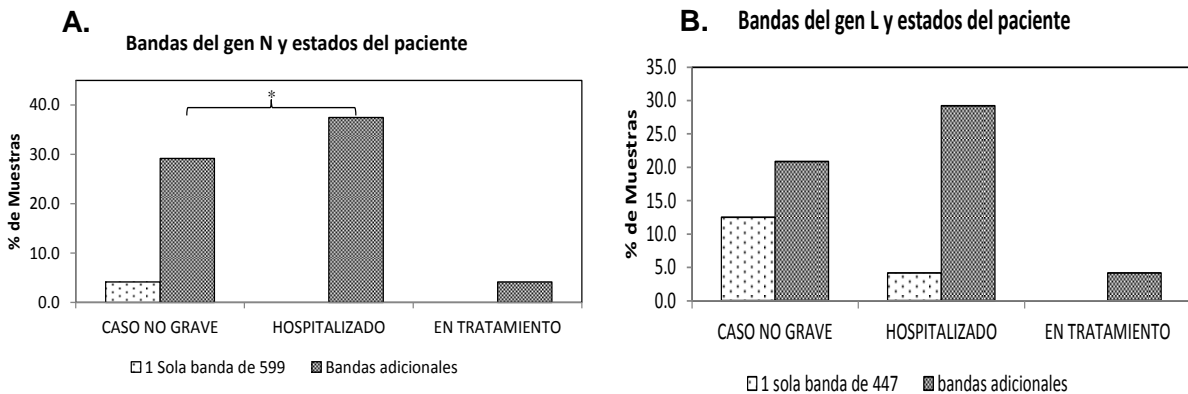


Gráfico 20. Relación de estado del paciente y bandas. A. En gen N. B. En gen L. $p<0.01$

7. DISCUSIÓN

7.1. ESTABLECIMIENTO DEL CONTROL INTERNO DE hMPV.

Debido a que no existe una cepa comercial de referencia para hMPV, el control positivo que se utilizó en este estudio surgió a partir de muestras de pacientes. Sin embargo, al no contar con la certeza de que nos encontráramos con hMPV, se procedieron a hacer diversas pruebas para tener la seguridad de su identidad.

Una de ellas, fue la inducción del desarrollo del efecto citopático con tripsina, lo cual además de darnos un indicio de presencia viral, nos permitiría cuantificar al virus por métodos convencionales, como TCID₅₀.

Se ha reportado que el desarrollo de efecto citopático se ha favorecido mediante proteasas externas para otros virus respiratorios, como el virus de la Parainfluenza humana 1 y 2 [99] y el de la Influenza [100]. Es por ello que se estandarizaron las condiciones para que se desarrollara fusogenicidad.

Se seleccionaron diversas condiciones, concentraciones y tipo de tripsina, en las cuales, como objetivos principales se encontraban: i) El menor daño posible a la monocapa y ii) Desarrollo de sincitios.

La línea celular HEp-2, está reportada como permisible para hMPV, sin embargo se ha observado que es altamente sensible a los tratamientos con tripsina, por ello se eligieron concentraciones más bajas a las reportadas por Tollefson *et al* [101] en un rango de 0.01%-0.005%. Además se observó que si a la suspensión viral se le realiza un pase posterior al tratamiento con tripsina, sin añadir la proteasa, se obtienen mejores resultados que en el primer pase, debido a que la concentración de tripsina residual es suficiente para inducir fusogenicidad y no daña la monocapa celular.

El tratamiento de elección fue el realizado con TPCK, como lo sugieren Schickli *et al* [102]. Se eligió debido a que el daño en la monocapa fue sustancialmente menor y hubo mayor formación de sincitios, esto se debe a que contiene el inhibidor fenilalanilclorometilcetona (PCK). Las soluciones de tripsina comercial contienen además quimiotripsina, lo cual las hacen más agresivas con las células, sin embargo el inhibidor que contiene la TPCK, no afecta la actividad de la tripsina, pero desactiva la quimiotripsina. Esto es importante debido a que permitió que el

efecto de la tripsina en la monocapa celular fuera más suave, sin afectar la formación de sincitios.

Finalmente se aplicó el tratamiento de elección a las dos muestras presuntivas para hMPV. Se confirmó la presencia de hMPV por ensayos de IFD en la muestra que desarrolló fusogenicidad, se propagó y se tituló por TCID₅₀. De esta manera se estableció el control interno del laboratorio para hMPV, que sirvió como referencia para los ensayos de IFD y RT-PCR. Cabe destacar que no se repitió la aplicación del tratamiento con tripsina, en pases posteriores la fusogenicidad se desarrolló de manera espontánea, lo cual presumiblemente nos indica que emergieron mutantes independientes de tripsina, similar a lo que sugiere Schickli *et al*^[102].

7.2. RESULTADOS DEL LABORATORIO INFECCIÓN *IN VITRO*, ENSAYOS DE IFD Y RT-PCR.

7.2.1. Infección *in vitro*.

El cultivo celular, es el método de referencia para el diagnóstico viral. Por ello, se realizaron tres pases ciegos a las 124 muestras obtenidas. Se nombran “ciegos”, debido a que no conocíamos con precisión si había algún agente etiológico viral.

Estos pases, además de enriquecer el título viral, nos permitieron obtener un banco de aislados que sirven como respaldo de las muestras y nos proveen de una cantidad suficiente de virus para realizar otros ensayos.

Como ya se ha mencionado, la fusogenicidad de hMPV se ve favorecida por la presencia de tripsina, debido a que auxilia a la ruptura de las unidades F1 y F2 de la proteína viral de fusión, lo cual permite que los dominios de fusión queden expuestos^[28]. Por ello, a las muestras que no desarrollaron sincitios, se les aplicó el tratamiento previamente establecido con TPCK, si el ECP se presentaba, nos daba un indicio de presencia viral, presuntivamente de hMPV, dados los antecedentes teóricos y lo observado en el control interno.

7.2.2. Ensayos de IFD.

Los resultados presuntivos en los pases ciegos, debían de ser corroborados por otra técnica diagnóstica con mayor sensibilidad y especificidad como ensayos de IFD, los cuales reconocen proteínas virales de superficie (F y G) en células infectadas.

Nuestros resultados indican que hRSV se presentó con un 47.58%. Este resultado contrasta con el 74.7% obtenido en el 2012 por Rodríguez y colaboradores en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”^[96], sin embargo nos acercamos más a los datos obtenidos por la OPS, que reporta una incidencia de 32.44%^[3].

Para hMPV observamos un 14.52%, recientemente no se han publicado datos nacionales acerca de este patógeno, el último reporte fue el de Noyola y colaboradores en 2005^[91], donde encontraron un 8.4%. Sin embargo diversos reportes mundiales han obtenido una incidencia desde el 4-43%^[2, 103], dependiendo de la zona geográfica, la edad del paciente y la patología del mismo. En las coinfecciones (hRSV y hMPV) obtuvimos un 19.35%, un porcentaje un poco mayor al reportado a nivel mundial (del 5-17%)^[32].

7.2.2.1. Relación de fusogenicidad con agente(s) viral(es)

Como se ha mencionado, los resultados en cultivo celular nos dieron indicios de presencia viral, sin embargo estos datos se corroboraron con los ensayos de IFD. De esta manera se pudieron relacionar los agentes etiológicos y el desarrollo de fusogenicidad espontánea o inducida.

Como era de esperarse, del mayor desarrollo de sincitios lo presentó hRSV, el cual se asoció con la presencia de fusogenicidad espontánea ($p < 0.01$). Sin embargo, también fue favorecido con el tratamiento de TPCK.

Se esperaba que hMPV se relacionara con el desarrollo de fusogenicidad inducida, posterior al tratamiento con TPCK, sin embargo, no se encontró asociación significativa.

7.2.3. Ensayos de RT-PCR para la detección de hMPV

Para poder realizar la caracterización de nuestro control interno, era necesario identificarlo genéticamente, para ello se realizó la extracción y purificación de ácidos nucleicos, posteriormente la retrotranscripción y finalmente la estandarización de condiciones para la amplificación de los fragmentos de genes seleccionados.

