



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DEL TEMA ESCRITO

EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR MÚLTIPLE ANYPLEX PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS RESPIRATORIOS EN MUESTRAS CLÍNICAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA (N)

Alejandra Pamela González Rodríguez



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Laura Carmona Salazar

VOCAL: Profesor: Rocío Gabriela Tirado Mendoza

SECRETARIO: Profesor: Rosa María Wong Chew

1er. SUPLENTE: Profesor: Ana Margarita Zavala Ortiz

2° SUPLENTE: Profesor: Silvia Karina Godínez Palma

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE INFECTOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA CLÍNICAS, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA EXPERIMENTAL, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Rosa María Wong Chew

SUPERVISOR TÉCNICO:

Miguel Leonardo García León

SUSTENTANTE (S):

Alejandra Pamela González Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

A las empresas *Química Valaner* y *Seegene* por los reactivos donados para la realización de este trabajo y por las muestras secuenciadas, así como por el apoyo económico brindado para presentar los resultados del mismo en el Congreso Internacional IDWeek 2014 en la ciudad de Philadelphia, PA.

Al Dr. Miguel Leonardo García León por su invaluable apoyo y asesoramiento técnico, sin el cual este trabajo no hubiera cumplido sus objetivos.

A mi Jurado Revisor por la asesoría, el tiempo, la paciencia, opiniones y conocimientos aportados.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Rosa María Wong, por haberme hecho parte de su grupo de trabajo y por darme la oportunidad para desarrollar mis habilidades tanto técnicas como críticas.

A mis amigos (La Familia): Alma, Abraham, Alberto (Beto), Brianda, Eduardo (Edu, Edu), Elisa, Erick (tío hermoso), Felipe, Irene (Irenation :D!!), Jair, Jhonatan (Jhony, la gente está muy Loca), Manuel (Manu), Móni, Paulina (La Pau) y Sergio por ser los más geniales amigos que puede haber (con todo y sus problemas de personalidad, jajaja no se crean). Gracias por ser parte de mi vida, por existir, por caminar juntos durante toda la carrera, por su apoyo, por sus ocurrencias, por las risas y por los momentos en los que me sentí infinita, soy afortunada de tenerlos. Sin ustedes no lo habría logrado.

A Alma, por ser una increíble persona y haberme brindado su amistad incondicional. Eres y siempre serás mi amiga, hasta que seamos unas viejitas (muy coquetas y con buen gusto en vinos y grandes conocedoras de lugares fancy). Te quiero muchísimo Al, y no me alcanzan las palabras para expresar lo que significas en mi vida, soy tan pero tan afortunada. Sé que aún nos queda mucho por vivir (¡¡nos falta encontrar al bueno, bonito y barato!!!) y sé que seguiremos juntas compartiendo nuestras experiencias. Gracias por no dejarme caer y darme ánimos para seguir adelante.

A Sergio, por ser...mmmm...¿humano? Fin del agradecimiento.

Jajajaja Ok no. Ay Serch, qué te puedo decir, creo que ni un capítulo entero sería suficiente para agradecerte por todo lo que has hecho por mí. Algo debí haber hecho muy bien en vidas pasadas para encontrar a una persona como tú (o algo muy malo ¬_¬). Eres increfrabullosgenialofantástico. Te quiero tanto, tanto, tanto (*tono canción de OV7*). Agradezco a los Dioses, incluyendo a la Diosa Millipore y San Matracio, por haberte puesto en mi camino. Sin ti, no sería lo mismo. Gracias por soportar mis locuras y berrinches, apoyarme y levantarme cuando creo no poder más. Gracias por las risas y los increíbles momentos librosos que hemos tenido. Gracias por ser tú.

A Jhonatan por ser un gran amigo y compañero de grandes momentos vagabundezcos y sumamente divertidos.

A Irene por compartir conmigo su travesía por la Ciudad de la Luz y hacerme soñar con paisajes dorados y felicidad infinita.

Al Dr. Miguel Leonardo García León por sus enseñanzas que no solo han sido académicas, sino también a nivel personal. Gracias por enseñarme a ser una mejor estudiante, científica y persona. Gracias por el apoyo, la confianza y la

amistad que me ha brindado y por todo el conocimiento que me ha transmitido. Gracias por sus enseñanzas en el laboratorio, por el tiempo y la paciencia. No cabe duda, es un excelente Maestro.

A la Señora Georgina Torres (Gina) por haberme brindado su amistad, sus consejos y su apoyo. Gracias por las horas de café-desayuno , que sin duda eran mis momentos favoritos del día. Gracias por compartir conmigo sus experiencias y conocimiento. Gracias por ayudarme/enseñarme a ser una mejor persona. Me alegra infinitamente haberla conocido.

A la Dra. Andrea Aida Velasco Medina por ser una increíble persona, amiga, compañera de campana y alergóloga personal.

A mis amigos del laboratorio Poncho y Paquito (espero te encuentre feliz y bien donde sea que estés) por todos esos momentos musicales que compartimos, por su ayuda y por las risas.

A la IBT Nataly Luna por darme la capacitación para utilizar al equipo CFX96, por su profesionalismo y excelente atención.

Al QFB Israel Rivera Martínez porque además de ser una excelente persona, es todo un profesional. Gracias por su paciencia y atención.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química, por haberme dado la oportunidad de vivir maravillosas experiencias dentro de sus aulas y por permitirme ser alguien en la vida.

DEDICATORIAS

A mi mamá y papá, porque me han dado amor toda mi vida y han hecho de mí lo que ahora soy. Los amo profundamente, son mi fuerza vital, lo mejor de mi existencia.

A mi prima/hermana, Adriana, que ha crecido junto a mí, en las buenas, en las malas y hasta la luna y más allá.

A mis tías, tíos y primos, porque siempre me han dado su apoyo y amor.

“Juro solemnemente que mis intenciones no son buenas”

CONTENIDO

	PAG.
RESUMEN	I
ABSTRACT	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
LISTADO DE ABREVIATURAS	VII
1.INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Infecciones Respiratorias Agudas	3
2.1.1. Infecciones Respiratorias Agudas Altas	3
2.1.1.1. Rinofaringitis	3
2.1.1.2. Faringoamigdalitis	4
2.1.1.3. Rinosinusitis	5
2.1.1.4. Otitis media aguda	5
2.1.2. Infecciones Respiratorias Agudas Bajas	6
2.1.2.1. Laringotraqueitis aguda	6
2.1.2.2. Bronquiolitis	7
2.1.2.3. Neumonía	8
2.2. Asma	9
2.3. Epidemiología	10
2.4. Virus respiratorios	12
2.4.1. Paramixovirus	12
2.4.1.1. Virus sincicial respiratorio	13
2.4.1.2. Metapneumovirus	14
2.4.1.3. Parainfluenza	15
2.4.2. Picornavirus	16
2.4.2.1. Rinovirus	16
2.4.2.2. Enterovirus	17
2.4.3. Influenza	18
2.4.4. Adenovirus	21
2.4.5. Coronavirus	23
2.4.6. Bocavirus	25
2.5. Métodos de diagnóstico y detección de virus respiratorios	27
2.5.1. Métodos no moleculares	27
2.5.1.1. Aislamiento Viral	27
2.5.1.2. Detección de antígenos víricos	28
2.5.1.3. Detección de la respuesta humoral específica	30

2.5.2. Métodos moleculares	30
2.5.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa	31
2.5.4.2. PCR cuantitativa	33
2.5.2.3. PCR múltiple	34
2.5.2.3.1 Luminex xTAG	35
2.5.2.4. PCR en tiempo real	37
2.5.2.4.1. Anyplex II RV16	38
3. HIPÓTESIS	42
4. OBJETIVOS	43
3.1. Objetivo general	43
3.2. Objetivo particular	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS	44
5.1. Muestras clínicas	44
5.2. Extracción de ácidos nucleicos	44
5.2.1. Extracción de ácidos nucleicos de forma automatizada por el equipo QIAcube™ (QIAGEN®)	45
5.2.2. Extracción de ácidos nucleicos de forma manual con el kit de GeneAII® Ribo_spin vRD™	45
5.3. xTAG™ RVP	46
5.3.1. RT-PCR múltiple	46
5.3.2. Tratamiento de los productos de PCR	47
5.3.3. TSPE múltiple	48
5.3.4. Hibridación de esferas	49
5.3.5. Análisis de resultados	49
5.4. Anyplex™RV16	50
5.4.1. RT-PCR de las muestras clínicas con el estuche cDNA Synthesis Premix	50
5.4.2. Preparación del PCR en tiempo real utilizando el estuche Anyplex™II Rv16 Detection V1.01	51
5.4.3. Análisis de resultados	53
5.5. Cálculo de los indicadores básicos para evaluación de prueba diagnóstica	53
6. RESULTADOS	56
6.1. Frecuencia de virus respiratorios	56
6.1.1. Resultado de virus respiratorios mediante el Estándar de oro	56

6.1.2. Resultado de virus respiratorios mediante Anyplex RV16	57
6.1.3. Resultado de virus respiratorio mediante xTAG RVP	59
6.1.4. Resultado de virus respiratorios por hospital	61
6.2. Comparación de métodos	62
6.2.1. Descripción de resultados de virus respiratorios por método	62
6.2.2. Correlación de resultados	63
6.2.3. Sensibilidad y especificidad	65
7. DISCUSIÓN	67
8. CONCLUSIONES	71
9. REFERENCIAS	72
GLOSARIO	76

RESUMEN

Introducción: Las infecciones respiratorias agudas son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Los métodos diagnósticos han ido evolucionando, y cada vez contamos con más técnicas para detectar múltiples virus en una sola muestra. Anyplex RV16 fue recientemente introducido en el país.

Objetivo(s): Realizar una evaluación de prueba diagnóstica entre dos métodos de PCR multiplex para detección de virus respiratorios. Identificar la presencia de virus respiratorios (VSR A y B, INFA y B, PIV1, 2, 3 y 4, AdV, MpV, CoVOC43, 229E y NL63, RV A/B/C, EV HBoV1/2/3/4) en muestras de lavados nasales de niños menores de 5 años de edad con neumonía en varios centros hospitalarios de México.

Material y Métodos: Se tomaron 310 muestras de lavados nasofaríngeos de niños menores de 5 años de edad con diagnóstico clínico y/o radiológico de neumonía que cumplieron con la definición de caso, en un período de 24 meses atendidos en varios centros hospitalarios del país. Los ácidos nucleicos extraídos, fueron amplificados por dos ensayos comerciales de detección viral múltiple en tiempo real: xTAG RVP (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Canadá) y Anyplex II RV16 (Seegene, Seúl, Corea). Una vez que se obtuvieron los resultados con cada una de las técnicas empleadas, se realizaron tablas de contingencia de dos categorías para calcular los datos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

Resultados: RV16 presentó una mayor sensibilidad (90.0%) y especificidad (97.4%) con respecto a xTAG (cuyos valores fueron del 78.9% y 59.4% para cada parámetro). RV16 fue más sensible que xTAG para AdV (100% (23/23) contra 52.2.% (12/23)], INF A [83.3% (15/18) contra 53.3% (8/15)], RSV A [97.8% (134/137) contra 69.6% (94/135)] y CoV OC43/HUKI [(100% (4/4) contra 50.0% (2/4)] pero menos sensible para los PIV [80.0% (20/25) contra 95.0% (19/20)], RSV B [71.4% (5/7) contra 80.0% (4/5)], RV/EV [83.1% (59/71) contra 86.9% (53/61) y MpV [83.3% (10/12) contra 90.0% (9/10)].

Los 5 virus respiratorios más comúnmente detectados en 310 muestras fueron: VSR A (43.1%), RV/EV (22.3%), PIV (7.8%), AdV (7.2%) e INF A (6.5%).
Conclusiones: El método de PCR multiplex en tiempo real Anyplex II RV16, tiene una sensibilidad y especificidad superior a la de xTAG RVP, en el diagnóstico de virus respiratorios.

ABSTRACT

Background: Respiratory tract infections are the main cause of morbidity and mortality worldwide. Diagnostic methods have evolved through time and now there are techniques available to detect multiple viruses in one sample. The aims of the study were to identify respiratory viruses in nasal washings from children younger than 5 years old admitted with pneumonia at 6 hospitals from 6 cities in Mexico and to perform a diagnostic test evaluation between 2 multiplex PCR techniques for the detection of respiratory viruses.

Methods: 310 nasal washings from children younger than 5 years old with clinical and/or radiological diagnosis of pneumonia were included. Nucleic acid was extracted, and amplified by two methods: xTAG RVP (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Canada) and Anyplex II RV16 (Seegene, Seoul, Korea).

The respiratory viruses detected were: RSV A and B, INF A and B, PIV1, 2, 3 and 4, AdV, MpV, CoV OC43, 229E and NL63, RV A/B/C, EV and HBoV1/2/3/4. The gold standard was a construct (the same result with both techniques, and those with discrepancies were sequenced). Virus frequencies, sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were calculated.

Results: The viruses detected were in order of frequency: 44.2% RSV A, 22.9% RV/EV, 7.4% ADV, 5.8% INF A, 3.9% MpV, 2.9% HBoV, 2.6% PIV 3, 2.3% RSV B, 2.3% PIV 4, 2.3% CoV NL63, 1.9% PIV 1, 1.3% PIV 2, 0.9% INF B, 0.9% CoV OC43, 0.6% CoV 229E and 0.3% CoV HKUI. Overall Anyplex II RV16 had a higher sensitivity (90% vs. 78.9%) and specificity (97.4% vs. 59.4%) compared to xTAG RVP. Anyplex II RV 16 was more sensitive in detecting AdV (100% vs. 52.2%), INF A (83.3% vs. 53.3%), RSV A (97.8% vs. 69.9%) and CoV OC45/HUK1 (100% vs. 50%) compared to xTAG RVP, respectively. xTAG RVP was more sensitive in detecting PIV (95% vs. 80%) , RSV B (80% vs. 71.4%), RV/EV (86.9% vs. 83.1%) and MpV (90% vs. 83.3%) compared to Anyplex II RV 16, respectively.