Estos ensayos sólo se realizaron en muestras con hMPV, debido a que en el laboratorio ya existía una metodología desarrollada para la detección de hRSV por RT-PCR, por lo cual, en este trabajo se procedió a desarrollar la metodología para la detección de hMPV.

7.2.3.1. Diseño de oligonucleótidos específicos y amplificación de genes.

En la estandarización de condiciones para obtener un producto de RT-PCR intervienen múltiples factores, es por ello que el diseño de los oligonucleótidos y la estandarización de los fragmentos amplificados fue muy cuidadoso, tomando en cuenta diversas características y condiciones.

La síntesis del cDNA se realizó con oligo dT, que nos permitió enriquecer el templado para la reacción de amplificación. Se utilizó este reactivo debido a que tratamos con muestras y de esta manera asegurábamos que el RNA pudiera ser detectado.

La estandarización de condiciones fue realizada con el control interno establecido, variando la temperatura de. Otra condición modificada fue la concentración de magnesio, para conseguir mayor especificidad en el caso de N.

Finalmente, aunque se probaron diversas condiciones para la amplificación de los cinco fragmentos de genes propuestos (N, M, L, F y FB), de acuerdo a las condiciones de amplificación se establecieron dos pares para confirmar infecciones por hMPV (correspondientes a los genes L y N), que son los más utilizados para corroborar la presencia de hMPV debido a que son conservados en los cuatro subtipos.

Posteriormente estas condiciones fueron aplicadas a las muestras. Como se muestra en la figura 12, se observó una gran variación de las bandas obtenidas con un peso inferior o superior al esperado para ambos genes. Lo cual nos podría dar un indicio de variantes en los genes que fueron amplificados, cabe recalcar que esta suposición debe ser confirmada por secuenciación, de ninguna manera la observación de estas bandas adicionales nos confirma tal variación. También hay que tomar en cuenta que la estandarización de condiciones fue realizada con el control interno, que finalmente es un aislado de una muestra clínica y no está completamente caracterizado, incluyendo que no se conoce a que subtipo de hMPV pertenece, por lo cual hasta el momento sólo podemos especular que el bandeo presentado en las muestras puede deberse a la presencia de variantes.

7.2.3.2. Relación de bandas observadas con fusogenicidad.

La fusogenicidad y la presencia de variantes en los genes virales, son dos factores importantes en la patogenicidad de hRSV y hMPV.

El desarrollo *in vitro* de sincitios nos indicó que el virus presente en la muestra tenía la capacidad de infectar otras células sin salir de la célula hospedera, además el desarrollo de variantes en los genes virales (observadas de manera indirecta por la aparición de bandas de otros pesos moleculares) son de gran relevancia, debido a que ambas características se relacionan con evasiones al sistema inmune, lo cual podría implicar una infección más agresiva.

Principalmente, en la literatura se ha reportado que para miembros de la familia *Paramixoviridae* las variantes relacionadas con el desarrollo o pérdida de fusogenicidad se encuentran en las glicoproteínas de superficie^[29]. Sin embargo para sarampión se ha observado que variantes truncas en la proteína de matriz facilitan el desarrollo de fusogenicidad^[104, 105]. De tal manera que si se hubiera encontrado que las variantes en el gen N o L repercutían en el desarrollo de fusogenicidad, implicaba que en el virus se habían realizado cambios a nivel genómico para adquirir este mecanismo. Sin embargo no se encontró asociación alguna.

7.2.3. Comparación de métodos de detección.

El diagnóstico de las infecciones virales respiratorias se ha basado tradicionalmente en la técnica del cultivo celular a partir de secreciones respiratorias. La infección viral se determina por la aparición del efecto citopático en la monocapa celular tras la inoculación. Sin embargo, el cultivo como método de diagnóstico es lento, necesita un mínimo de 5-7 días y su sensibilidad puede verse afectada por la labilidad de los virus, puesto que la integridad de estos y su concentración (carga viral) es primordial. De modo que, aunque el aislamiento viral es el “estándar dorado” para el diagnóstico, su costo y la infraestructura necesaria son una limitante para su aplicación en los laboratorios de diagnóstico rutinario.

La inmunofluorescencia permite obtener resultados en el mismo día, aunque se requiere de un microscopio de fluorescencia y personal entrenado para su observación, además puede presentar falsos positivos por uniones inespecíficas. Para poder analizar una muestra por IF, ésta debe contener un número aceptable de células, debido a ello, es conveniente adiestrar al personal que se encarga de la obtención de muestras.

El uso de la detección de ácidos nucleicos se está incrementando rápidamente, debido a una mayor sensibilidad, rapidez y a que no es necesaria la presencia de virus viables en la muestra clínica.

En nuestro estudio los ensayos de RT-PCR, demostraron mayor sensibilidad que el cultivo celular. Estos resultados se obtuvieron en base a los ensayos de IF, que se tomaron como referencia, debido a que se utilizaron anticuerpos comerciales.

7.3 ASOCIACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE LABORATORIO Y LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS CON IRA.

En este estudio se utilizaron 124 aislados virales, sin embargo cabe destacar que los resultados obtenidos no toman en cuenta todas las muestras, debido a que las instituciones que nos las facilitaron (InDRE y la UASLP) no poseían el reporte

completo de los datos, sin embargo al realizar el análisis en algunas características se encontraron algunas diferencias significativas.

Las infecciones respiratorias por hMPV y hRSV parecen afectar a la misma cohorte de edad (0-11 años). En nuestro estudio la edad media de los pacientes pediátricos fue de 18.9 meses, es un poco inferior a la descrita en otro estudio nacional realizado por Rodríguez *et al*^[96] donde reportan una edad media de 22 meses, En América Latina, otros reportes recientes informan que en Brasil fue de 8 meses^[106]. Si se toman en cuenta a los pacientes menores de 18 años la media es de 21.6 meses, aun así es baja en comparación con la reportada en Chile (33 meses)^[107]. sin embargo la media pediátrica es superior a la descrita por otros grupos, Reina y colaboradores en España observaron una edad media de 12.5 meses^[108], estudios realizados en otros países, como en Israel se ha reportado una media de 17.6 meses^[109]. Aparentemente, observamos que la frecuencia de hRSV es mayor a edades más tempranas, esto concuerda con lo reportado por Paperburg *et al*^[5].

En nuestro estudio encontramos que los pacientes de sexo masculino se asocian a las infecciones por hRSV, lo cual concuerda con estudios que han encontrado relaciones niño:niña hasta de 3:1^[110], o mayor susceptibilidad personas del sexo masculino en etnias o grupos raciales, como los nativos americanos o las poblaciones inuitas Canadienses^[5], sin embargo la información reportada al respecto es controversial, ya que en otros reportes no han logrado demostrar tanta diferencia entre la incidencia por sexo^[96, 106, 108].

No pudimos llevar a cabo una relación con la frecuencia estacional, debido a que las muestras provienen de diferentes años y, para observar esta característica se requiere de un muestreo a lo largo de todo el año.

La relación entre el diagnóstico clínico y hRSV y hMPV ha sido motivo de diversos estudios clínicos. Obtuvimos una asociación entre el diagnóstico de enfermedad tipo influenza (ETI) con hRSV, lo cual nos está indicando que pueden existir cuadros clínicos que se confunden con influenza, sin que éste sea su agente etiológico y ello repercute en el tratamiento que se indica para la infección.

Ninguno de los diagnósticos se relacionaron con el desarrollo de fusogenicidad, sin embargo la presencia de bandas adicionales se asoció con el diagnóstico por influenza, además se reparó en que sólo estaban presentes en IRAG y neumonía, lo cual nos puede señalar que la aparición de estas “variantes” identificadas en los genes N y L de hMPV presente en coinfecciones, podría aumentar la gravedad de la infección dirigiendo el diagnóstico hacia patologías más exacerbadas. Empero para hMPV, no podemos afirmar tal información, debido a que no existen reportes que apoyen esta teoría.

En general la detección de mutaciones conocidas y nuevas es de gran importancia en el tratamiento, ya que al conocerlas se podría identificar a los pacientes que desarrollan la resistencia temprana, lo que permitiría una intervención oportuna evitando el fracaso del tratamiento antiviral.

En referencia al estado clínico del paciente, se observó una relación entre la presencia de hRSV en pacientes hospitalizados, además las coinfecciones se asociaron con los casos no graves. Algunos estudios parecen indicar que la gravedad de las infecciones por hMPV es inferior a las causadas por el hRSV^[111, 112].

Se ha intentado buscar algunas características clínicas o epidemiológicas diferenciales con las infecciones respiratorias causadas por el hRSV, sólo se han podido observar diferencias significativas en que la infección con hMPV presenta una edad media más elevada (afecta a mayores de 6 meses), presenta una tasa de sibilancias recurrentes mayor y una proteína C reactiva menos elevada^[108, 113]. En términos generales, se reporta que las infecciones por hMPV son menos graves y precisan de menos ingresos hospitalarios, aunque depende de los grupos de edad y las zonas geográficas consideradas. En cuanto a las coinfecciones con hRSV y hMPV, se ha indicado que son frecuentes^[107]. Drews y colaboradores, plantean que la presencia de hRSV en las coinfecciones se debía a que este virus podría facilitar la infección por un segundo virus respiratorio^[114]. Sin embargo, aún no se ha aclarado su implicación con la severidad de la infección. Algunos estudios indican que el cuadro respiratorio es más severo que con los agentes individuales^[32, 115], mientras que otros no han descrito exacerbación de la

infección^[5, 107]. Si estos resultados contradictorios se deben a diferencias metodológicas o variabilidad en los virus circulantes es desconocida.

Curiosamente, la hospitalización se asoció a las muestras que no desarrollaron fusogenicidad, sin embargo hay que recordar que la respuesta del hospedero a la infección depende de muchos factores, entre ellos el estado inmunológico y la patogenicidad del virus que realiza la infección, por lo cual *in vivo*, no se puede realizar una asociación directa de mecanismos evasores del sistema inmune, como lo es la fusogenicidad, con un estado clínico grave del paciente.

En relación con las bandas amplificadas, se encontraron diferencias entre los pacientes no graves y hospitalizados en comparación con los que se encuentran en tratamiento, la diferencia entre éstos últimos y los hospitalizados es que ya habían sido diagnosticados y al momento de la toma de muestra ya se encontraban en tratamiento, mientras que los hospitalizados habían comenzado su tratamiento hasta su ingreso al hospital. Los pacientes con casos no graves no se encuentran en tratamiento. Por lo cual, ésta pudo haber sido la razón de la presencia de mayores “variantes” en el gen N de hMPV.

8. CONCLUSIONES

- a) Se aisló y se inició con la caracterización de un control interno para hMPV a partir de una muestra clínica.
- b) Se desarrolló una metodología molecular para la confirmación de la infección de hMPV por RT-PCR.
- c) Se obtuvo un banco de 124 muestras..
- d) Reportamos frecuencias epidemiológicas de IRA provocada por dos de los principales agentes etiológicos virales: hRSV 47.58%, hMPV 14.52% y coinfección 19.35%.
- e) Se observó una asociación significativa entre hRSV y diversas características, como el sexo masculino, el diagnóstico clínico de ETI y la hospitalización.

9. PERSPECTIVAS

Aunque en este estudio se trataron 124 muestras, esta población no es lo suficientemente grande para ser representativa, por ello se debe de ampliar el tamaño de muestra. Conforme a este cálculo se necesitan analizar 337 pacientes de acuerdo con cifras actuales (ver anexo IV).

En cuanto a la repercusión clínica, es necesario realizar estudios a largo plazo con información debidamente registrada y disponible, en donde queden asentados los signos clínicos que presenta el paciente, su evolución, si tiene alguna patología que sea factor de riesgo para complicaciones con IRA y si se desarrolla asma o EPOC, estos datos serían de gran ayuda para poder profundizar en el conocimiento de la patogénesis de las IRA por hMPV, para entender cómo responde la inmunidad de la población juvenil y personas mayores e inmunocomprometidas hacia esta infección, a pesar de que se han realizado un gran número de estudios sobre el impacto clínico de este virus, son necesarios estudios más detallados para aclarar la importancia de la variación antigénica en la población humana. Por esta razón, este estudio se complementaría de una manera muy importante realizando la secuenciación de muestras y del control interno de hMPV, para confirmar las posibles variantes observadas en los genes L y N y reconocer a que genotipo pertenecen, esto ayudará a la inferencia de patrones de circulación del virus.

En cuanto al desarrollo de la metodología molecular para la detección de hMPV, restaría realizar una comparación entre diversos métodos comerciales aprobados por la FDA y el nuestro.

Todo ello es importante para el desarrollo de vacunas eficaces, diseño de antivirales, el monitoreo y registro de información epidemiológica, que mantiene vigilados los patógenos circulantes que tienen impacto en la salud y economía de la población.

10. REFERENCIAS

1. F. Feuillet, B.L., M. Rosa-Calatrava, G. Boivin, *Ten years of human metapneumovirus research*. Journal of Clinical Virology, 2012. **53**: p. 97-105.
2. Akhras N., W.J., Newton D., *Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus: subtle differences but comparable severity* Infectious Disease Reports, 2010. **2**(2): p. 35-39.
3. OMS, O. <http://new.paho.org/>. 2013.
4. commons, W. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Respiratory_Syncytial_Virus_\(RSV\)_EM_PHIL_2175_lores.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Respiratory_Syncytial_Virus_(RSV)_EM_PHIL_2175_lores.jpg). 2006 [cited 2013].
5. Papenburg J., B.G., *The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus*. Reviews in Medical Virology, 2010. **20**: p. 245-260.
6. WHO. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index2.html. 2009 [cited 2013].
7. Van den Hoogen, B.G., et al., *Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients*. J. Infect. Dis., 2003. **188**: p. 1571–1577.
8. Blount RE Jr, M.J., Savage RE, *Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza*. Proc Soc Exp Biol Med, 1956. **92**(3): p. 544-549.
9. Van den Hoogen BG, d.J.J., Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al., *A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease*. Nat Med, 2001. **7**: p. 719–24.
10. L., H.C.a.B., *Emerging paramyxoviruses: molecular mechanisms and antiviral strategies*. Expert Rev. Mol. Med, 2011. **13**(e6).
11. Van den Hoogen BG, H.S., Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, de Swart RL, et al., *Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**: p. 658-66.
12. Huck B, E.M., Bertz H, Peyerl-Hoffman G, Kern WV, Neumann-Haefelin D, and e. al., *Human metapneumovirus infection in a hematopoietic stem cell transplant recipient with relapsed multiple myeloma and rapidly progressing lung cancer*. J Clin Microbiol, 2006. **44**: p. 2300–3.
13. Cowton V., M.D., Fearn R. , *Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis*. J Gen Virol, 2006. **87**(7): p. 1805-1821.
14. Fields, *Virology*.
15. Nobuhisa I., T.E., Rika E., Xiaoming M., Hideaki K., Hiroaki I. and Kunihiko K., *High Genetic Diversity of the Attachment (G) Protein of Human Metapneumovirus*. Journal of clinical microbiology, 2004. **42**(8): p. 3406–3414.
16. Tirado Mendoza, R.G., *Expresion de proteínas del virus sincitial respiratorio en células similares a macrófagos persistentemente infectados*, in *Microbiología y Parasitología* 1996, UNAM.
17. UniProtKB. <http://www.uniprot.org>. 2012 [cited 2013 01 Feb 2013].
18. Midulla F., H.Y., Gilbert I., Cirino N., McFadden E., Panuska J., *Respiratory Syncytial Virus infection of human cord and adult blood monocytes and alveolar macrophages*. American review of respiratory disease, 1989. **140**: p. 771-777.
19. Guerrero-Plata A., O.E., Gómez B., *Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production*. Viral Immunology, 2001. **1**: p. 19-30.
20. Li X., F.Z., Alvarez R., Henderson C., Tripp R, *Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infects Neuronal Cells and processes That Innervate the Lung by a Process Involving RSV G Protein*. J. Virol, 2006. **80**(1): p. 537-540.
21. Terrier OCG, L.B., *La génétique inverse chez les paramyxovirus: applications et perspectives*. Virologie, 2008. **12**: p. 15-25.
22. Thammawat S, S.T., Hallsworth PG, Gordon DL., *Role of cellular glycosaminoglycans and charged regions of viral G protein in human metapneumovirus infection*. J Virol, 2008. **82**(23): p. 11767–11774.
23. Cseke G, M.M., Cox RG, Tollefson SJ, Podsiad AB, Wright DW, et al, *Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus*. Proc Natl Acad Sci USA, 2009. **106**(5): p. 1566-1571.
24. Smith EC, P.A., Chang A, Masante C, Dutch RE, *Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry*. FEBS J, 2009. **276**(24): p. 7217-7227.