Conclusion: The 3 most frequent pathogens detected in children with pneumonia were RSV, RV and PIV (1/2/3/4). Overall, Anyplex II RV16 had a higher sensitivity

and specificity than xTAG RVP for the diagnosis of multiple respiratory viruses. Although, xTAG RVP is more sensitive to detect PIV, RSV B, RV and MpV.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Distribución estacional de los casos de laringotraqueitis aguda y patrones epidemiológicos de los virus respiratorios.	7
Figura 2: Casos nuevos y tasa de incidencia por año. Estados Unidos Mexicanos 2000-2012.	10
Figura 3: Comparativo de incidencia de IRA, por semanas epidemiológicas, México 2013-2014.	11
Figura 4: Diagrama de VSR y MpV.	13
Figura 5: Estructura de los picornavirus	16
Figura 6: Diagrama esquemático de un virión de influenza.	20
Figura 7: Diagrama del virión de un AdV.	22
Figura 8: Virón de CoV.	24
Figura 9: Cápside de HBoV.	26
Figura 10: Diagrama esquemático del ensayo xTAG™RVP	36
Figura 11: Diagrama esquemático de la tecnología TOCE.	40
Figura 12: Visualización de resultados mediante el software TDAS RVP-I.	50
Figura 13: Visualización de resultados mediante el software Seegene Viewer.	53
Figura 14: Distribución de virus respiratorios en muestras.	56
Figura 15: Distribución de virus respiratorios detectados en las muestras por RV16.	58
Figura 16: Distribución de virus respiratorios detectados en las muestras por xTAG RVP.	60
Figura 17 Representación gráfica de la proporción de los valores de VP, VN, FP y FN al comparar los métodos de detección de virus respiratorios con el estándar de oro establecido.	64

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Estuches comerciales de detección de antígenos para virus respiratorios.	29
Tabla 2: Sensibilidad y especificidad de métodos no moleculares de detección de virus respiratorios.	29
Tabla 3: Estuches comerciales para la detección de virus respiratorios mediante amplificación genómica	33
Tabla 4: Reactivos suministrado por el estuche de Luminex xTAG.	46
Tabla 5: Condiciones de RT-PCR por el ensayo xTAG™ RVP.	46
Tabla 6: Tratamiento enzimático de los productos de RT-PCR.	47
Tabla 7: Mezcla maestra de reacción para la TSPE múltiple.	48
Tabla 8: Condiciones de RT-PCR por el método de Seegene Anyplex II.	50
Tabla 9: Condiciones de amplificación de PCR en tiempo real por Anyplex II RV16 Detection	51
Tabla 10: Rangos de temperatura de disociación de blancos.	52
Tabla 11: Distribución de virus respiratorios en muestras.	57
Tabla 12: Distribución de virus respiratorios en muestras pediátricas nasofaríngeas por RV16.	59
Tabla 13: Distribución de virus respiratorios en muestras pediátricas nasofaríngeas por xTAG RVP.	61
Tabla 14: Distribución de virus respiratorios en muestras pediátricas nasofaríngeas por hospital de procedencia, de acuerdo con el resultado del estándar de oro.	62
Tabla 15: Comparativo de virus respiratorios detectados por cada método en muestras pediátricas nasofaríngeas.	63
Tabla 16: Tabla de contingencia 2X2 de la técnica de PCR multiplex para la detección de virus respiratorios Anyplex RV16.	64
Tabla 17: Tabla de contingencia 2X de la técnica de PCR multiplex para la detección de virus respiratorios xTAG RVP.	65
Tabla 18: Indicadores estadísticos básicos de los métodos analizados.	65
Tabla 19: Porcentaje de sensibilidad y especificidad de dos métodos de PCR múltiple para la detección e identificación de virus respiratorios.	66

Listado de Abreviaturas

8-MOP	8-metoxipsoraleno
AdV	Adenovirus
cDNA	DNA complementario
CMTA	Análisis de la temperatura de disociación del cártcher
CoV	Coronavirus
DGE	Dirección General de Epidemiología
dNTPs	Desoxirribonucleotidos trifosfatados
EV	Enterovirus
F	Proteína de fusión
FAA	Faringoamigdalitis aguda
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
HA	Hemaglutinina
HBoV	Bocavirus Humano
HN	Hemaglutinina-Neuroamidasa
INF	Influenza
IRA	Infecciones Respiratorias Agudas
ITRS	Infecciones del tracto respiratorio superior
Kb	Kilobases
M	Proteína de matriz
MpV	Metapneumovirus
NA	Neuroamidasa
Nm	Nanómetros
Nt	Nucleótidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIV	Virus de Parainfluenza
RT-PCR	PCR con transcriptasa inversa
RV	Rinovirus
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo

SH	Proteína hidrofóbica pequeña
T _m	Temperatura de disociación
TOCE™	<i>Taggin oligonucleotide cleavage extensión</i>
TSPE	Extensión múltiple blanco específica del oligonucleótido
VSR	Virus Sincicial Respiratorio
xTAG RVP	Panel viral respiratorio Luminex xTAG

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas son una causa importante de morbilidad, hospitalización y mortalidad en niños de todo el mundo, particularmente en niños menores de 5 años que radican en países en vías de desarrollo. En 2011 la OMS reportó que 1.2 millones de niños menores de 5 años (18%) mueren por neumonía anualmente.

En nuestro país, según datos de la Secretaría de Salud y la Dirección General de Información en Salud, del año 2010 al 2012 se registraron 466,985 egresos hospitalarios por infecciones respiratorias agudas, de los cuales 261,432 corresponden a niños menores de 5 años, es decir, más del 55% de los egresos totales. Siendo la neumonía e influenza, la principal causa de morbilidad en un 46%. En el año 2010 se registraron 1,653 defunciones por neumonía e influenza en niños menores de 5 años, 1,725 en el año 2011 y 1,558 en el año 2012, alcanzando una cifra oficial de casi 4,936 niños que han muerto a causa de dichas enfermedades en tan solo 3 años.

La tasa de incidencia de neumonías reportada en 2012 fue de 1044 x 100,000 niños menores de 1 año y de 256 x 100,000 niños de 1 a 4 años de edad. Sin embargo, se desconoce con precisión la etiología en estos casos, ya que en la mayoría de ellos no se ha dado el seguimiento adecuado para identificar el agente causal. Se estima que del total de neumonías hasta en un 70% de los casos es de etiología viral.

El diagnóstico rápido y exacto de los patógenos virales respiratorios es esencial para los pacientes ya que tiene el potencial de reducir las complicaciones y el uso innecesario de antibióticos. Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos han mostrado superioridad sobre los métodos de diagnóstico clásicos en la identificación de una gama más amplia de virus, con alta sensibilidad y especificidad. Varios estudios han mostrado las ventajas de la PCR múltiple para la detección simultánea de un panel viral en un solo ensayo. Actualmente

existen varios estuches comerciales de PCR múltiple para la detección de virus respiratorios, uno de ellos es el Anyplex™II RV16. Este estuche está disponible en nuestro país y a diferencia del estuche utilizado por el laboratorio de referencia nacional (InDRE), tiene la capacidad de detectar 16 virus respiratorios a un bajo costo.

Este estudio evalúa la eficacia del Anyplex RV16 como prueba diagnóstica de virus respiratorios en muestras de lavados nasofaríngeos de niños menores de 5 años de edad con diagnóstico clínico y/o radiológico de neumonía.

2. ANTECEDENTES

2.1. Infecciones Respiratorias Agudas

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) son un grupo complejo y heterogéneo de enfermedades causadas por diversos agentes infecciosos que afectan cualquier parte del aparato respiratorio, durante un lapso no mayor de 15 días¹.

Las IRA se clasifican según el sitio anatómico afectado en altas y bajas, siendo la epiglotis el punto de separación de los dos tipos de patologías. Un solo sitio puede estar involucrado; no obstante, la mayoría de las infecciones pueden involucrar a más de un sitio. Entre las IRA altas tenemos rinofaringitis, faringoamigdalitis, sinusitis y otitis media aguda, y como IRA bajas se incluyen epiglotitis, laringitis, laringotraqueobronquitis (crup), bronquitis, bronquiolitis y neumonía².

Las manifestaciones clínicas de las IRA pueden variar desde una sintomatología leve, que desaparece en pocos días, a severa, como disnea, estridor, taquipnea, tiraje subcostal o intercostal, tos, otalgia, otorrea, rinorrea y obstrucción nasal, cianosis con o sin fiebre².

2.1.1. Infecciones Respiratorias Agudas Altas

2.1.1.1. Rinofaringitis

La rinofaringitis aguda (resfriado común) constituye uno de los principales motivos de consulta médica, ausentismo escolar y laboral. Es un síndrome de las vías respiratorias superiores que puede ser causado por varios virus. Se caracteriza por congestión nasal, rinorrea, estornudos, lagrimeo, irritación nasofaríngea, tos y malestar general y en ocasiones se presenta fiebre. El resfriado común es considerado de origen casi exclusivamente viral, las infecciones bacterianas no son frecuentes. Los principales agentes etiológicos involucrados son rinovirus (40 a 50%), influenza A/B/C (25 a 30%), coronavirus (10 a 15%) parainfluenza (5%), virus sincicial respiratorio (5%) y adenovirus (5 a 10%)³⁻⁴.

El resfriado común es cosmopolita y se presenta de manera endémica y epidémica. La incidencia aumenta durante los meses fríos y lluviosos. La transmisión se hace por contacto directo o por diseminación de las gotitas de saliva e indirectamente a través del uso de pañuelos y otros fómites contaminados por secreciones de personas infectadas. El período de incubación oscila entre 12 y 72 horas. El cuadro generalmente se autolimita en 7 a 10 días. Los síntomas iniciales incluyen congestión nasal e irritación faríngea, malestar general, cefalea, rinorrea acuosa durante los primeros días, posteriormente se vuelve mucopurulenta (reflejo de la severidad de la respuesta inflamatoria, no del agente etiológico), tos y estornudos. Cabe mencionar que puede acompañarse de laringitis y bronquitis⁴. El diagnóstico se fundamenta básicamente en el cuadro clínico.

2.1.1.2. Faringoamigdalitis

La faringoamigdalitis aguda (FAA) se define como un proceso agudo febril, de origen generalmente infeccioso, que cursa con inflamación de la faringe y/o las amígdalas, en las que se puede observar la presencia de eritema, edema, exudados, úlceras o vesículas⁵.

La etiología más frecuente es viral (adenovirus entre 12 a 23%, rinovirus en un 20% y enterovirus, virus de la gripe A y B, parainfluenza, virus sincicial respiratorio, coronavirus, metapneumovirus humano y bocavirus humano en un 5 a 10%). Entre las bacterias, se encuentra principalmente *Streptococcus pyogenes*, o estreptococo beta hemolítico del grupo A, que es responsable de alrededor del 10 al 15% de los casos de faringitis en los adultos y del 15 al 30% de los casos en los niños⁶.

A cualquier edad, la presencia de conjuntivitis, rinorrea, afonía, tos y/o diarrea es un hallazgo sugestivo de origen vírico de la infección. También se pueden evidenciar, además de eritema e inflamación faringoamigdalina, aftas, vesículas o ulceraciones o exudado variable, según el tipo de virus responsable⁷. Las FAA por adenovirus son frecuentes en menores de 3 años, el cuadro clínico típico se presenta con fiebre mayor de 39°C, asociado a un exudado amigdalino en un 50% de los casos y adenopatía cervical anterior, rinorrea, tos y/o conjuntivitis en un 15-

25%. Debido a las características clínicas de este tipo de infección viral, capaz de mimetizar una FAA estreptocócica, es muy frecuente que el manejo terapéutico no sea adecuado. La prueba de detección rápida de adenovirus en exudado faríngeo puede ayudar a diferenciar este tipo de FAA y a evitar el uso innecesario de antibióticos[5].

2.1.1.3. Rinosinusitis

La rinosinusitis aguda se define como una inflamación del revestimiento de la mucosa de los senos paranasales y fosas nasales con una duración de hasta 4 semanas, y puede ser causada por varios factores, incluyendo irritantes ambientales, alergias e infecciones virales, bacterianas y/o fúngicas. Las causas fisiopatológicas de la rinosinusitis pueden ser la obstrucción de la vías de drenaje de los senos paranasales, el deterioro ciliar y/o una alteración en la cantidad y calidad del moco. Entre las manifestaciones comunes iniciales de la sinusitis están expulsión de secreciones nasales y congestión de vías nasales, dolor facial a la presión y cefalea⁷.

La rinosinusitis aguda es uno de los problemas de salud más comunes en niños. Algunos estudios en lactantes ilustran que las infecciones virales del tracto respiratorio superior (ITRS) ocurren con una incidencia de 6 episodios por paciente al año y que el 8% se complican por rinosinusitis⁸.

La rinosinusitis viral es más frecuente que la bacteriana. Los virus aislados con mayor frecuencia son: rinovirus, adenovirus, parainfluenza e influenza. Clínicamente se ha observado que tiene una duración de hasta 10 días y en el 99% de los casos los individuos se recuperan completamente⁷.

2.1.1.4. Otitis media aguda

La otitis media es un trastorno inflamatorio del oído medio que aparece por disfunción de la trompa de Eustaquio en diversas enfermedades como la ITRS y rinosinusitis crónica. La reacción inflamatoria provoca que se genere un trasudado estéril dentro del oído medio y las cavidades mastoideas. Sin embargo, el líquido

puede contaminarse por alguna bacteria o virus proveniente de la nasofaringe lo cual produce un cuadro agudo o en ocasiones crónico.

Por lo regular, la otitis media aguda aparece después de una infección viral del tracto respiratorio superior. A menudo los virus causales son: virus sincicial respiratorio, metapneumovirus, influenza, rinovirus y enterovirus. En ocasiones la infección por estos virus predispone a padecer una otitis media bacteriana. Se ha observado que entre el 17 al 40% de los casos existe una co-infección virus y bacteria.⁷.

2.1.2. Infecciones Respiratorias Agudas Bajas

2.1.2.1. Laringotraqueitis aguda

La Laringotraqueitis aguda (crup) es una infección vírica pediátrica de las vías respiratorias superiores e inferiores que produce inflamación del área subglótica (directamente debajo de las cuerdas vocales) y un cuadro de disnea que se acompaña de las notas estridentes características del crup durante la inspiración. El crup comprende un espectro de infecciones, desde laringitis hasta laringotraqueobronquitis, y en ocasiones laringotraqueobronconeumonitis. Su etiología casi siempre es vírica (véase Figura 1). Se caracteriza por tos de tipo ladrido, ronquera y estridor inspiratorio que afecta a los niños pequeños, generalmente de entre 6 meses y 3 años de edad⁶.

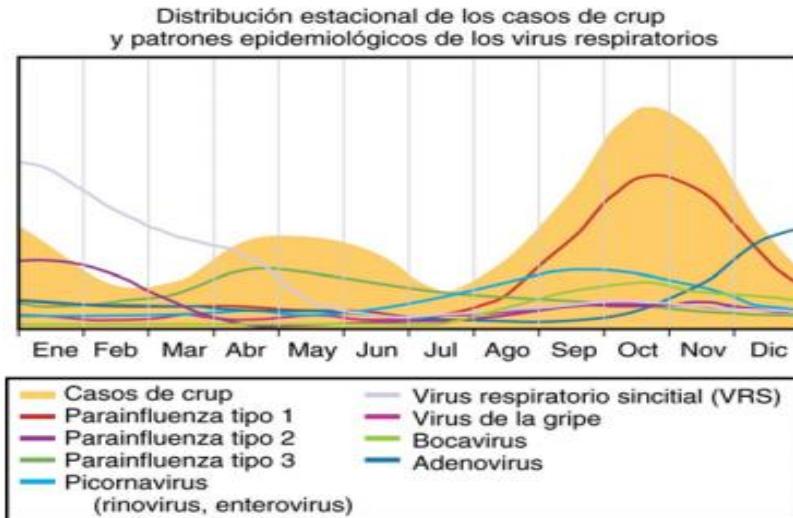


Figura 1. Distribución estacional de los casos de laringotraqueitis aguda y patrones epidemiológicos de los virus respiratorios. Fuente: Mandell, G.L., Dolin, R. & Bennett, J.E. Mandell, Douglas y Bennett: Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 7th ed. España: Elsevier Health Sciences; 2011. Capítulo 56, Laringotraqueobronquitis aguda (crup); Figura 56.1, p. 833.

Las estaciones en las que se observan más casos de crup, en climas templados, son otoño e invierno, en años alternos, se producen brotes del virus de parainfluenza tipo 1, y en primavera y verano predomina el virus de parainfluenza tipo 3. La influenza y el virus sincicial respiratorio se presentan como una enfermedad estacional, que aparecen en brotes epidémicos desde el invierno hasta la primavera, pero sólo contribuyen a una pequeña proporción de los casos de crup. Los picornavirus, adenovirus, coronavirus y bocavirus están presentes en muchos meses del año⁶.

2.1.2.2. Bronquiolitis

La Academia Americana de Pediatría (AAP) define a la bronquiolitis como una inflamación aguda, edema y necrosis de las células epiteliales que recubren las vías aéreas pequeñas, particularmente en niños menores de 2 años. Inicialmente se presenta con fiebre, rinorrea, tos seca, respiración rápida; posteriormente aparecen manifestaciones con compromiso del tracto respiratorio inferior con presencia de estertores crepitantes y/o sibilancias, así como un incremento en la

producción de moco y broncoespasmo. La causa más frecuentes es viral (virus sincicial respiratorio, rinovirus, metapneumovirus, parainfluenza, influenza, adenovirus, coronavirus y bocavirus). El virus sincicial respiratorio es la causa más común (50-80% de los casos)⁹.

2.1.2.3. Neumonía

La neumonía es un proceso inflamatorio infeccioso debido a la invasión y proliferación de microorganismos en el parénquima pulmonar, evadiendo al sistema inmunológico y provocando exudados intra-alveolares que comprometen las unidades alveolares, los bronquiolos terminales, respiratorios y el espacio intersticial circundante¹⁰. El diagnóstico de la neumonía es clínico y se caracteriza por la presencia de fiebre, tos que puede ser productiva con expectoración purulenta, dificultad para respirar, dolor torácico y la presencia de infiltrados en la radiografía de tórax. Puede acompañarse de otros síntomas sistémicos más en relación con la respuesta inflamatoria inmune generalizada que por la misma patología⁶⁻⁷.

En menores de 5 años con tos y/o dificultad para respirar, acompañadas o no de fiebre, la neumonía se diagnostica por la presencia de taquipnea (respiración rápida) o tiraje intercostal (depresión o retracción de la parte inferior del tórax durante la inspiración). Los lactantes con afección muy grave pueden ser incapaces de comer o beber, y pueden presentar pérdida de la consciencia, hipotermia y convulsiones¹¹.

Diversos agentes infecciosos (bacterias, hongos y virus) causan neumonía. Se ha reportado que la etiología viral está presente entre un 30 y un 50% de las neumonías de forma aislada o en co-infección con bacterias, siendo más frecuente la asociación con virus en los niños pequeños (menores de 3 años). Los virus implicados son prácticamente todos los virus respiratorios siendo más frecuentes el virus sincicial respiratorio, reconocido como el principal patógeno causante de enfermedades respiratorias agudas en lactantes y niños pequeños, particularmente de bronquiolitis y neumonía¹²; además de adenovirus, rinovirus y

bocavirus humano. Sin embargo, el principal problema en las neumonías reside en discriminar entre etiología vírica y bacteriana, ya que los síntomas de la neumonía vírica y de los de la bacteriana son similares¹³.

2.2. Asma

El asma es una enfermedad respiratoria crónica caracterizada por ataques recurrentes de falta de aire y sibilancias, cuya gravedad y frecuencia varían de una persona a otra. Es la enfermedad crónica más común en la población pediátrica afectando a unos 235 millones de personas en el mundo. Mas del 80% de las muertes por asma tienen lugar en países de ingresos bajos y medios-bajos¹⁴. Se define como un trastorno inflamatorio crónico de la vía aérea que ocasiona hiperreactividad bronquial, y se manifiesta clínicamente como tos, sibilancias recurrentes, dificultad para respirar y opresión en el pecho, sobre todo por la noche y/o madrugada¹⁵.

En la mayoría de las exacerbaciones del asma bronquial se detectan virus respiratorios, tanto en niños (80-85%) como en adultos (75-80%)¹⁶. Varios estudios han mostrado que infecciones por virus sincicial respiratorio, rinovirus, metapneumovirus, parainfluenza y enterovirus pueden estar asociadas con el asma inducida por virus. Sin embargo, el papel de las infecciones virales en la fisiopatología del asma siguen sin entenderse completamente¹⁷⁻¹⁸.

2.3. Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS), reporta que la mortalidad por IRA comprende 3.9 millones de muertes al año, de las cuales se presentan 1.9 millones en niños menores de 5 años de edad ¹⁹.

En México, la Dirección General de Epidemiología (DGE), reportó que en el 2012 se presentaron 26,707, 461 casos de IRA, colocándola como la principal causa de morbilidad a nivel nacional desde el año 2000 (véase Figura 2). Los grupos de edad con mayor tasa de incidencia, por cada 100,000 habitantes, fueron los menores de 1 año con 110,039 casos, 1 a 4 años con 64,462 y el de 5 a 9 años con 33,512. Las entidades con mayor tasa de incidencia fueron Aguascalientes (35,224), Zacatecas (34,385) y Sinaloa (32,743); las de menor incidencia se registraron en Chiapas (13,138), Baja California (15,740) y Veracruz (17,318)²⁰.

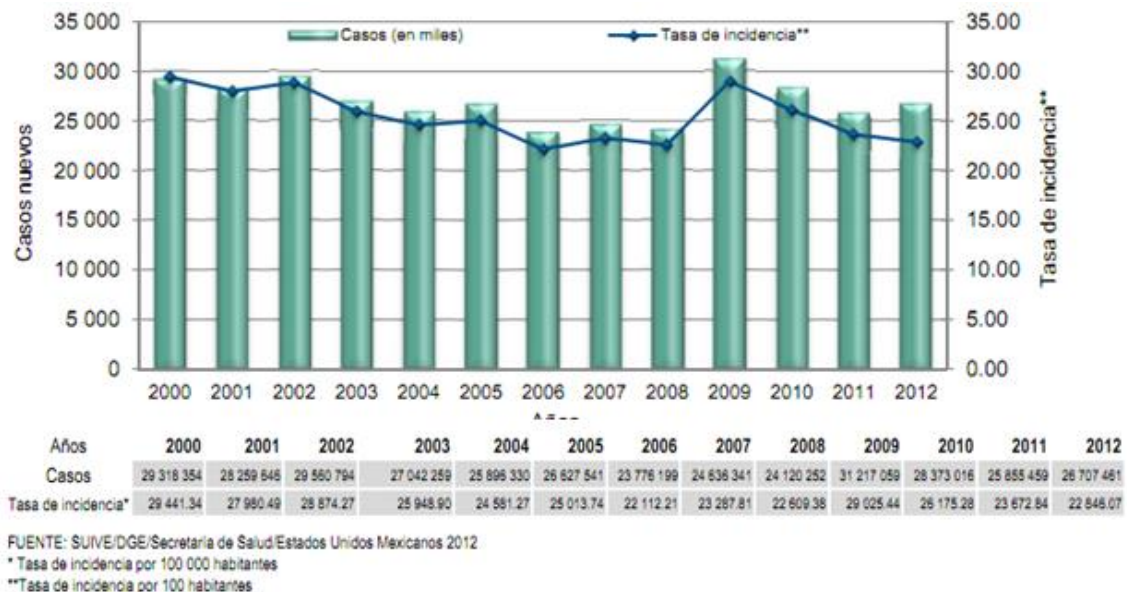


Figura 2. Casos nuevos y tasa de incidencia por año. Estados Unidos Mexicanos 2000-2012. Fuente: SINAVE/DGE/SALUD/Información Epidemiológica de Morbilidad, Anuario Ejecutivo 2012.

De acuerdo a la DGE, la tasa de incidencia nacional acumulada de IRA hasta la semana número 52 del año 2013, en menores de 1 año, fue de 109,635 casos y del

grupo de 1 a 4 años fue de 64,036 casos. A la semana número 28 del presente año, la tasa de incidencia nacional reportada en menores de 1 año es de 54,156 casos y del grupo de 1 a 4 años de 33,775 casos. Con respecto al mismo periodo del año anterior se presenta un incremento del 2.2% en el número de casos (véase Figura 3).

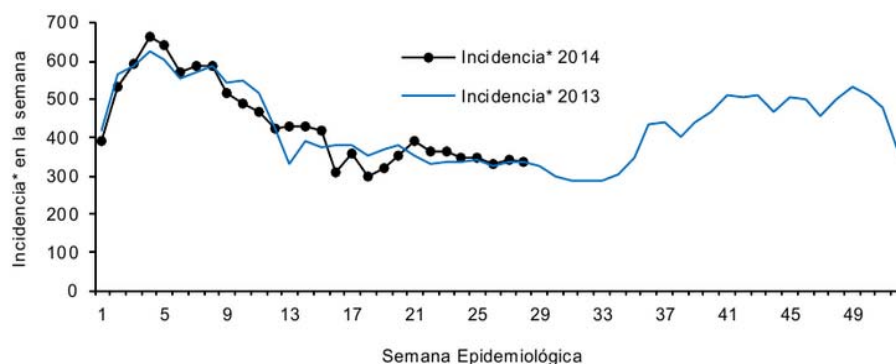


Figura 3. Comparativo de incidencia de IRA, por semanas epidemiológicas, México 2013-2014. *Incidencia semanal por 100,000 habitantes. Fuente: SINAVE/DGE/SALUD/ Sistema de Notificación Semanal de casos Nuevos, acceso 24 de Julio de 2014.

La neumonía es la principal complicación de las IRA, es la principal causa de muerte infantil en todo el mundo, se calcula cada año mueren 1.2 millones de niños menores de 5 años (18% de todas las defunciones de niños menores de 5 años en todo el mundo). En nuestro país se tienen reportados 87,758 egresos hospitalarios por neumonía e influenza y 37,710 corresponden a niños menores de cinco años. En el año 2010 hubo 1653 defunciones por neumonía e influenza de niños menores de 5 años, 1725 en el año 2011 y 1558 en el año 2012 ^{11,21}.

En general, los virus son los agentes etiológicos más comunes de las IRA. Se sabe que más de 200 diferentes tipos de virus son causa de las IRA, siendo el virus sincicial respiratorio (VSR) A o B, rinovirus (RV) A, B o C, metapneumovirus humano (MpV) y parainfluenza (PIV) 1, 2, 3 o 4 los más comunes identificados en pacientes con IRA. De hecho, junto con estos virus respiratorios, enterovirus (EV), influenza (INF), coronavirus (CoV), adenovirus (AdV) y bocavirus humano (HBoV) representan alrededor del 70% de las IRA detectadas ^{16,22}.

2.4. Virus respiratorios

2.4.1. Paramixovirus

La familia *Paramyxoviridae*, del orden Mononegvirales, está clasificada en dos subfamilias: la *Paramyxovirinae* y la *Pneumovirinae*. La primera contiene 5 géneros: *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Avulavirus*, *Morbillivirus* y *Henipavirus*. A su vez la subfamilia *Pneumovirinae* contiene dos géneros: *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*. La clasificación está basada en características morfológicas, la organización del genoma y de la actividad biológica de las proteínas²³.