25. White JM, D.S., Brecher M, Schornberg K, *Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2008. **43**(3): p. 189-219.
26. Hernandez LD, H.L., Wolfsberg TG, White JM, *Virus-cell and cell-cell fusion*. Ann Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 627-661.
27. Kielian M, R.F., *Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(1): p. 67-76.
28. Lamb, R.A., and T. S. Jardetzky, *Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F*. Curr. Opin. Struct. Biol, 2007. **17**(4): p. 427-436.
29. Gardner AE, D.R., *A conserved region in the F(2) subunit of paramyxovirus fusion proteins is involved in fusion regulation*. J Virol, 2007. **81**: p. 8303-8314.
30. Schowalter R., C., Robach J., Buchholz U., Dutch R., *Low-pH Triggering of Human Metapneumovirus Fusion: Essential Residues and Importance in Entry*. Journal of virology, 2009. **83**(3): p. 1511-1522.
31. Sanjan H., G.M., Mohapatra S., *Biología molecular del Virus Sincitial Respiratorio y desarrollo de estrategias profilácticas*. Salud Uninorte Barranquilla, 2006. **22**(2): p. 135-153.
32. Schildgen V., V.D.H.B., Fouchier R., Tripp R., Alvarez R., Manoha C., Williams J. and Schildgen O., *Human Metapneumovirus: Lessons Learned over the First Decade*. Clin. Microbiol. Rev., 2011. **24**(4): p. 734-754.
33. Garcia-Garcia, M.L., et al., *Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5*. Pediatr. Pulmonol., 2007. **42**: p. 458-464.
34. Hansbro N., H.J., Wark P., Hansbro P., *Understanding the mechanisms of viral induced asthma: New therapeutic directions*. Pharmacology & Therapeutics, 2008. **117**: p. 313-353.
35. Guerrero-Plata A., e., *Differential Response of Dendritic Cells to Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **34**: p. 320-329.
36. Neilson K., Y.E., *Demonstration of Respiratory Syncytial Virus in an Autopsy Series*. Fetal & Pediatric Pathology, 1990. **10**(4): p. 491-502.
37. Takaoka, A.Y.H., *Interferon signalling network in innate defense*. Cell. Microbiol, 2006. **8**: p. 182-183.
38. Osamu Takeuchi, S.A., *Innate immunity to virus infection*. Immunological Reviews, 2009. **227**: p. 75-86.
39. Goutagny, N., et al., *Cell type-specific recognition of human metapneumoviruses (HMPVs) by retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) and TLR7 and viral interference of RIG-I ligand recognition by HMPV-B1 phosphoprotein*. J. Immunol, 2010. **184**: p. 1168-1179.
40. Seth, R.B.S., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signalling protein that activates NF-kappa B and IRF-3*. Cell, 2005. **122**: p. 669-682.
41. Lo M., B.R., Holtzman M., *Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Proteins NS1 and NS2 Mediate Inhibition of Stat2 Expression and Alpha/Beta Interferon Responsiveness*. J. Virol, 2005. **79**(14): p. 9315-9319.
42. Liao, S., et al., *Role of retinoic acid inducible gene-I in human metapneumovirus-induced cellular signalling*. J. Gen. Virol, 2008. **89**: p. 1978-1986.
43. Bao, X., et al, *Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses*. PLoS Pathog, 2008. **4**(5 :e1000077): p. 1-12.
44. Jartti, T., B. van den Hoogen, R. P. Garofalo, A. D. Osterhaus, and O. Ruuskanen, *Metapneumovirus and acute wheezing in children*. Lancet, 2002. **360**: p. 393-1394.
45. Laham, F.R., et al, *Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy*. J. Infect. Dis., 2004. **189**: p. 2047-2056.
46. M., V., *Epidemiología molecular del virus sincicial respiratorio en pacientes pediátricos en un período de seis años*. Acta Bioquím Clín Latinoam, 2011. **45**(1): p. 3-45.
47. Murphy BR, O.R., Collins PL, Chanock RM, Prince GA., *Passive transfer of respiratory syncytial virus (RSV) antiserum suppresses the immune response to the RSV fusion (F) and large (G) glycoproteins expressed by recombinant vaccinia viruses*. J Virol, 1988. **62**: p. 3907-10.
48. Collins PL, G.B., *Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis*. J.Virol, 2008. **82**: p. 2040-2055.

49. Wright PF, K.R., Belshe RB, Thompson J, Crowe JE Jr, Boyce TG, et al., *Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy*. Infect Dis, 2000. **182**: p. 1331-1342.
50. JS., O.P.T., *Immune Responses and Disease Enhancement during Respiratory Syncytial Virus Infection*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(541-55).
51. Rodrigo, U.Á., "El virus Sincitial Respiratorio Humano: Diversas estrategias para el desarrollo de una vacuna", in *Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina* 2010, UNAM. p. 47.
52. Skiadopoulos, M.H., et al, *Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity*. Virology, 2006. **345**: p. 492-501.
53. Van den Hoogen, B.G., et al *Experimental infection of macaques with human metapneumovirus induces transient protective immunity*. J. Gen. Virol, 2007. **88**: p. 1251–1259.
54. Hoffman SJ, L.F., FP Polack, *Mechanisms of illness during respiratory syncytial virus infection: the lungs, the virus and the immune response*. Microbes Infect, 2004. **6**: p. 767-772.
55. JS., O.P.T., *Immune Responses and Disease Enhancement during Respiratory Syncytial Virus Infection*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**: p. 541-555.
56. Legg JP, H.I., Warner JA, Johnston SL, Warner, *Type 1 and type 2 cytokine imbalances in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**: p. 633-639.
57. Aizhen L., e., *Haplotype of IL-8 -251T and 781C is associated with the Susceptibility to Respiratory Syncytial Virus*. J Trop Pediatr, 2010. **56**(4): p. 242-246.
58. Wyde PR, C.S., Jewell AM, Boivin G, Piedra PA., *Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro*. Antiviral Res, 2003. **60**(51-59).
59. Chen CH, L.Y., Yang YH, Wang LC, Lee JH, Kao CL, et al., *Ribavirin for respiratory syncytial virus bronchiolitis reduced the risk of asthma and allergen sensitization*. Pediatr Allergy Immunol, 2008. **19**: p. 166-172.
60. TI-RS, G., *Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants*. Pediatrics, 1998. **102**: p. 531-537.
61. Cianci C, M.N., Krystal M., *Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**: p. 289–292.
62. Ison M., M.J., Openshaw P., Zambon M., Osterhaus A., Hayden F., *Current research on respiratory viral infections: Fourth International Symposium*. Antiviral Res, 2002. **55**: p. 227-278.
63. Deffrasnes C, H.M., Prince GA, Boivin G, *Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus*. Antimicrob Agents Chemother, 2008(52): p. 279-287.
64. DeVincenzo J, C.J., Alvarez R, Elbashir S, Harborth J, Toudjarska I, et al., *Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV)*. Antiviral Res, 2008. **77**(225-231).
65. Deffrasnes C, C.M., Goyette N, Cui K, Ge Q, Seth S, et al, *Inhibition of human metapneumovirus replication by small interfering RNA*. Antivir Ther. 2008. **13**: p. 821-832.
66. Connors M, C.P., Firestone CY, Murphy BR. , *Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived*. J. Virol, 1991. **65**: p. 1634-1637.
67. Kalina WV, W.A., Berghaus RD, Gershwin LJ. , *Formalin inactivated bovine RSV vaccine enhances a Th2 mediated immune response in infected cattle*. Vaccine, 2004. **22**(1465-1474).
68. Karron RA, W.P., Belshe RB, Thumar B, Casey R, Newman F, et al., *Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants* J Infect Dis, 2005. **191**: p. 1093-1104.
69. De Waal L, P.U., Yuksel S, van Amerongen G, Nguyen TN, Niesters HG, et al. , *Evaluation of BBG2Na in infant macaques: specific immune responses after vaccination and RSV challenge*. Vaccine, 2004. **22**: p. 915-922.
70. Kamphuis T., e., *Immunogenicity and Protective Capacity of a Viroosomal Respiratory Syncytial Virus Vaccine Adjuvanted with Monophosphoryl Lipid A in Mice*. PLoS ONE, 2012. **7**(5 e36812): p. 1-11.

71. Tang, R.S., et al, *A host-range restricted parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the human metapneumovirus (hMPV) fusion protein elicits protective immunity in African green monkeys.* Vaccine 2005. **23**: p. 1657–1667.
72. Pham, Q.N., et al., *Chimeric recombinant human metapneumoviruses with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian metapneumovirus exhibit improved growth in vitro and attenuation in vivo.* J. Virol, 2005. **79**: p. 15114-15122.
73. Herfst, S., et al., *Generation of temperature-sensitive human metapneumovirus strains that provide protective immunity in hamsters.* J. Gen. Virol., 2008. **89**: p. 1553-1562.
74. Herfst, S., et al, *Immunization of Syrian golden hamsters with F subunit vaccine of human metapneumovirus induces protection against challenge with homologous or heterologous strains.* J. Gen. Virol, 2007. **88**: p. 2702-2709.
75. Cseke, G., et al, *Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats.* J. Virol, 2007. **81**: p. 698-707.
76. SchenderJ., H.V., Flinke S., et al., *Inhibition of toll-like receptor 7 and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus.* J. Virol, 2005. **79**: p. 5507-5515.
77. Reina J, F.F., Alcoceba E, Mena A, de Gopegui ER, Figuerola J., *Comparison of different cell lines and incubation times in the isolation by the shell vial culture of human metapneumovirus from pediatric respiratory samples.* J Clin Virol, 2007. **40**: p. 46-49.
78. Jokela, P., H. Piiparinen, K. Luiro, and M. Lappalainen, *Detection of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by duplex realtime RT-PCR assay in comparison with direct fluorescent assay.* Clin. Microbiol. Infect, 2010. **16**: p. 1568–1573.
79. Pérez-Ruiz, e., *Virus respiratorios: viejos y nuevos virus. Revisión de métodos diagnóstico.* Enferm Infecc Microbiol Clin, 2007. **25**(3): p. 60-65.
80. Fuenzalida, L., et al., *Usefulness of two new methods for diagnosing metapneumovirus infections in children.* Clin Microbiol Infect, 2010. **16**: p. 1663-1668.
81. Reijans, M., et al., *RespiFinder: a new multiparameter test to differentially identify fifteen respiratory viruses.* J. Clin. Microbiol, 2008. **46**: p. 1232-1240.
82. Burton, R.E.W., et al., *A microfluid chip-compatible bioassay based on single-molecule detection with high sensitivity and multiplexing.* Lab Chip, 2010. **10**: p. 843-851.
83. Grisales V, e., *Prevalencia de enfermedades respiratorias agudas en menores de 5 años hospitalizados en las clínicas de una entidad de primer nivel, Manizales años 2004-2006.* Archivos de medicina, 2009. **9**(1): p. 58-68.
84. viruses, R.s.v.a.p. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index3.html. 2009.
85. Oliveira B., e., *El itinerario terapéutico de las familias de los niños con enfermedades respiratorias en el sistema de salud pública.* Latino-Am. Enfermagem 2012. **20**(3): p. 453-461.
86. <http://www.sinais.salud.gob.mx/>.
87. CENAVECE. 2010; Available from: <http://www.cenavece.salud.gob.mx/>
88. Freymuth F, V.A., Lebon P, Legrand L, Bach N, Brouard J, et al., *Le Métapneumovirus humain.* Virologie, 2004. **8**: p. 413-23.
89. Aberle, J.H., S. W. Aberle, M. Redlberger-Fritz, M. J. Sandhofer, and T.Popow-Kraup, *Human metapneumovirus subgroup changes and seasonality during epidemics.* Pediatr. Infect. Dis. J, 2010. **29**: p. 1016–1018.
90. Zlateva K, L.P., Moe's E. , Vandamme A., Van Ranst M., *Genetic Variability and Molecular Evolution of the Human Respiratory Syncytial Virus subgroup B Attachment G Protei.* J Virol, 2005. **79**(14): p. 9157–9167.
91. Noyola D., e., *Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics.* J Med Microbiol, 2005. **54**: p. 969-974.
92. Cabello C., M.M., Olvera R., J Villalba, Valle L, Paramo I, *Frequency of viruses associated with acute respiratory infections in children younger than five years of age at a locally of Mexico City.* Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006. **101**(1): p. 21-24.
93. Ayora G., D.N., *Short report: Human Metapneumovirus in children with influenza like illness in Yucatán, México.* Am. J. Trop. Med. Hyg, 2007. **76**(1): p. 182-183.
94. al, L.G.e., *Identification of influenza, parainfluenza, adenovirus and respiratory syncytial virus during rhinopharyngitis in a group of Mexican children with asthma and wheezing.* Revista Alergia México, 2009. **56**(3): p. 86-91.

95. Wong-Chew RM, F.-Q.R., Sánchez-Huerta JL, Nava-Frías M, Casasola-Flores J, Santos-Preciado JL., *Frecuencia de virus respiratorios y características clínicas de niños que acuden a un hospital en México*. Salud Publica Mex, 2010. **52**(6): p. 528-532.
96. Rodríguez J. P., e., *The epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection in children at a public pediatric referral hospital in Mexico*. International Journal of Infectious Diseases, 2012. **16**: p. e508–e513.
97. <http://reporta.c3.org.mx/>.
98. Chomzaynsky P., S.N., *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanato phenol-chloroform extraction*. Annal Bioch, 1987. **162**: p. 156-159.
99. Caraballo, L.P. and O.V.R. MsC, *IX.-VIRUS PARAINFLUENZA HUMANOS*. Pediatr Infect Dis J, 1997. **16**: p. 34-8.
100. Chaipan, C., et al, *Proteolytic Activation of the 1918 Influenza Virus Hemagglutinin*. J of Virology, 2009. **83**(7): p. 3200-3211
101. Tollefson S. J., e., *Studies of culture conditions and environmental stability of human Metapneumovirus*. Virus Research, 2010. **151**(1): p. 54-59.
102. Schickli JH, K.J., Ulbrandt N, Spaete RR, Tang RS., *An S101P substitution in the putative cleavage motif of the human metapneumovirus fusion protein is a major determinant for trypsin-independent growth in vero cells and does not alter tissue tropism in hamsters*. J Virol, 2005. **79**(16): p. 10678-10689.
103. Inostroza, L.F., *Nuevos métodos diagnósticos para la detección de virus respiratorios emergentes en población pediátrica*, in *Genética y Microbiología 2012*, Universidad Autónoma de Barcelona: Barcelona. p. 153.
104. Plemper R. K., e., *Strength of Envelope Protein Interaction Modulates Cytopathicity of Measles Virus*. J of Virol, 2002. **76**(10): p. 5051–5061.
105. Cathomen T., e., *A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain*. The EMBO Journal, 1998. **17**(14): p. 3899–3908.
106. etal, B.P.G., *Viral and Atypical Bacterial Detection in Acute Respiratory Infection in Children Under Five Years*. PLoS ONE, 2011. **6**(4 e18928): p. 1-9.
107. Martínez P., e., *Co-infección viral respiratoria en niños hospitalizados por infección respiratoria aguda y su impacto en la gravedad clínica*. Rev Chil Infect, 2012. **29**(2): p. 169-174.
108. Reina J., e., *Características clínicas y epidemiológicas de las infecciones respiratorias causadas por el metapneumovirus humano en pacientes pediátricos*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2008. **26**(2): p. 72-76.
109. Wolf DG., e., *Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children*. Pediatr Infect Dis J., 2006(25): p. 320-324.
110. Peiris JSM, e.a., *Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong*. Emerg Infect Dis J, 2003. **9**: p. 628-633.
111. Chan PKS, e.a., *Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome*. Emerg Infect Dis J., 2003. **9**: p. 1058-1063.
112. Boivin G, e.a., *Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups*. J Infect Dis., 2002. **186**(1330-1334).
113. Wolf DG, e.a., *Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children*. Pediatr Infect Dis J., 2006. **25**: p. 320-324.
114. Drews A L, e., *Dual respiratory virus infections*. Clin Infect Dis, 1997. **25**: p. 1421-1429.
115. Semple, M.G., et al., *Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis*. J. Infect. Dis., 2005. **191**: p. 382–386.