Los paramixovirus son virus envueltos, esféricos, de 150 a 350 nm de diámetro, pleomorfos o filamentosos con espículas glucoproteicas en su superficie de 8 a 15 nm de longitud. Poseen un genoma viral compuesto de una hebra sencilla de RNA no segmentada, de polaridad negativa (3'→5') de 15,000 a 19,000 nucleótidos, el cual se encuentra alojado en una nucleocápside helicoidal (12 a 15 nm de diámetro en los *Pneumovirinae* y 17 a 18 nm en los *Paramyxovirinae*) rodeada de una envoltura lipídica que se deriva de la membrana plasmática de la célula hospedera durante la gemación⁶.

En la envoltura se localizan las glicoproteínas virales (F, G y SH). La proteína G, que es altamente glucosilada, es importante para la fijación viral a las células del hospedero, mientras que la proteína de fusión (F) es importante para la fusión de partículas víricas a las células diana y la fusión de células infectadas a células vecinas para formar sincicios; la función de la proteína pequeña hidrofóbica SH aún no está clara. Sin embargo, se ha observado que su ausencia da lugar a la atenuación del virus y evita la apoptosis en las células infectadas²⁴. Las proteínas virales N, P y L, constituyen la nucleocápside (véase Figura 4)²³. La replicación viral se lleva a cabo en el citoplasma.

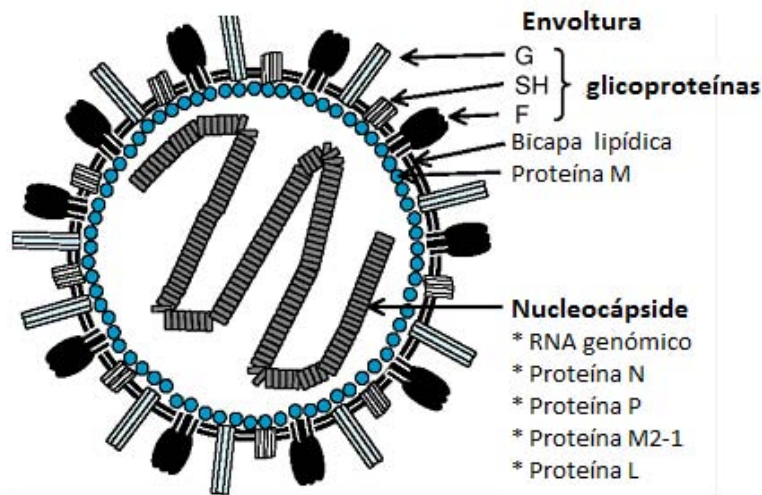


Figura 4. Diagrama de VSR y MpV. (G) Proteína glucosilada, (SH) Proteína Pequeña Hidrofóbica, (F) Proteína de fusión, (M) Proteína matriz, (N) Proteína de nucleocápside, (P) fosfoproteína, (M2-1) Factor de elongación de la transcripción (L) Proteína Larga.

2.4.1.1. Virus Sincicial Respiratorio

El virus sincicial respiratorio (VSR) pertenece al género *Pneumovirus*, subfamilia *Pneumovirinae*²⁵. El RNA codifica para 11 proteínas: 9 estructurales (N, P, M₂₋₁, L, M, F, G, SH y M₂₋₂) y 2 no estructurales (NS1 y NS2). Las variaciones antigénicas en el tipo de proteína G determinan el subgrupo (A o B)²⁶⁻²⁷.

El VSR es la principal causa de infecciones del tracto respiratorio inferior, bronquiolitis y bronconeumonía. Estudios epidemiológicos sugieren que alrededor del 60-70% de los infantes han tenido una infección por VSR dentro de su primer año de vida y el 100% a los 2 años de edad^{16,28}. Se estima que el VSR anualmente infecta a 64 millones de personas y causa 160,000 muertes²⁹.

Estudios de cohorte y prospectivos a largo plazo de casos y controles han ligado la bronquiolitis por VSR al desarrollo de sibilancias y al inicio y/o exacerbación del asma^{17,30-31}

2.4.1.2. Metapneumovirus

El metapneumovirus (MpV) pertenece al género *Metapneumovirus*, subfamilia *Pneumovirinae*. El RNA codifica para nueve proteínas estructurales (N, P, M₂₋₁, L, M, F, G, SH y M₂₋₂), y a comparación de VSR, carece de los genes no estructurales inhibidores del interferón NS1 y NS2 (Fig. 4). La proteína G de MpV es más pequeña que la proteína G de VSR, pero la secuencia de aminoácidos predicha sugiere una estructura similar y una profusa glucosilación³².

Está clasificado en dos genotipos (A y B) y cuatro subgrupos (A1, A2, B1 y B2) por análisis filogenético con base en los genes F y G^{6,23}.

Es un patógeno importante que causa IRA en todas las edades (principalmente bronquiolitis, laringotraqueítis y neumonía)¹⁶. Es el responsable del 1 y 5% de las infecciones de las vías respiratorias superiores en la infancia y de 10 a 15% de las afecciones de las vías respiratorias de niños que requieren hospitalización. En adultos jóvenes y de edad avanzada causa entre el 2 y 4% de las IRA^{6-7,32-33}.

Estudios prospectivos en niños y en adultos sugieren que el MpV juega un papel etiológico en la exacerbación del asma^{16,33}. Además, se ha sugerido que MpV puede ser responsable hasta del 60% de casos de otitis media aguda en niños^{32,34}. En adultos, se ha asociado con la exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) entre el 4 y 12%³².

En hospederos inmunocomprometidos puede causar graves enfermedades respiratorias (p. ej. síndrome de dificultad respiratoria adquirida, neumonía hemorrágica e insuficiencia respiratoria). Estas infecciones por MpV han sido reportadas en pacientes con leucemia linfoblástica aguda, linfoma, cáncer de pulmón y en pacientes con trasplantes de pulmón y células madre hematopoyéticas (con o sin neutropenia concomitante)³⁵.

2.4.1.3. Parainfluenza

Los virus parainfluenza (PIV) constituyen 3 de los 5 géneros de la subfamilia *Paramyxovirinae*. Dentro del género *Respirovirus* se encuentran los PIV 1 y 3, en el género *Rubulavirus* los PIV 2 y 4, y en el género *Avulavirus* los virus parainfluenza aviar. El genoma codifica para 6 proteínas comunes (HN, F, M, N, P, y L). Aunque también pueden codificar proteínas adicionales (C, V, D, W, I, SH) que no son esenciales para la replicación *in vitro* y son llamadas proteínas accesorias²³.

La envoltura está asociada con dos glicoproteínas: la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F). La HN es una proteína de fijación viral, que también causa hemadsorción y hemaglutinación. La proteína de fusión forma espigas salientes en la envoltura y media la fusión entre la envoltura viral y la membrana plasmática del hospedero. La superficie interior de la envoltura está recubierta con la proteína hidrofóbica no glicosilada de la matriz (M)²³.

Los virus parainfluenza son causa de IRA en todo el mundo, principalmente de bronquiolitis, bronquitis, crup, asma y neumonía¹⁶. En adultos, las infecciones por dicho virus suelen ser leves y generan entre el 10 y 12% de los trastornos respiratorios y en ancianos menos del 5%^{6,16}. La gran importancia de los virus parainfluenza se debe a que generan enfermedad respiratoria en bebés y niños pequeños, en quienes constituyen la segunda causa, después del VSR, de enfermedad en vías respiratorias inferiores. El PIV 3 suele observarse en los primeros 6 meses de vida como causa importante de bronquiolitis y neumonía. A los 5 años de edad, la mayor parte de los niños cuentan con anticuerpos contra los serotipos 1,2 y 3⁷.

De los virus aislados de casos de crup, alrededor del 60% son parainfluenza, siendo el tipo 1 el agente etiológico más frecuente. El serotipo 2 produce una enfermedad similar, pero menos grave. En tanto, las enfermedades relacionadas con el tipo 4 son menos frecuentes y severas^{6-7,23}.

2.4.2. Picornavirus

La familia *Picornaviridae* está compuesta por nueve géneros: aphthovirus, cardiovirus, enterovirus, erbovirus, hepatovirus, kobovirus, parechovirus, rinovirus y teschovirus.

Los picornavirus son virus icosaédricos pequeños, sin envoltura, de 20 a 30 nm de diámetro. Poseen un genoma viral compuesto de una hebra sencilla de RNA, de polaridad positiva ($5' \rightarrow 3'$). El genoma mide entre 7 200 y 8 500 bases. El RNA codifica una única poliproteína grande (VPg), que se escinde después de la traducción en cuatro proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4) y siete proteínas no estructurales (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D)^{23,36}.

La cubierta proteica está formada por las 4 proteínas estructurales (véase Figura 5). Mientras que VP1, VP2, y VP3 están expuestas en la superficie viral, VP4 está en contacto íntimo con el RNA, y por lo tanto no es accesible desde afuera de la superficie del virión³⁷⁻³⁸. Los picornavirus poseen una hendidura profunda, llamada cañón, que separa las subunidades de la VP1. El cañón es el sitio de unión al receptor y en su base se encuentra una zona hidrofóbica que es el sitio de unión para fármacos antivirales³⁹.

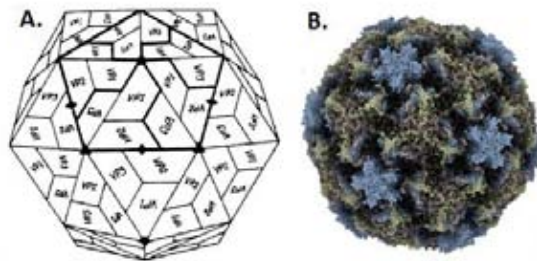


Figura 5. Estructura de los picornavirus. A: Esquema de la cápside icosaédrica.

B: Rinovirus humano.

2.4.2.1. Rinovirus

Los rinovirus (RV) son miembros del género *Rinovirus*. Se encuentran divididos en tres especies genéticas: A, B y C. Y se reconocen en total 102 serotipos definidos.

De estos serotipos, 91 utilizan la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule 1*) como receptor celular y constituyen el grupo receptor “mayor”, 10 se valen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR, *low density lipoprotein receptor*) y constituyen el grupo receptor “menor” y uno utiliza un factor de descomposición acelerada ^{6,36}.

A diferencia de otros miembros de la familia de los picornavirus, como los enterovirus, los rinovirus son lábiles a los ácidos y se inactivan por completo a un pH ≤ 3 . Su temperatura óptima de crecimiento es entre 33°C a 35°C. La replicación ocurre en el citoplasma de las células y se cultivan en cultivos celulares de fibroblastos de embriones humanos o de células HeLa ^{7,23}. Los rinovirus son causa de enfermedad respiratoria aguda (30 a 50% de los casos) y la principal del catarro común. Reportes recientes sugieren que pueden ser agentes inductores de sibilancias, exacerbación del asma y pueden conducir a bronquiolitis y neumonía ¹⁶.

Cerca de 25% de las infecciones por rinovirus son asintomáticas, particularmente en niños (12 a 32%, en niños menores de 4 años) ^{6,40}. En conjunto, las tasas de infección por rinovirus son mayores en lactantes y niños pequeños y descienden al aumentar la edad⁷.

2.4.2.2. Enterovirus

Los enterovirus (EV) son miembros del género *Enterovirus*. Se dividen en 4 especies (EV A a D), incluyendo 108 serotipos²³.

A diferencia de otros picornavirus (por ejemplo, los rinovirus), los EV son estables en un amplio rango de pH (3 a 10), lo que les permite mantener la infectividad durante el tránsito por el aparato digestivo^{6,23}.

Los EV se encuentran dentro de los virus más comunes que infectan a los humanos en todo el mundo. El 75% de las infecciones enterovirales se producen en niños menores de 15 años de edad, frecuentemente en lactantes y niños pequeños; las infecciones graves ocurren más a menudo en los primeros días de vida y en niños mayores⁶⁻⁷.

Los distintos serotipos, de manera individual, tienen diferentes patrones de circulación y pueden estar asociados con diferentes manifestaciones clínicas. Aunque la mayoría de las infecciones por EV permanecen asintomáticas (50 a 80%), estos virus están asociados con diversos síndromes clínicos, que van desde enfermedad febril menor a patologías graves y potencialmente mortales, incluyendo la meningitis aséptica (responsables hasta del 90% de los casos en niños y adultos jóvenes), encefalitis (10 a 35%), miopericarditis (33%), parálisis flácida aguda y sepsis neonatal. Las infecciones sintomáticas por enterovirus en personas mayores son infrecuentes⁶.

Por otra parte, los EV pueden inducir enfermedades respiratorias no específicas en niños o adultos, incluyendo las infecciones del tracto respiratorio superior e inferior, dando lugar a bronquitis, bronquiolitis y neumonía. Estudios clínicos recientes indican que estos virus son considerados como la tercera causa etiológica de la bronquiolitis en bebés de 1 a 12 meses. Varios estudios de casos clínicos reportan el papel etiológico de coxsackie A16 (CV-A16), enterovirus 71 (EV-71) y de un genotipo recién descubierto (EV-104) en el desarrollo de la neumonía aguda o grave, indicando que los EV pertenecientes a las especies A a C pueden ser responsables de infecciones graves en el tracto respiratorio inferior en lactantes o adultos inmunocompetentes⁴¹⁻⁴².

2.4.3. Influenza

Los virus de influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Son virus envueltos, con forma esférica o filamentosa de 80 a 120 nm, con proyecciones superficiales que constan de espículas de hemaglutinina (HA) y neuroamidasa (NA) (véase Figura 6). Poseen un genoma de hebra sencilla de RNA segmentado, de sentido negativo, el cual puede codificar hasta 8 proteínas estructurales: PB1, PB2, PA, HA, NA, NP, M₁ y M₂. Además codifica para dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2 (también denominadas proteínas de exportación nuclear o NEP)⁶.

La envoltura viral está formada por la membrana plasmática de la célula hospedera. Las espículas con forma cilíndrica y actividad HA miden unos 4 nm de diámetro y 14 nm de longitud. Cada espícula es un trímero compuesto por tres polipéptidos HA. Las zonas antigénicas y de unión a las células se localizan en la cabeza globular de la molécula. La NA es una enzima que cataliza la separación del ácido siálico terminal (N-acetil neuroamínico) de las glucoproteínas que poseen ácido siálico. Las espículas de NA tienen forma de seta y son tetrámeros de polipéptidos de NA. Al igual que en el caso de HA, las zonas antigénicas y de actividad enzimática se localizan en lo que sería el sombrero de la seta. Se han descrito al menos 16 tipos muy divergentes y con diferencias antigénicas de moléculas HA entre los virus de tipo A (H₁ a H₁₆), y al menos nueve NA distintas (N₁ a N₉)⁶⁻⁷.

En la envoltura del virus también existen pequeñas cantidades de una tercera proteína de membrana integral, M₂ (canal iónico; necesario para liberar la envoltura)⁶.

Por dentro de la envoltura se encuentra la proteína M₁, que parece aportar estabilidad al virión, aparte de tener un papel destacado en el ensamblaje del virus. La nucleocápside (9 a 15 nm) está formada por la nucleoproteína viral (NP), la cual se encuentra asociada íntimamente con el RNA genómico, al igual que las polimerasas (PB₁, PB₂ y PA) unidas a un extremo⁶⁻⁷.

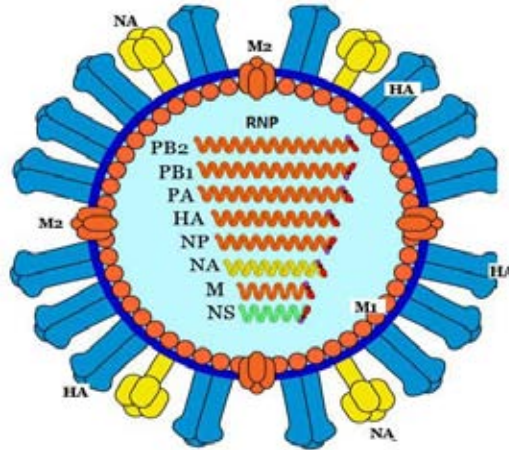


Figura 6. Diagrama esquemático de un virión de influenza. NA neuramidasa (tetrámero); HA Hemaglutinina (trímero); M1 proteína de matriz (interactúa con ribonucleoproteínas y glicoproteínas); M2 canal iónico (tetrámero); Ribonucleoproteínas (RNP): Proteínas polimerasas (PB1 polimerasa básica; PB2 polimerasa básica y PA polimerasa ácida) y NP nucleoproteína.

Los virus de influenza se clasifican en tipos A, B y C, cuya especificidad está conferida por los antígenos de la nucleoproteína interna y la matriz. La subtipificación del virus de influenza tipo A se hace con sueros específicos capaces de distinguir las diferentes variantes de la HA y la NA. No se hace la subtipificación de los tipos virales B y C.

Los virus de influenza causan enfermedades respiratorias altamente contagiosas, generando epidemias anualmente, con resultados potencialmente fatales. Su distribución es mundial. Las epidemias anuales por estos virus causan de 3 a 5 millones de casos de enfermedad grave y de 250 000 a 500 000 muertes cada año²⁰. Las tasas de infección están en el límite de 10 a 20% de la población general pero pueden llegar al 50% en grupos de edad de alto riesgo^{6,23,43}.

La enfermedad tiene un inicio súbito, fiebre mayor de 38 °C, postración, cefalea, mialgias, tos seca y manifestaciones nasales como estornudos, rinorrea y obstrucción aérea, con inflamación faríngea. La fiebre declina al segundo o tercer día de la enfermedad. Al ceder la fiebre, los síntomas respiratorios pueden

exacerbarse, y tanto la tos como la rinorrea pueden ser más intensos. Cuando se resuelven la mayoría de los síntomas, la tos y la debilidad pueden persistir hasta una semana más. Las complicaciones que se pueden observar son neumonía bacteriana secundaria, neumonía viral primaria y neumonía mixta, viral y bacteriana. Las complicaciones extrapulmonares incluyen el síndrome de Reye, miositis, encefalitis y manifestaciones neurológicas inespecíficas. Las formas severas de la enfermedad son causadas por los tipos A y B, mientras que el tipo C causa enfermedad del tracto respiratorio superior de forma esporádica. En el adulto, la mayoría de los individuos tienen anticuerpos contra el tipo C^{23,44}.

La influenza es importante sobre todo en los grupos de alto riesgo, que incluye a niños, personas mayores de 65 años o con enfermedades inmunes y/o metabólicas. En estos grupos se observa la mayor tasa de mortalidad (hasta del 90% en personas mayores de 65 años durante infecciones interpandémicas) Sin embargo, esto no quiere decir que el resto de la población esté exenta de sufrir la enfermedad; la mayor morbilidad se presenta en adolescentes y adultos jóvenes⁶. La influenza está relacionada con el invierno; en el hemisferio norte se presenta de noviembre a abril y en el hemisferio sur de mayo a octubre. En áreas tropicales puede haber un patrón bimodal o bien no presentar estacionalidad⁷.

2.4.4. Adenovirus

Los adenovirus (AdV) humanos pertenecen a la familia *Adenoviridae*, género *Mastadenovirus*. Son virus icosaédricos, no envueltos, de 70 a 90 nm de diámetro. Poseen un genoma de doble cadena de DNA de 35, 937 pares de bases, el cual codifica para 11 proteínas estructurales, 4 de las cuales se encuentran en el núcleo. Estas proteínas son: II (hexón), III (base del pentón), IIIa (asociada con base del pentón), IV (fibra), V (Núcleo, asociado con DNA y base del pentón), VI (polipéptido menor hexón), VII (Núcleo), VIII (polipéptido menor hexón), IX (polipéptido menor hexón), TP (proteína terminal del genoma) y μ (Núcleo, proteína pequeña transactivadora). Las proteínas II, III y IV forman la cápside, la cual cuenta con 252 subunidades llamadas capsómeros; 240 son hexones y en los

vértices hay 12 pentones, de los cuales se proyecta una glicoproteína denominada fibra con una protuberancia terminal (véase Figura 7)²³. Este complejo es tóxico a las células, causando redondeamiento y muerte de las células a través de la inhibición de su síntesis proteica. Las proteínas fibrilares determinan la especificidad de las células diana.

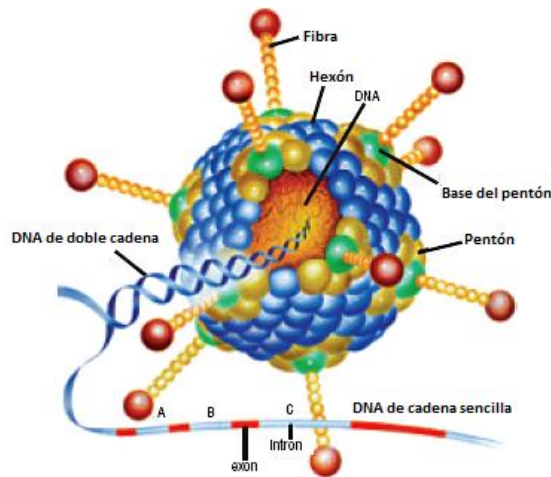


Figura 7. Diagrama del virión de un AdV.

Los AdV son causantes de alrededor del 5% de los casos de infección de las vías respiratorias superiores en niños menores de 5 años de edad y del 10% de las neumonías en la infancia⁴⁵.

Aunque comúnmente pueden infectar y replicarse en diversos sitios del tracto respiratorio, también pueden hacerlo en el ojo y el tracto gastrointestinal. Alrededor del 2 al 5% de las enfermedades diarreicas agudas en los niños pequeños, se deben a los adenovirus 40 y 41⁶.

Menos frecuentemente, los adenovirus pueden infectar la vejiga y el hígado. En ocasiones, estos virus también pueden causar enfermedad en otros órganos, tales como el páncreas, el miocardio o el sistema nervioso central, lo cual puede desencadenar una meningoencefalitis. Aunque existen al menos 51 diferentes serotipos de adenovirus humanos, la mayoría de las enfermedades se asocian con

sólo un tercio de estos tipos. En los niños pequeños, se aíslan con más frecuencia los tipos 1, 2, 3 y 5⁷.

Alrededor del 50% de todas las infecciones por adenovirus causan una enfermedad subclínica⁶. Pero han sido descritos diferentes síndromes clínicos en los cuales se ha asociado a los adenovirus. Estos incluyen queratoconjuntivitis epidémica, conjuntivitis folicular aguda, fiebre faringoconjuntival, rinitis, faringitis (con o sin fiebre), amigdalitis, bronquitis, infección del tracto respiratorio inferior, síndrome coqueluchoide, neumonía, cistitis aguda hemorrágica, orquitis, nefritis, síndrome oculogenital, gastroenteritis, adenitis mesentérica, hepatitis y apendicitis^{6-7,23}.

2.4.5. Coronavirus

Los coronavirus (CoV) pertenecen a la familia *Coronaviridae*, género *Coronavirus* del orden de los Nidovirales. Son virus pleomórficos o esféricos, envueltos, con proyecciones en forma de pétalo muy espaciadas, de 20 nm de longitud. Tienen un diámetro de 100 a 160 nm. Poseen un genoma de hebra sencilla de RNA de sentido positivo y no segmentado. Este RNA genómico tiene caperuza, es poliadenilado y tiene entre 27 000 y 36 000 pares de bases, convirtiéndolo en el RNA viral más largo conocido²³. El RNA codifica una poliproteína grande, que se escinde por proteasas codificadas por el virus para formar varias proteínas no estructurales, como una RNA polimerasa dependiente de RNA y una ATPasa/helicasa, además de 4 o 5 proteínas estructurales entrelazadas con un número variable de proteínas estructurales y menores. La primera de las proteínas estructurales principales es una proteína Hemaglutinina-Estereasa (HE) de superficie, presente en CoV-OC43 y HKUI, que puede intervenir en la adhesión y/o liberación de la partícula en la superficie celular. La segunda proteína estructural codificada, es la glucoproteína de superficie (S) que forma las proyecciones en forma de pétalo en la superficie del virión, y es responsable de la unión y estimulación de anticuerpos neutralizantes. A continuación, hay una pequeña proteína de la envoltura (E), una glucoproteína de membrana (M) y una proteína de la nucleocápside (N) que forma un complejo con el RNA⁴⁶ (véase Figura 8).

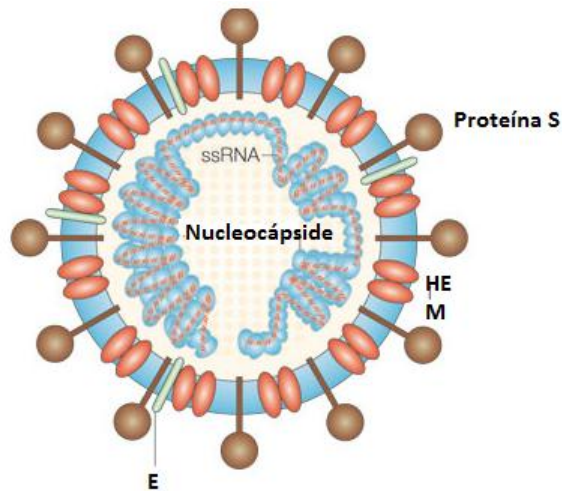


Figura 8. Virón de CoV. **(S)** Glucoproteína de superficie. **(HE)** Glucoproteína Hemaglutinina-esterasa, **(M)** glucoproteína de membrana, **(E)** Proteína de la envoltura pequeña.

Los CoV se dividen serológicamente en tres grupos. En el grupo I se encuentran las cepas de coronavirus humanos CoV-229E y CoV-NL63. En el grupo II los coronavirus humanos OC43, HKUI y el coronavirus zoonótico SARS-CoV²³.

Los CoV infectan tanto a humanos como animales en los que causan enfermedades respiratorias y entéricas. Las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones por coronavirus en los seres humanos siguen dos patrones distintos, uno para los coronavirus humanos (es decir, 229E, NL63, OC43, HKU1), y otro para el coronavirus zoonótico, SARS-CoV^{6,23}.

Las infecciones por CoV humanos son asociadas a enfermedad del tracto respiratorio inferior en niños y adultos hospitalizados, entre el 8% y 5% respectivamente. Mundialmente, los coronavirus producen entre el 10 y 35% de los resfriados comunes, según la estación del año⁷. Además, han sido asociados con sibilancias y exacerbación del asma¹⁶. Asimismo, han sido implicados ocasionalmente en enfermedades entéricas, particularmente en recién nacidos²³.

El SARS-CoV es el agente causal del síndrome respiratorio agudo severo (SARS). El virus infecta tanto a las vías respiratorias superiores como a las células epiteliales alveolares, lo que resulta en lesión pulmonar. El virus o productos virales también son detectados en otros órganos, como el riñón, el hígado y el intestino delgado. De acuerdo con este último, el virus también se detecta en las heces. La manifestación primaria es fiebre, neumonía, con alteración pulmonar difusa e hipoxia importante. Otras manifestaciones son diarrea, linfopenia y alteraciones hepáticas. La mortalidad en adultos es de aproximadamente 10%. La infección por SARS-CoV en niños es al parecer relativamente leve comparada con adultos. Se han observado 2 patrones de enfermedad. Los niños pequeños presentan rinorrea importante, tos y diarrea, mientras que niños mayores presentan malestar, mialgias y escalofríos semejantes a los adultos. Se observa fiebre, linfopenia, y anomalías radiográficas en todas las edades^{6-7,23}.

2.4.6. Bocavirus

El bocavirus humano (HboV) fue descrito por primera vez en 2005 por Allander y colaboradores⁴⁷. El virus fue aislado de muestras de aspirado nasofaríngeo procedentes de lactantes y niños suecos con infecciones del tracto respiratorio inferior. Por su organización genética y homología secuencial ha sido clasificado en la familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae*, género *Bocavirus*. Por ende, se trata de un virus pequeño carente de envoltura, de 21 a 28 nm de diámetro con simetría icosaédrica. Su genoma está formado por DNA de hebra sencilla⁴⁸.