Anexo I
 Datos obtenidos de la base de datos del InDRE y la UASLP.

	Institución de Procedencia	ID	Edad (meses)	Sexo	Tipo de muestra	Edo. de procedencia	Fecha de inicio de síntomas	Fecha de toma de muestra	Dx presuntivo	Estado del paciente
1	InDRE	671	1104	M	ENASO	/	24/12/2009	26/12/2009	IRAG	DEFUNCION
2	InDRE	1032	12	F	EFAR	/	01/02/2010	08/02/2010	PVR	HOSPITALIZADO
3	InDRE	1040	516	F	EFAR	DF	21/01/2011	26/01/2011	ETI	En tratamiento
4	InDRE	1062	9	M	SOB	JALISCO	15/01/2011	17/01/2011	ETI	Caso grave / Intubado
5	InDRE	1098	0	M	EFAR	DF	23/01/2011	31/01/2011	IRAG	CASO GRAVE
6	InDRE	1099	5	M	ENASO	/	20/01/2010	25/01/2010	IRAG	CASO GRAVE
7	UASLP	1162	10	M	/	SLP	/	30/08/2004	NEUMONIA	HOSPITALIZADO
8	InDRE	1189	48	M	EFAR	DF	01/02/2011	02/02/2011	INFLUENZA	CASO NO GRAVE
9	UASLP	1202	1	M	/	SLP	/	08/10/2004	NEUMONIA	HOSPITALIZADO
10	InDRE	1207	228	F	EFAR	/	07/02/2010	09/02/2010	IRAG	HOSPITALIZADO
11	UASLP	1222	9	M	/	SLP	/	21/10/2004	NEUMONIA	HOSPITALIZADO
12	InDRE	1255	8	M	EFAR	DF	31/01/2011	08/02/2011	IRAG	CASO GRAVE
13	InDRE	1282	5	M	SOB	DF	07/02/2011	09/02/2011	IRAG	CASO NO GRAVE
14	InDRE	1293	324	M	SOB	NUEVO LEÓN	26/01/2011	28/01/2011	ETI	CASO GRAVE
15	InDRE	1298	804	F	SOB	NUEVO LEÓN	02/02/2011	03/02/2011	ETI	Caso grave / Intubado
16	InDRE	1325	2	M	EFAR	/	03/01/2010	07/01/2010	ETI	HOSPITALIZADO
17	InDRE	1326	5	M	ENASO	/	04/01/2010	08/01/2010	ETI	HOSPITALIZADO
18	InDRE	1333	3	M	EFAR	/	13/01/2010	18/01/2010	IRAG	HOSPITALIZADO
19	InDRE	1335	24	F	SOB	TABASCO	25/01/2011	27/01/2011	ETI	CASO GRAVE
20	InDRE	1335	36	M	EFAR	/	17/01/2010	18/01/2010	IRAG	HOSPITALIZADO
21	UASLP	1344	5	M	/	SLP	/	11/12/2004	NEUMONIA	HOSPITALIZADO
22	UASLP	1348	5	M	/	SLP	/	14/12/2004	NEUMONIA	HOSPITALIZADO

ANEXOS

23	InDRE	1375	24	M	EFAR	MICHACÁN	02/02/2011	04/02/2011	DX PANEL	/
24	InDRE	1377	2	M	EFAR	MICHACÁN	02/02/2011	08/02/2011	DX PANEL	/
25	InDRE	1378	5	M	EFAR	MICHACÁN	08/02/2011	11/02/2011	DX PANEL	/
26	InDRE	1418	696	M	SOB	NUEVO LEÓN	04/02/2011	06/02/2011	ETI	CASO GRAVE
27	InDRE	1426	888	M	EFAR	QUERETARO	07/02/2011	10/02/2011	ETI	CASO GRAVE
28	InDRE	1432	10	F	EFAR	/	01/02/2010	02/02/2010	ETI	HOSPITALIZADO
29	InDRE	1440	8	M	SOB	JALISCO	07/02/2011	07/02/2011	IRAG	CASO GRAVE
30	InDRE	1452	11	F	SOB	JALISCO	12/02/2011	15/02/2011	ETI	CASO GRAVE
31	InDRE	1537	264	M	EFAR	EDO. MEX	22/02/2011	23/02/2011	Influenza	CASO NO GRAVE
32	InDRE	1586	0	M	SOB	GUERRERO	21/02/2011	24/02/2011	DX PANEL	BROTE
33	InDRE	1589	1	F	EFAR	/	20/02/2010	22/02/2010	ETI	HOSPITALIZADO
34	InDRE	1661	10	F	EFAR	/	07/02/2010	10/02/2010	ETI	HOSPITALIZADO
35	InDRE	1690	17	M	EFAR	GUERRERO	21/02/2011	03/03/2011	DX PANEL	BROTE
36	InDRE	1693	3	M	EFAR	GUERRERO	25/02/2011	04/03/2011	DX PANEL	BROTE
37	InDRE	1773	24	F	SOB	GUERRERO	22/02/2011	24/02/2011	DX PANEL	BROTE
38	InDRE	1874	2	F	SOB	GUERRERO	01/03/2011	10/03/2011	DX PANEL	BROTE
39	InDRE	1883	288	F	EFAR	DF	17/03/2011	22/03/2011	Influenza	CASO NO GRAVE
40	InDRE	1894	12	F	SOB	GUERRERO	15/02/2011	15/03/2011	IRAG	CASO GRAVE
41	InDRE	1905	132	F	ENASO	/	16/02/2010	19/02/2010	ETI	CASO NO GRAVE
42	InDRE	1917	984	F	SOB	QUERETARO	10/03/2011	13/03/2011	Influenza	CASO GRAVE
43	InDRE	1918	744	F	SOB	QUERETARO	05/03/2011	11/03/2011	Influenza	CASO GRAVE
44	InDRE	1930	24	M	SOB	GUERRERO	13/03/2011	14/03/2011	DX PANEL	BROTE
45	InDRE	2017	24	M	SOB	GUERRERO	16/03/2011	17/03/2011	ETI	CASO NO GRAVE
46	InDRE	2023	36	M	SOB	GUERRERO	21/03/2011	24/03/2011	IRAG	CASO NO GRAVE
47	InDRE	2129	720	F	SOB	GUERRERO	20/03/2011	24/03/2011	ETI	CASO NO GRAVE
48	InDRE	2168	3	M	SOB	CHIHUAHUA	28/03/2011	31/03/2011	IRAG	BROTE
49	InDRE	2187	12	F	EFAR	/	23/02/2010	26/02/2010	ETI	HOSPITALIZADO