El genoma de este parvovirus codifica para dos proteínas no estructurales (NS1 y NP1) y dos proteínas estructurales de la cápside: las proteínas virales 1 (VP1) y 2 (VP2), idénticas en secuencia, que sólo difieren en la región amino-terminal de VP1, conocida como región única de VP1 (VP1u). En HBoV esta región posee 129 aminoácidos y tiene actividad de fosfolipasa A2, que es importante para la capacidad infectante viral, favoreciendo la entrada al núcleo de la célula hospedera para iniciar la replicación viral⁴⁸⁻⁴⁹ (véase Figura 9).

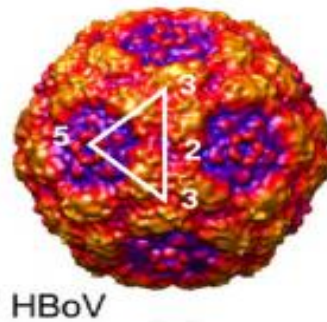


Figura 9. Cápside de HBoV. El triángulo equilátero blanco, identifica una unidad asimétrica de la cápside icosaédrica.

El HBoV no ha sido replicado *in vitro* y no se han reportado modelos animales. Ha sido detectado en todo el mundo, y se ha observado en el 1.5 a 19% de las secreciones respiratorias en los estudios de prevalencia, principalmente en niños menores de 2 años de edad con enfermedades agudas del tracto respiratorio⁴⁹. El HBoV es detectado raramente en adultos y frecuentemente es co-detectado con otros virus respiratorios en un 50 a 60%. Sin embargo cada vez hay más evidencias de que el virus es patógeno por sí mismo y se asocia principalmente con sibilancias y enfermedades respiratorias en niños pequeños^{6,9,50-51}.

2.5. Métodos de diagnóstico y detección de virus respiratorios

La detección y diagnóstico de virus respiratorios se ha realizado utilizando una combinación de técnicas que incluyen inmunoensayos enzimáticos, detección con anticuerpos fluorescentes, cultivos celulares y la amplificación de ácidos nucleicos⁵². Con el descubrimiento de nuevos virus, los laboratorios se enfrentan al reto de detectar hasta 20 virus diferentes que causan enfermedad respiratoria aguda de las vías respiratorias superiores e inferiores. La aplicación de la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos, particularmente de PCR múltiple junto con los microarreglos de fluidos usando microperlas o chips de DNA (oligonucleótidos colocados sobre un chip) representan el enfoque diagnóstico más reciente para los laboratorios clínicos y completa la evolución del diagnóstico de virus respiratorios⁵³.

2.5.1. Métodos no moleculares

Los métodos de diagnóstico no moleculares se basan, directamente, en la detección del virus mediante su aislamiento en cultivo celular, o de sus componentes (antígenos). Indirectamente, en la detección de anticuerpos específicos que resultan de la inducción de la respuesta inmune del hospedero por la presencia de patógenos virales⁵⁴.

2.5.1.1. Aislamiento viral

El aislamiento vírico en cultivos celulares se ha considerado el estándar de oro para la detección de virus y es el método de referencia. El crecimiento viral se detecta por la aparición de un efecto citopático en la monocapa celular tras diferentes días post-inoculación, dependiendo del virus¹³. La ventaja fundamental del cultivo celular es la confirmación de la viabilidad e infectividad del virus y la diferenciación entre virus capaces de infectar e incapaces de hacerlo. Esta información no es posible obtenerla utilizando los métodos de amplificación molecular y los métodos antigénicos de detección vírica. Además, los virus aislados

pueden estudiarse para conocer la sensibilidad a determinados antivíricos y la realización de estudios fenotípicos⁵⁴.

Sin embargo, es un método con limitaciones ya que el proceso suele ser lento, demandando días a semanas para la identificación, y en consecuencia puede no estar disponible a tiempo para influir en la atención del paciente. Es un proceso laborioso y caro, que requiere el uso de sistemas de cultivo adecuados para la detección óptima de virus. Su sensibilidad puede verse afectada por la labilidad de algunos virus, puesto que la integridad de éstos y su carga son factores limitantes para el buen desarrollo de este método diagnóstico. Por otro lado, existen virus no cultivables por no conocerse la línea celular adecuada (HBoV) o cuyo crecimiento no produce un efecto citopático evidente (CoV, RV). Además, no está disponible en cualquier laboratorio, y no hay personal capacitado para realizarlo en forma rutinaria en todos los laboratorios, solo aquellos especializados o de referencia^{13,54-55}.

2.5.1.2 Detección de antígenos víricos

Las técnicas de detección de antígenos víricos se basan en la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia distintos antígenos virales. Las técnicas más comunes incluyen la inmunofluorescencia (IF), la inmunocromatografía (IC) y los enzimo-inmunoanálisis (EIA)^{13,55}. Entre sus ventajas destaca el hecho de que permiten una rápida obtención de resultados (15 a 30 minutos), son fáciles de usar y pueden detectar determinados virus no viables presentes en la muestra^{13,54-55}. En comparación con el cultivo celular, específicamente para el VSR, las técnicas antigénicas (IF) son más sensibles (84 a 99%)⁵⁵. En la tabla No. 1 se muestran algunos estuches comerciales disponibles para la detección de virus respiratorios por detección de antígenos virales.

Tabla No. 1. Estuches comerciales de detección de antígenos para virus respiratorios. EIA- Ensayo inmunoenzimático, IC- inmunocromatografía, IFD- Inmunofluorescencia Directa, INF- Influenza, VSR- Virus sincicial respiratorio.

Estuche comercial	Compañía	Virus detectados	Sensibilidad	Especificidad	Técnica utilizada
Directigen Flu A +B®	BD	INF A y B	A:96% B:88%	A:99% B:97%	EIA
FLU OIA®	Biostar	INF A y B	62 a 95%	52 a 80%	EIA
QuickVue Influenza Test®	Quidel	INF A y B	73 a 81%	96 a 99%	EIA
SAS FluAlert®	SA Scientific	INF A y B	65 a 84%	95 a99%	EIA
BinaxNOW® Influenza A & B	Alere	INF A y B	A: 81 a 83% B:53 a 65%	A:93 a 97% B:96-100%	IC
Light Diagnostics® Respiratory Syncytial Virus DFA	Light Diagnostics	VSR	100%	83.3%	IFD

En general, la principal desventaja de estas técnicas es que tienen baja sensibilidad (Tabla No. 2), especialmente para adenovirus (0 a 58%). Además, están limitadas a la detección de 5 virus respiratorios (INF A/B, VSR, MpV, PIV 1/2/3 y AdV), y requieren de personal experimentado para su interpretación^{13,55}.

Tabla No. 2. Sensibilidad y especificidad de métodos no moleculares de detección de virus respiratorios. IF- Inmunofluorescencia, EIA- Ensayo inmunoenzimático, IC- inmunocromatografía, INF- Influenza, PIV-Parainfluenza, VSR- Virus sincicial respiratorio, MpV- Metapneumovirus.

Técnica	Virus	Sensibilidad	Especificidad
IF	INF	60 a100%	80 a 100%
	PIV	70 a 83%	
	VSR	84 a 99%	
	MpV	68 a 74%	
EIA	INF	70 a 75%	90 a 95%
	VSR	61 a 96%	
IC	INF	44 a 95%	90 a 100%
	VSR	59 a 89%	

2.5.1.3. Detección de la respuesta humoral específica

La identificación indirecta de virus respiratorios puede realizarse por ensayos serológicos, en los cuales se detecta la presencia de anticuerpos en el suero del paciente, como resultado del contacto del virus con el sistema inmune del hospedero. Los ensayos más frecuentemente utilizados son la reacción de fijación del complemento, inhibición de la hemaglutinación (HAI), neutralización, inmunofluorescencia indirecta y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)⁵⁴.

Uno de los mayores problemas del diagnóstico serológico de virus respiratorios es la necesidad de evaluar muestras de suero en pares (la primera en la fase aguda de la enfermedad y la segunda en la fase de convalecencia). Esto representa una gran dificultad, ya que muchos de los virus respiratorios, además de ser muy prevalentes, producen reinfecciones, por lo que el paciente presenta una inmunización previa frente a un determinado virus, que será aumentada por la reinfección. Por tanto no se podrá demostrar en muchos casos una verdadera seroconversión, ni un aumento de título significativo^{13,54}. La principal utilidad de estos ensayos es como herramienta en la vigilancia epidemiológica de la circulación de virus de diferentes tipos (por ejemplo, influenza A y B)¹³.

En general, los métodos no moleculares de detección de virus respiratorios presentan importantes desventajas: suelen tener baja sensibilidad, reproducibilidad y especificidad; algunos solo son aplicables si el virus es capaz de crecer en cultivo celular y a menudo tienen resultados difíciles de interpretar, por ende, dependen de la experiencia del personal que los realice^{13,53-55}.

2.5.2. Métodos moleculares

Los métodos moleculares de diagnóstico que permiten la detección de ácidos nucleicos están basados en la búsqueda y el reconocimiento del genoma viral en la muestra clínica o en el cultivo viral. Suponen una ventaja respecto al cultivo en

cuanto a mayor sensibilidad, rapidez, especificidad y a que no es necesaria la presencia de virus viables en la muestra clínica⁵⁴.

2.5.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*), fue desarrollada por Kary Mullis en 1985, en el laboratorio de *Cetus Corporation*, California, lo que le representó el premio Nobel de Química en 1993⁵⁶. Es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, aprovecha la propiedad natural de la enzima DNA polimerasa para replicar hebras de DNA, y emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de DNA recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de DNA vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente⁵⁷.

Los elementos importantes en la reacción son el templado o plantilla (DNA o DNA complementario), la enzima, los oligonucleótidos o primers (oligonucleótidos), los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg^{+}), una solución amortiguadora o buffer y agua. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, alineación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos⁵⁸.

A continuación, se explican las etapas de cada ciclo de amplificación de la PCR convencional o también conocida como punto final:

- ✓ Etapa de desnaturalización: en ella, el DNA diana se incuba a elevada temperatura (94°C) durante 20 a 30 segundos, de tal manera que las hebras se separan quedando accesibles a la hibridación de los oligonucleótidos.

- ✓ Etapa de alineación: la mezcla de reacción se enfría (55 a 65°C) para permitir que los oligonucleotidos se unan a su secuencia complementaria en el DNA diana.
- ✓ Etapa de extensión o elongación: se suele realizar a 72°C y en ella los oligonucleotidos se extienden mediante una DNA polimerasa, utilizando el DNA diana como molde. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP complementarios en dirección 5'→3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de DNA creciente (la cual se extiende), realizándose entre 30 y 50 ciclos en cada reacción.

Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son visualizados a través de una electroforesis para confirmar si la reacción fue exitosa. La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Típicamente se emplea la electroforesis en gel de agarosa, para fragmentos grandes y en acrilamida, para los más pequeños. Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de DNA conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado⁵⁸.

La PCR ha logrado un amplio uso en virología clínica y está desplazando a los métodos convencionales (cultivo viral, detección de antígeno y serología). En el caso de algunos virus como PIV tipo 4, RV, MpV, HBoV o algunos CoV, la detección de sus ácidos nucleicos constituye el método de elección para su diagnóstico. Los tipos de PCR más utilizados para la detección y diagnóstico de virus respiratorios son la PCR cualitativa o punto final y la cuantitativa o en tiempo real^{13,54}. Actualmente, estos métodos detectan uno o más virus en el 95% de niños con bronquiolitis, sibilancias agudas o asma, y en el 72% de niños con neumonía⁵⁹.

En la Tabla No. 3 se presentan algunos estuches comerciales de PCR convencional para la detección de virus respiratorios.

Tabla No. 3. Estuches comerciales para la detección de virus respiratorios mediante amplificación genómica.

Estuche comercial	Proveedor	Termociclador	Virus detectado
Artus® Influenza RT-PCR Kit	Qiagen, Bonsai	Lightcycler®	INF A+B Detecta ambos pero no permite diferenciarlos.
LightMix® Influenza B Virus	Roche	Lightcycler®	Influenza B
LightMix® Kit Human MpV (TIB Molbiol)	Roche	Lightcycler®	MpV
Pro hMPV+ Assay Kit	Gen-Probe Prodesse	SmartCycler®	MpV
ProAdeno +Assay Kit	Gen-Probe Prodesse	SmartCycler®	AdV

Cabe destacar que los ensayos de PCR mono-específicos, es decir, una diana por ensayo, requieren de la amplificación por separado de cada patógeno, por lo que resultan ser costosos pues se necesita de un importante gasto de reactivos y requieren de mayor tiempo de proceso, el cual resulta ser laborioso ⁵⁹⁻⁶⁰.

2.5.2.2. PCR cuantitativa

Se utiliza para medir la cantidad de un producto de PCR. Uno de los primeros métodos de PCR cuantitativa desarrollados fue la PCR competitiva cuantitativa (PCR-CC; Grassi y colaboradores 1994). Este método está basado en la co-amplificación del templado o plantilla de DNA diana y cantidades definidas de un patrón de DNA interno (competidor) que portan los mismos sitios de unión del oligonucleótido. Dado que se conoce la cantidad de competidor inicial y que la eficiencia de la amplificación es la misma en los DNA competidor y diana, la proporción de las cantidades de los dos productos de la PCR, determinada por ejemplo mediante electroforesis en gel, es representativa de la proporción de los

DNA diana y competidor presentes en la mezcla de reacción antes de la amplificación⁶¹.

Actualmente, existen técnicas que cuantifican los productos de PCR de manera automática y computarizada. Estas técnicas modernas emplean sondas fluorescentes específicas para el DNA diana, de tal manera que la fluorescencia emitida es correlacionada con la cantidad de producto de PCR producido en cada ciclo⁵⁹.