ANEXOS

50	InDRE	2191	192	F	SOB	CHIHUAHUA	28/03/2011	01/04/2011	ETI	BROTE
51	InDRE	2225	12	M	SOB	GUERRERO	29/03/2011	31/03/2011	DX PANEL	/
52	InDRE	2242	12	M	EFAR	DF	03/04/2011	04/04/2011	ETI	CASO GRAVE
53	InDRE	2270	12	M	ENASO	DF	05/04/2011	07/04/2011	IRAG	CASO NO GRAVE
54	InDRE	2340	12	M	SOB	CHIHUAHUA	31/03/2011	01/04/2011	Influenza	HOSPITALIZADO
55	InDRE	2348	8	M	SOB	CHIHUAHUA	30/03/2011	02/04/2011	IRAG	CASO NO GRAVE
56	InDRE	2371	12	M	SOB	CHIHUAHUA	31/03/2011	04/04/2011	INFLUENZA	HOSPITALIZADO
57	InDRE	2431	12	M	EFAR	/	07/03/2010	14/03/2010	ETI	CASO GRAVE
58	InDRE	2436	48	F	EFAR	DF	12/04/2011	12/04/2011	Influenza	CASO NO GRAVE
59	InDRE	2453	288	F	SOB	DF	05/04/2011	07/04/2011	ETI	CASO GRAVE
60	InDRE	2508	48	F	SOB	CHIHUAHUA	09/04/2011	11/04/2011	Influenza	En tratamiento
61	InDRE	2522	996	M	SOB	CHIHUAHUA	09/04/2011	13/04/2011	ETI	DEFUNCIÓN
62	InDRE	2523	11	M	SOB	CHIHUAHUA	10/04/2011	13/04/2011	Influenza	HOSPITALIZADO
63	InDRE	2524	36	F	SOB	CHIHUAHUA	09/04/2011	14/04/2011	Influenza	HOSPITALIZADO
64	InDRE	2652	1	M	EFAR	/	23/03/2010	26/03/2010	IRAG	CASO NO GRAVE
65	InDRE	2719	8	M	SOB	CHIHUAHUA	15/04/2011	18/04/2011	Influenza	A H1 PDM CHIHUAHUA
66	UASLP	3101	/	M	/	SLP	/	12/11/2006	BRONQUIOLITIS	/
67	UASLP	3102	/	M	/	SLP	/	11/11/2006	BRONQUIOLITIS	/
68	UASLP	3112	/	M	/	SLP	/	13/11/2006	BRONQUIOLITIS	/
69	UASLP	3114	/	F	/	SLP	/	14/11/2006	BRONQUIOLITIS	/
70	UASLP	3115	/	F	/	SLP	/	14/11/2006	BRONQUIOLITIS	/
71	UASLP	3152	/	M	/	SLP	/	21/11/2006	BRONQUIOLITIS	/
72	UASLP	3491	/	/	/	SLP	/	/	/	/
73	UASLP	3496	/	/	/	SLP	/	/	/	/
74	UASLP	3497	/	/	/	SLP	/	/	/	/
75	UASLP	3503	/	/	/	SLP	/	/	/	/
76	UASLP	3510	/	/	/	SLP	/	/	/	/
77	UASLP	3511	/	/	/	SLP	/	/	/	/

ANEXOS

78	UASLP	3611	/	/	/	SLP	/	/	/	/
79	UASLP	3612	/	/	/	SLP	/	/	/	/
80	UASLP	3614	/	/	/	SLP	/	/	/	/
81	UASLP	3618	/	/	/	SLP	/	/	/	/
82	UASLP	3619	/	/	/	SLP	/	/	/	/
83	UASLP	3629	/	/	/	SLP	/	/	/	/
84	UASLP	3637	/	/	/	SLP	/	/	/	/
85	UASLP	3651	/	/	/	SLP	/	/	/	/
86	UASLP	3652	/	/	/	SLP	/	/	/	/
87	UASLP	3670	/	/	/	SLP	/	/	/	/
88	UASLP	3671	/	/	/	SLP	/	/	/	/
89	UASLP	3674	/	/	/	SLP	/	/	/	/
90	UASLP	3679	/	/	/	SLP	/	/	/	/
91	UASLP	3696	/	/	/	SLP	/	/	/	/
123	UASLP	3699	/	/	/	SLP	/	/	/	/
92	UASLP	3705	/	/	/	SLP	/	/	/	/
93	UASLP	3721	/	/	/	SLP	/	/	/	/
94	UASLP	3734	/	/	/	SLP	/	/	/	/
95	UASLP	3749	/	/	/	SLP	/	/	/	/
96	UASLP	3763	/	/	/	SLP	/	/	/	/
97	InDRE	3973	12	F	EFAR	/	29/09/2008	30/09/2008	INFLUENZA	/
98	InDRE	4102	60	F	EFAR	/	10/07/2008	10/08/2008	INFLUENZA	/
99	InDRE	4112	96	M	EFAR	/	10/06/2008	10/09/2008	INFLUENZA	/
100	InDRE	4130	11	M	EFAR	/	10/10/2008	13/10/2008	INFLUENZA	/
101	InDRE	4208	36	F	EFAR	/	10/10/2008	13/10/2008	INFLUENZA	/
102	InDRE	4310	36	F	EFAR	/	14/10/2008	16/10/2008	INFLUENZA	/
103	InDRE	4355	288	F	EFAR	/	19/10/2008	20/10/2008	INFLUENZA	/
104	InDRE	4406	24	M	EFAR	/	20/10/2008	22/10/2008	INFLUENZA	/

ANEXOS

105	InDRE	4468	24	M	EFAR	/	18/10/2008	20/10/2008	INFLUENZA	/
106	InDRE	4510	36	M	EFAR	/	22/10/2008	24/10/2008	INFLUENZA	/
107	InDRE	4514	24	F	EFAR	/	26/10/2008	28/10/2008	INFLUENZA	/
108	InDRE	4520	36	F	EFAR	/	18/10/2008	22/10/2008	INFLUENZA	/
109	InDRE	4593	1	F	EFAR	/	26/10/2008	29/10/2008	INFLUENZA	/
110	UASLP	4969	/	/	/	SLP	/	/	/	/
111	UASLP	5084	/	/	/	SLP	/	/	/	/
112	UASLP	5153	/	/	/	SLP	/	/	/	/
113	UASLP	5162	/	/	/	SLP	/	/	/	/
114	UASLP	5243	/	/	/	SLP	/	/	/	/
115	UASLP	5281	/	/	/	SLP	/	/	/	/
116	UASLP	5524	/	/	/	SLP	/	/	/	/
117	UASLP	5614	/	/	/	SLP	/	/	/	/
118	UASLP	5615	/	/	/	SLP	/	/	/	/
119	UASLP	5622	/	/	/	SLP	/	/	/	/
120	UASLP	5630	/	/	/	SLP	/	/	/	/
121	UASLP	5637	/	/	/	SLP	/	/	/	/
122	UASLP	5643	/	/	/	SLP	/	/	/	/
124	UASLP	5651	/	/	/	SLP	/	/	/	/

/. Dato no proporcionado.

Anexo II.**Resultados del tratamiento con TPCK, presencia o ausencia de fusogenicidad y resultado de IFD.**

	ID	Tratamiento TPCK	FUSOGENICIDAD	Resultado en IFD	
				hRSV	hMPV
1	671	Sí	Ausente	+	-
2	1032	Sí	Ausente	-	-
3	1040	---	Espontánea	+	+
4	1062	---	Espontánea	-	+
5	1098	---	Espontánea	+	-
6	1099	Sí	Ausente	+	-
7	1162	Sí	Inducida	+	-
8	1189	Sí	Inducida	+	-
9	1202	Sí	Ausente	+	-
10	1207	Sí	Ausente	-	-
11	1222	Sí	Ausente	+	+
12	1255	Sí	Ausente	-	-
13	1282	Sí	Inducida	+	+
14	1293	---	Espontánea	+	-
15	1298	Sí	Ausente	-	-
16	1325	Sí	Ausente	+	-
17	1326	Sí	Ausente	+	-
18	1333	Sí	Ausente	+	-
19	1335	sí	Ausente	+	-
20	1335	Sí	Ausente	+	-
21	1344	Sí	Inducida	+	-
22	1348	Sí	Ausente	+	-
23	1375	Sí	Ausente	+	-
24	1377	Sí	Ausente	+	-
25	1378	---	Espontánea	+	+
26	1418	Sí	Ausente	+	-
27	1426	---	Espontánea	+	-
28	1432	Sí	Ausente	+	-
29	1440	Sí	Ausente	+	-
30	1452	Sí	Ausente	+	-
31	1537	---	Espontánea	-	-
32	1586	Sí	Ausente	-	-
33	1589	Sí	Ausente	+	-
34	1661	Sí	Ausente	+	-
35	1690	---	Espontánea	+	+