2.5.2.3. PCR múltiple

En esta modificación de la PCR se incluyen, dentro de la misma reacción de amplificación, múltiples pares de oligonucleótidos específicos para diferentes dianas, por lo que se produce una co-amplificación de diferentes dianas. Por tanto, esta modificación tiene como principal ventaja el análisis de una misma muestra contra diferentes patógenos, lo que resulta, en comparación con la PCR de una sola diana, en un menor gasto en reactivos, menor consumo de muestra y menor tiempo de procesamiento. Además, puede ser acoplada con métodos de diferenciación, tales como perlas o microarreglos, que son tecnologías múltiples que permiten la detección de 10 a 2 millones de analitos en una sola muestra⁵⁹.

La PCR múltiple puede ser cualitativa (punto final) o cuantitativa. Un ejemplo de PCR múltiple cuantitativa es el panel viral respiratorio Luminex xTAG (Luminex Molecular Diagnostics), que fue uno de los primeros estuches de PCR múltiple para la detección de virus respiratorios disponibles en el mercado y el primer ensayo de PCR múltiple acreditado por la FDA para el diagnóstico de virus respiratorios, en enero del 2008⁶².

2.5.2.3.1. Luminex xTAG RVP

El panel viral respiratorio Luminex xTAG (xTAG™ RVP) es un ensayo de PCR cuantitativa múltiple para la detección de virus respiratorios que está aprobado por la agencia de Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés de *Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos; para la detección de 12 virus respiratorios. Detecta INF A y los subtipos H1, H3 y H5, INFB, VSR A, VSR B, CoV(SARS, NL63, 229E, OC43 y HKUI), PIV 1, 2, 3 y 4, MpV, AdV y EV/RV. El xTAG™ RVP es un sistema basado en un arreglo de perlas o microesferas⁶²⁻⁶³.

El procedimiento por xTAG para la detección de virus respiratorios conlleva varios pasos, por lo que el tiempo aproximado desde la extracción de ácidos nucleicos hasta el análisis de los resultados obtenidos es entre 8 y 10 horas, dependiendo del número de muestras. El ensayo utiliza una tecnología denominada xMAP®, fundamentada en una PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) múltiple que origina productos de amplificación de cada uno de los virus o subtipos de virus presentes en la muestra. Cada producto de PCR se trata con fosfatasa alcalina de camarón (SAP), para inactivar los nucleótidos restantes y con exonucleasa I (EXO), para degradar los oligonucleotidos que queden aún de la reacción RT-PCR.

A continuación se utiliza la técnica de extensión múltiple blanco específica del oligonucleótido (TSPE, por sus siglas en inglés de *Target-Specific Primer Extension*) para detectar el DNA vírico presente en la muestra. En este paso, cada virus es detectado por un oligonucleótido blanco-específico (CBE) que lleva una etiqueta de secuencia única. Se utiliza DNA polimerasa que solo elongará el oligonucleótido cuando se produzca una unión perfecta en el extremo 3', de forma que el oligonucleótido sólo se elongará si su DNA diana está presente en la muestra. Si se produce la elongación, se añaden la biotina-deoxicitidina trifosfato (B-dCTP).

Después de la TSPE, la reacción se añade directamente a micropozos que contienen esferas inmovilizadas y distinguibles espectralmente con unas anti-

etiquetas, las cuales son complementarias a las etiquetas de secuencia de los oligonucleotidos. Un marcador fluorescente (estreptavidina-ficoeritrina) se une a la biotina en los oligonucleotidos elongados. Cada oligonucleótido con etiqueta hibrida únicamente con la anti-etiqueta complementaria; por lo tanto, cada esfera coloreada representa un virus específico, mediante el complejo esfera/anti-etiqueta/oligonucleótido con etiqueta. Las esferas se analizan por el sistema Luminex®100IS o 200IS, el cual tiene dos láseres: uno identifica la esfera coloreada y el otro identifica la presencia o la ausencia del oligonucleótido elongado mediante el marcador ficoeritrina. De esta manera, la presencia de un virus en la muestra se identifica mediante la presencia de la señal de la ficoeritrina unida al CBE para ese virus. Los datos generados por el sistema Luminex®100/200™ se analizan mediante el software para el análisis de datos xTAG Data Analysis Software RVP-I (TDAS RVP-I) con el fin de obtener un informe de los virus presentes en la muestra (Véase Figura 10).

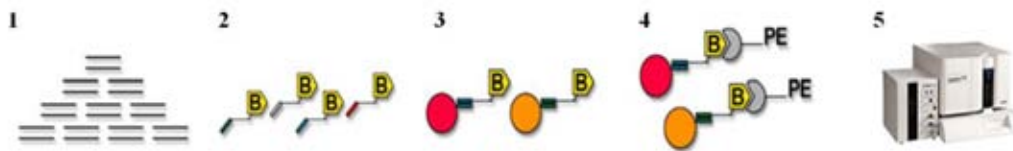


Figura 10. Diagrama esquemático del ensayo xTAG™RVP. (1) Amplificación de cada uno de los virus y subtipos de virus presentes en la muestra (RT-PCR). **(2)** TSPE múltiple con el tratamiento previo de los productos de PCR con SAP/EXO I. **(3)** Hibridación con el ensayo universal de microperlas de xTAG. **(4)** Unión del reportero fluorescente. **(5)** Detección con el sistema Luminex®.

Este ensayo dispone de un control interno (bacteriófago MS2) y un control de ejecución (bacteriófago lambda de DNA) para garantizar el funcionamiento adecuado del mismo⁶³.

Los ensayos de PCR múltiple son cada vez más populares para la detección de virus respiratorios por las ventajas que ofrecen, en comparación con los métodos convencionales y con la PCR de una sola diana. Además, estos ensayos pueden

ser cuantitativos (qPCR múltiple), incrementando con ello su utilidad en el diagnóstico de los agentes causales de enfermedades respiratorias⁵⁹.

2.5.2.4. PCR en tiempo real

La PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real es otra de las variantes de la PCR. El primer reporte de PCR en tiempo real fue documentado por Higuchi y colaboradores en 1993⁶⁴. Este procedimiento fue realizado utilizando bromuro de etidio durante la reacción en cadena de la polimerasa, un termociclador modificado para irradiar rayos UV y una cámara de detección. La señal recogida fue graficada en función de cada ciclo. Los datos finales daban cuenta de la cantidad de producto de PCR que era generado durante cada uno de los ciclos⁶⁵.

Desde entonces, la PCR en tiempo real permite cuantificar la cantidad de DNA presente en la muestra original e identifica con una alta especificidad muestras de DNA específicas a partir de su temperatura de disociación (denominado valor T_m , del inglés *melting temperature*). Para ello emplea fluorocromos inespecíficos o sondas específicas de secuencias marcadas de manera fluorescente que hibridan con el DNA diana, el cual puede ser cuantificado a medida que se amplifica (es decir, la detección del amplicón en tiempo real). El proceso se puede automatizar fácilmente usando un sistema que realice la amplificación (termociclador) y que a su vez sea capaz de leer fluorescencia. Existe una amplia oferta de aparatos en el mercado. La mayoría pueden trabajar con las diversas opciones de marcado fluorescente y son "abiertos", es decir, permiten programar las condiciones de amplificación y lectura de forma que su uso no queda limitado a unos reactivos determinados⁵⁹.

Asimismo, hay instrumentos de PCR en tiempo real que tienen la capacidad de detectar en una sola muestra ácidos nucleicos diana múltiples (PCR tiempo real múltiple) mediante el empleo de diferentes sondas marcadas con colorantes fluorescentes específicos para cada diana, cada uno con su propio espectro de emisión. Un ejemplo de ello, es el estuche comercial Anyplex™II RV16 (Seegene),

cuyas sensibilidades en la detección de virus respiratorios, en los dos únicos ensayos descritos para este estuche, han sido mejores que las de los ensayos de PCR múltiple con las que ha sido comparada⁶⁶⁻⁶⁷.

2.5.2.4.1. Anyplex™ II RV16

El sistema múltiple de PCR en tiempo real Anyplex II RV16 Detection basado en la tecnología TOCE™, permite la amplificación simultánea, detección y diferenciación de 16 virus respiratorios: INF A, INF B, VSR A, VSR B, MpV, AdV, CoV 229E, CoV NL63, CoV OC43, RV A/B/C, EV, HBoV y PIV 1, 2, 3 y 4⁶⁷. Está aprobado por la Comunidad Europea (Noviembre 2012), el Departamento de Salud de Canadá (Julio 2012) y recientemente, en el 2013, por la agencia de Administración de Drogas y Alimentos de Corea (KFDA) para el diagnóstico de virus respiratorios^{66,68}.

La tecnología TOCE (*Tagging Oligonucleotide Cleavage Extensión*) permite la amplificación y detección de blancos múltiples en un solo canal de fluorescencia. Tiene como principales componentes: un par de oligonucleótidos DPO™, el oligonucleótido de unión específica (pitcher) y el templado artificial (catcher).

El DPO es un par de oligonucleótidos de Seegene que estructuralmente comprende dos regiones distintas de alineación unidas por una polidesoxinosina, lo cual permite una amplificación altamente específica de las secuencias blanco. El "pitcher" o lanzador es un oligonucleótido que se une específicamente a la región que se quiere amplificar y además tiene una etiqueta de secuencia única. El "catcher" o atrapador es un templado artificial de doble etiquetado que posee una secuencia de captura (que es complementaria con la etiqueta del pitcher), un fluoróforo y una molécula extintora o enfriadora (quencher).

Al iniciar la reacción de PCR, el DPO y el lanzador se unen específicamente a la secuencia blanco del ácido nucleico, la etiqueta del atrapador está diseñada para no unirse al ácido nucleico problema. Durante la extensión del DPO, el lanzador es escindido por la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa, liberando la etiqueta, la cual hibrida con la secuencia complementaria del atrapador. Al realizarse la

extensión de la etiqueta, se separa la parte reportera fluorescente del extintor que previamente se encontraban unidas y que al separarse da como resultado una señal de fluorescencia (véase Figura 11). La señal es medida en tiempo real utilizando una curva de disociación que detecta la presencia de la secuencia blanco.

El atrapador está diseñado para tener una T_m (Temperatura de disociación) específica para cada uno de los blancos. Cuando existe una secuencia blanco en la muestra, el valor de T_m único esperado es obtenido durante el análisis de la temperatura de disociación del atrapador (CMTA). El valor de la T_m puede ser controlado ajustando la longitud de la secuencia del atrapador que no es afectado por variaciones de otras secuencias. Esta estrategia permite un valor de T_m constante, que no está afectada por variaciones en la secuencia blanco, ya que la generación de la señal fluorescente es dependiente de la amplificación del blanco pero independiente de la secuencia blanco de ácido nucleico problema. El valor de T_m del atrapador permite detectar múltiples blancos fácilmente en un solo canal. La tecnología TOCE permite detectar hasta 7 blancos por canal lo que resulta en la detección de 28 blancos en un instrumento de tiempo real de 4 canales. Las T_m pueden ser medidas repetidamente durante un periodo determinado de ciclos durante el proceso de PCR. Estos ciclos se denominan puntos CMTA cíclicos. La cuantificación de la secuencia blanco en la muestra puede ser determinada por el punto CMTA cíclico basado en el conocimiento de la concentración de un estándar.

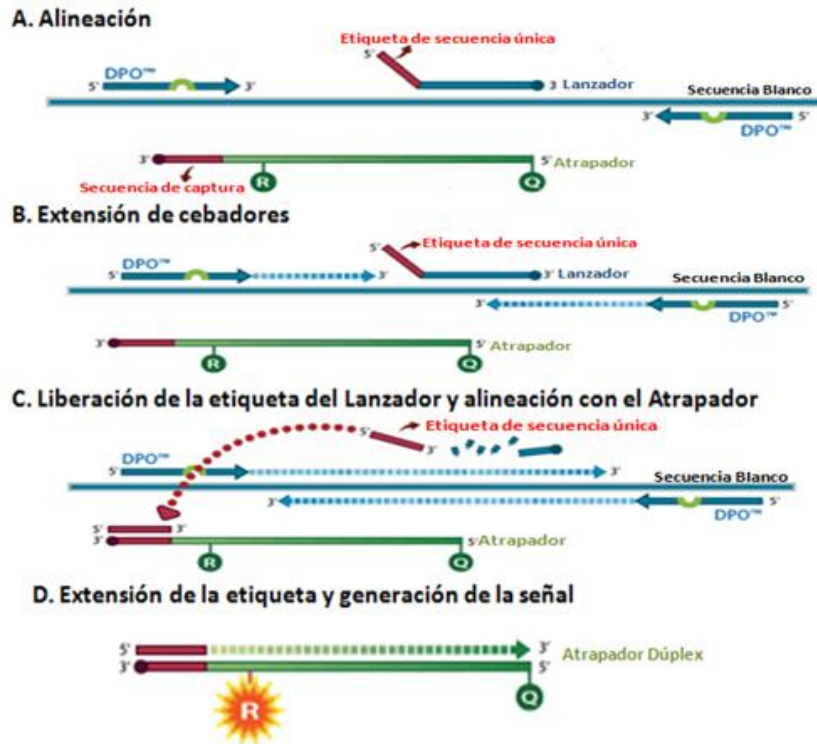


Figura 11. Diagrama esquemático de la tecnología TOCE. (A) El ensayo TOCE inicia con la hibridación río arriba y río abajo de los oligonucleótidos (DPO™) y el lanzador con la secuencia blanco. (B) La DNA polimerasa media la extensión de los oligonucleótidos DPO™. (C) La DNA polimerasa por su actividad exonucleasa encuentra la etiqueta del lanzador y lo escinde, liberando la porción etiquetada. La secuencia de la etiqueta liberada es complementaria a la secuencia de captura del atrapador. (D) Cuando la porción etiquetada está totalmente extendida en el atrapador, creando el atrapador Dúplex, la inhibición por el extintor disminuye y la señal fluorescente puede ser detectada.

El Anyplex™ II RV16 utiliza como control interno al bacteriófago MS2. Además, el sistema 8-metoxipsoraleno (8-MOP) es utilizado para controlar la contaminación cruzada de las muestras con amplicones⁶⁹.