ANEXOS

36	1693	Sí	Ausente	+	+
37	1773	Sí	Ausente	-	+
38	1874	Sí	Ausente	+	-
39	1883	Sí	Ausente	-	+
40	1894	Sí	Ausente	+	+
41	1905	Sí	Ausente	+	-
42	1917	Sí	Ausente	+	+
43	1918	Sí	Ausente	+	+
44	1930	Sí	Ausente	+	+
45	2017	Sí	Ausente	+	+
46	2023	Sí	Ausente	+	+
47	2129	Sí	Ausente	+	+
48	2168	Sí	Ausente	+	+
49	2187	Sí	Ausente	+	-
50	2191	Sí	Ausente	+	+
51	2225	Sí	Ausente	+	+
52	2242	Sí	Ausente	+	-
53	2270	Sí	Ausente	+	+
54	2340	Sí	Ausente	+	+
55	2348	Sí	Ausente	+	-
56	2371	Sí	Ausente	-	-
57	2431	Sí	Ausente	+	-
58	2436	Sí	Inducida	-	+
59	2453	Sí	Ausente	-	+
60	2508	Sí	Ausente	-	-
61	2522	Sí	Ausente	-	-
62	2523	Sí	Inducida	-	+
63	2524	Sí	Ausente	-	+
64	2652	Sí	Ausente	-	-
65	2719	Sí	Ausente	-	+
66	3101	Sí	Ausente	-	-
67	3102	Sí	Ausente	+	-
68	3112	Sí	Ausente	+	-
69	3114	Sí	Ausente	+	-
70	3115	Sí	Ausente	+	-
71	3152	Sí	Ausente	+	-
72	3491	---	Espontánea	+	-
73	3496	Sí	Inducida	+	-
74	3497	Sí	Inducida	+	-
75	3503	---	Espontánea	+	-
76	3510	Sí	Inducida	-	+

ANEXOS

77	3511	---	Espontánea	+	-
78	3611	---	Espontánea	-	-
79	3612	Sí	Ausente	+	-
80	3614	Sí	Ausente	-	-
81	3618	---	Espontánea	+	-
82	3619	Sí	Inducida	+	-
83	3629	---	Espontánea	+	-
84	3637	Sí	Ausente	+	-
85	3651	Sí	Inducida	+	+
86	3652	Sí	Inducida	+	+
87	3670	---	Espontánea	-	+
88	3671	---	Espontánea	+	-
89	3674	---	Espontánea	+	+
90	3679	---	Espontánea	-	+
91	3696	---	Espontánea	+	-
123	3699	Sí	Inducida	+	+
92	3705	---	Espontánea	+	-
93	3721	---	Espontánea	+	+
94	3734	Sí	Ausente	-	-
95	3749	---	Espontánea	+	-
96	3763	---	Espontánea	-	+
97	3973	Sí	Inducida	-	+
98	4102	Sí	Inducida	-	+
99	4112	Sí	Ausente	-	-
100	4130	Sí	Inducida	+	-
101	4208	Sí	Inducida	-	+
102	4310	Sí	Ausente	-	-
103	4355	Sí	Ausente	+	-
104	4406	Sí	Ausente	-	-
105	4468	Sí	Ausente	-	-
106	4510	Sí	Ausente	+	-
107	4514	Sí	Ausente	+	-
108	4520	Sí	Ausente	-	-
109	4593	Sí	Ausente	+	-
110	4969	Sí	Ausente	-	-
111	5084	Sí	Inducida	-	+
112	5153	Sí	Ausente	-	-
113	5162	Sí	Ausente	-	-
114	5243	Sí	Ausente	-	+
115	5281	Sí	Inducida	+	-
116	5524	Sí	Ausente	-	+

ANEXOS

117	5614	Sí	Ausente	+	-
118	5615	Sí	Ausente	-	-
119	5622	Sí	Inducida	+	-
120	5630	Sí	Ausente	+	+
121	5637	Sí	Ausente	+	-
122	5643	Sí	Ausente	+	-
124	5651	Sí	Ausente	+	-

---. No se aplicó, debido a que la muestra presentó fusogenicidad espontánea.

Anexo III

Resultados de los ensayos de RT-PCR para la confirmación de la infección por hMPV.

	L Número de bandas		N Número de bandas		β -ACT
	447 pb	Adicionales	599 pb	Adicionales	205 pb
1040	1	1	1	1	1
1062	---	1	---	1	1
1222	1	3	---	2	1
1282	1	2	---	1	1
1378	1	---	---	1	1
1690	---	---	---	1	1
1693	1	---	---	1	1
1773	1	1	1	1	1
1883	1	---	---	1	1
1894	---	---	---	1	1
1917	1	1	---	1	1
1918	---	---	---	1	1
1930	---	---	1	---	1
2017	---	---	---	---	1
2023	---	---	---	---	1
2129	1	---	---	---	1
2168	1	1	---	---	1
2191	---	---	---	1	1
2225	---	1	---	---	1
2270	---	1	---	---	1
2340	1	1	1	1	1
2436	1	1	1	1	1
2453	1	1	---	1	1
2523	1	---	---	1	1
2524	1	3	---	1	1
2719	1	1	---	---	1
3510	1	1	1	1	1
3651	1	1	---	---	1
3652	1	---	1	---	1
3670	1	---	---	1	1
3674	1	1	---	2	1
3679	1	1	---	1	1
3699	1	1	---	2	1

ANEXOS

3721	1	1	1	---	1
3763	---	1	---	1	1
3973	1	1	---	2	1
4102	1	---	1	1	1
4208	1	---	1	---	1
5084	1	1	---	1	1
5243	---	1	---	1	1
5524	1	2	1	1	1
5630	1	---	1	---	1

---. Sin banda

Anexo IV

*Cálculo de tamaño de muestra

De acuerdo a estudios recientes, en nuestro país se ha reportado que existe una prevalencia de etiología viral de IRA del 32.44% para hRSV y un 8.4% para hMPV.

En reportes del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) se puede observar que en el 2010 se obtuvieron 26,712,790 casos de IRA en menores de 5 años. En ese mismo año se contaron 10,528,322 niños con rango de edad similar, de acuerdo a datos obtenidos mediante el censo del instituto nacional de estadística y geografía (INEGI), esto quiere decir que cada niño en promedio tuvo 2,53 episodios de IRA en el periodo de invierno-primavera en ese año. Si realizamos una correlación con los datos de IRA por etiología viral reportados por diversos grupos de investigación en México, se puede observar que 8,665,629 casos fueron debidos a hRSV y 2,243,874 por hMPV en ese periodo de invierno-primavera.

Con estos datos, podemos sacar un tamaño de muestra representativo para nuestro estudio con la fórmula para el cálculo de muestreo en una población infinita::

Para hRSV, con una frecuencia del 25%, un error del 5% y un $\alpha=0.05$

$$n_0 = \frac{z_{\alpha}^2 p(1-p)}{d^2} = \frac{1.96^2(0.3244)(1-0.3244)}{0.05^2} = \frac{0.8425}{0.0025} \approx 337$$

Para hMPV, con una frecuencia del 10%, un error del 5% y un $\alpha=0.05$

$$n_0 = \frac{z_{\alpha}^2 p(1-p)}{d^2} = \frac{1.96^2(0.084)(1-0.084)}{0.05^2} = \frac{0.295}{0.0025} \approx 118$$

Por lo tanto para tener un tamaño de muestra representativo para ambos virus, se deberá trabajar con una cohorte de pacientes de aproximadamente 337 pacientes.