De manera general, la técnica de PCR y sus respectivas variantes han revolucionado el diagnóstico de las infecciones respiratorias virales debido a su alta sensibilidad de detección, rapidez y potencial para la detección simultánea de 15 o más patógenos respiratorios. Existen varios estuches diagnósticos comerciales múltiples, para la detección de virus respiratorios. El primero de ellos disponible en el mercado fue el xTAG™ RVP. En México, el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) utilizó este estuche como método de diagnóstico de virus respiratorios. Sin embargo, el costo de los estuches es muy alto y la gran mayoría de los laboratorios del sector salud no cuenta con la infraestructura ni los recursos necesarios para llevar a cabo esta metodología. Teniendo en cuenta que las infecciones respiratorias agudas son la principal causa de morbilidad a nivel nacional, es de suma importancia contar con métodos de diagnóstico de virus respiratorios que sean accesibles en costos, eficientes y confiables en la detección de patógenos virales respiratorios. En nuestro país, se encuentra disponible el estuche comercial Anyplex™ II RV16, que nos permite detectar incluso un virus más que el xTAG pero a un costo mucho más bajo.

En este estudio se realiza la evaluación del Anyplex™ RV16 como prueba diagnóstica en muestra clínicas, comparando los indicadores estadísticos básicos (sensibilidad, especificidad y valores predictivos) de este estuche con respecto a los de xTAG™ RVP.

3. HIPÓTESIS

Si el método de detección de virus respiratorios Anyplex RV16 está basado en una tecnología de PCR en tiempo real múltiple entonces es probable que su sensibilidad y especificidad en la identificación de patógenos virales respiratorios sea mayor que la de un método basado en una tecnología de PCR múltiple en punto final.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Evaluar la técnica de PCR múltiple Anyplex RV16 para el diagnóstico de virus respiratorios en muestras clínicas de niños con neumonía.

4.2. Objetivos particulares

- Extraer material genético viral a partir de muestras de lavados nasales de niños menores de 5 años de edad con diagnóstico clínico de neumonía.
- Sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir del RNA extraído de las muestras clínicas.
- Identificar la presencia de virus respiratorios (VSR A y B, INFA y B, PIV1, 2, 3 y 4, AdV, MpV, CoV OC43, 229E y NL63, RV A/B/C, EV y BoV1/2/3/4) en muestras de lavados nasales de niños menores de 5 años de edad con neumonía en varios centros hospitalarios de México.
- Comparar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de Anyplex II RV16 vs Luminex xTAG RVP.

5. MATERIALES Y METODOLOGÍA.

5.1. Muestras clínicas

Se tomaron muestras de lavados nasofaríngeos (n=310), de niños menores de 5 años de edad con diagnóstico clínico y/o radiológico de neumonía que cumplieron con la definición de caso, en un período de 24 meses (de enero del 2010 a enero del 2012) atendidos en 6 centros hospitalarios del país: Hospital Pediátrico de Coyoacán, Distrito Federal, Hospital General de México, Distrito Federal; Hospital Civil de Guadalajara “Dr. Juan I Menchaca”, Guadalajara, Jalisco; Hospital Central Ignacio Morones Prieto de San Luis Potosí, San Luis Potosí; Hospital Regional Universitario de los Servicios de Salud del Estado de Colima, Colima y Hospital General de Zona No 1, IMSS. Durango.

Los lavados nasofaríngeos se realizaron mediante una sonda de alimentación estéril (conectada a una jeringa), que fue introducida de 1 a 2.5 cm (de acuerdo a la edad del paciente) en cada una de las narinas de los niños, instilándose 1 mL de solución salina en la nasofaringe, efectuando el lavado. El cual fue colocado en medio de transporte viral preparado con medio de Dulbecco modificado (Medio de Iscove, IMDM) con glicerol, Gentamicina y Anfotericina B.

De los lavados obtenidos se realizaron alícuotas de 1.5 mL que fueron guardadas a -70°C.

5.2. Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos se realizó tanto de forma manual como de forma automatizada. Esta última fue realizada sólo para las muestras analizadas mediante el método de xTAG RVP.

5.2.1. Extracción de ácidos nucleicos de forma automatizada por el equipo QIAcube™ (QIAGEN®)

QIAcube es una estación de trabajo robotizada que emplea el kit de extracción de RNA y DNA viral QIAamp MinElute Virus Spin (QIAGEN®). Realiza de forma automatizada los mismos pasos que el procedimiento manual (lisis, unión, lavados y elución). Las muestras (200 µL) son lisadas por agitación mecánica e incubadas en presencia de QIAGEN proteasa (inactivación de RNasas) y de la solución amortiguadora con acarreador AL, cuya función del RNA acarreador es mejorar la unión de los ácidos nucleicos con la membrana QIAamp. Las condiciones de unión son mejoradas agregando etanol para optimizar la unión de DNA y RNA a la membrana de sílice-gel. Para remover todos los contaminantes se lava con dos soluciones amortiguadoras, AW1 y AW2. La columna es transferida por el equipo a un tubo de microcentrífuga para la elución de los ácidos nucleicos con el amortiguador AVE (60 µL), los cuales se guardan a -20 °C.

Previo a la extracción se agregaron 20 µL del control interno de xTAG a cada muestra.

5.2.2. Extracción de ácidos nucleicos de forma manual con el kit de GeneAII® Ribo_spin vRD™

Comprende cuatro pasos: lisis, unión, lavados y elución. Se utilizan 300 µL de muestra. La lisis se lleva a cabo a temperatura ambiente (20-25 °C) por medio de la solución amortiguadora VL (500 µL) y la unión del DNA y RNA a la membrana de fibra de vidrio mediante la mezcla de los amortiguadores VL y RB1 (700 µL). Para remover los contaminantes se lava con dos amortiguadores, RBW y RNW (500 µL de cada uno). Por último la elución se realiza con un volumen de 30 a 50 µL de agua libre de nucleasas para obtener una concentración adecuada de ácidos nucleicos los cuales se guardan a -20°C.

Previo a la extracción, se agregan 10 µL del control interno de RV16 al volumen de muestra recomendado para extracción.

5.3. Detección de virus respiratorios mediante xTAG™ RVP

Los reactivos que contiene el estuche xTAG™RVP (Luminex Molecular Diagnostics) se enlistan a continuación:

Tabla No. 4. Reactivos suministrado por el estuche de Luminex xTAG.

Reactivo	Volumen (24 reacciones)
xTAG RVP PCR Primer Mix (sin dNTPs)	150 µL
xTAG RVP TSPE Mix (incluye dNTPs)	60 µL
Mezcla de perlas xTAG RVP	600 µL
Amortiguador 100x	3 mL

5.3.1. RT-PCR múltiple.

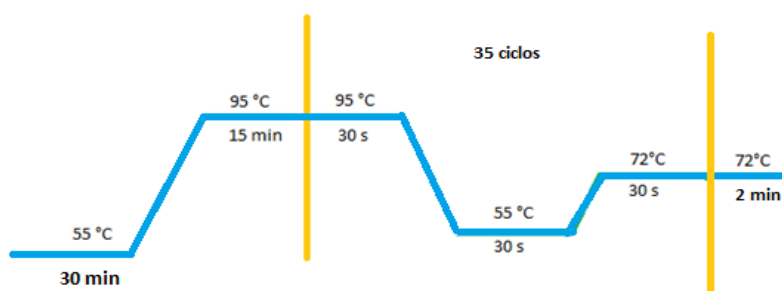
A continuación se enlistan los reactivos y los volúmenes requeridos para la preparación de la mezcla maestra para 24 reacciones de RT-PCR [20 muestras, 1 control de corrida (bacteriófago Lambda) y 3 controles negativos].

Tabla No. 5. Condiciones de RT-PCR por el ensayo xTAG™ RVP.

Reactivos para la mezcla maestra	Volumen (µL)
Agua libre de RNasas	172.5
Amortiguador 5x QIAGEN OneStep RT-PCR	187.5
QIAGEN dNTP Mix (10 mM de cada dNTP)	30
xTAG RVP PCR Primer Mix	150
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	60
Volumen Total	600.0

El volumen de mezcla maestra para cada reacción es de 20 μL . El volumen de ácidos nucleicos virales y de los controles respectivos es de 5 μL , dando un volumen total de 25 μL por reacción.

Condiciones del termociclador:



5.3.2. Tratamiento de los productos de PCR.

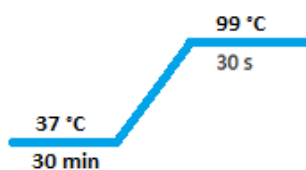
Cada producto de PCR se trata con fosfatasa alcalina de camarón (SAP), para inactivar los nucleótidos restantes y con exonucleasa I (EXO), para degradar los oligonucleótidos que quedan aún de la reacción RT-PCR (Tabla No. 6).

Tabla No. 6. Tratamiento enzimático de los productos de RT-PCR.

Reactivos	Volumen para 24 reacciones
SAP	75 μL
EXO I	60 μL
Volumen total	135 μL

Se agregan 4.5 μL de la mezcla enzimática a los 25 μL de la reacción de RT-PCR.

Condiciones del termociclador:



5.3.3. TSPE múltiple

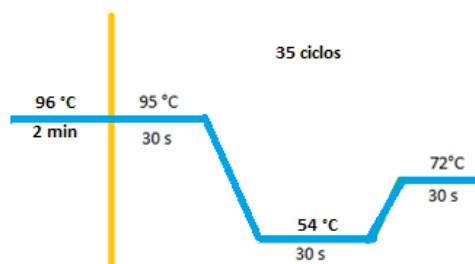
La preparación de la mezcla maestra de reacción se realiza de la siguiente manera:

Tabla No. 7. Mezcla maestra de reacción para la TSPE múltiple.

Mezcla de reacción TSPE	Volumen para 24 reacciones
Agua destilada libre de DNasas/RNasas	288 μ L
Amortiguador de PCR 10X	90 μ L
xTAG RVP TSPE Primer Mix	60 μ L
TaKaRa Taq HS polymerase	12 μ L
Volumen total	450 μL

A 15 μ L de esta mezcla de reacción, se agregan 5 μ L del producto tratado de RT-PCR.

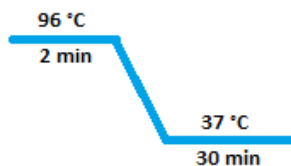
Condiciones del termociclador:



5.3.4. Hibridación de microesferas.

Se utiliza una placa de 96 micropozos, 24 de ellos contendrán 20 μ L del reactivo xTAG RVP Bead mix y 3.5 μ L de cada reacción TSPE múltiple.

Condiciones del termociclador:

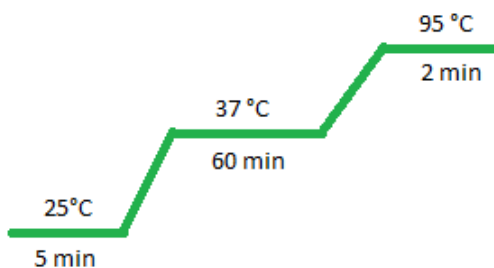


Después de que la hibridación ha sido completada, se agregan 100 μ L a cada micropozo de la solución reportera (estreptavidina-ficoeritrina). La placa se incuba a temperatura ambiente por 20 min protegiéndola de la luz.

5.3.5. Análisis de resultados

El análisis de las microesferas hibridadas y la adquisición de datos se lleva a cabo en el sistema Luminex® 100/200. Los datos generados se analizan mediante el software para el análisis de datos xTAG Data Analysis Software RVP-I (TDAS RVP-I) con el fin de obtener un informe de los virus presentes en la muestra.

Condiciones del termociclador:



5.4.2. PCR en tiempo real utilizando el estuche Anyplex™II RV16 Detection V1.01.

La preparación de la mezcla de reacción del PCR en tiempo real para cada muestra se realizó de la siguiente manera:

Tabla No. 9. Condiciones de amplificación de PCR en tiempo real por Anyplex II RV16 Detection

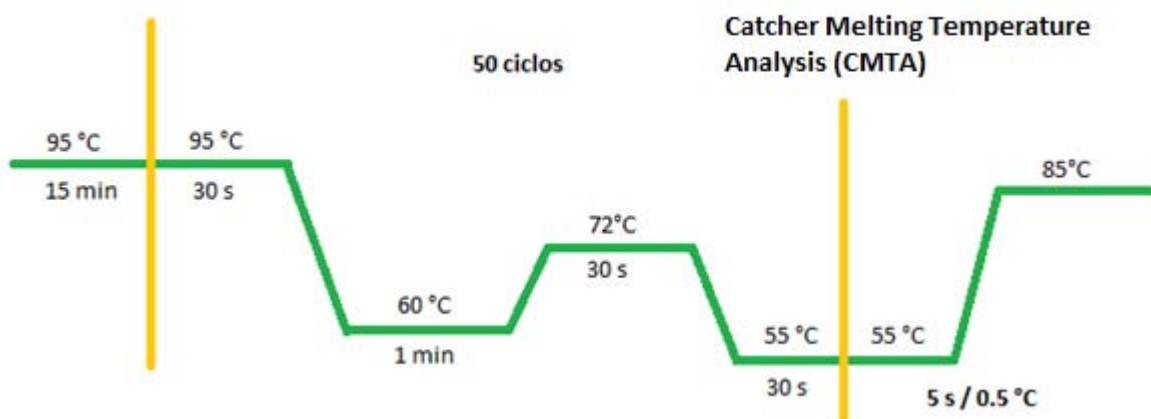
Reactivos	Volumen (µL)
5X RV16 A OM o 5X RV16 B OM	4
8-MOP	4
5 Anyplex PCR Master Mix	4
cDNA de las muestras / Controles	8
Volumen total	20

El estuche cuenta con dos tubos de controles positivos (RV16 PC1 Y RV16 PC2). El control positivo RV16 PC1 tiene clonas de cinco patógenos en el panel A (PIV4, AdV, PIV1, PIV2, PIV3) y cinco patógenos en el panel B (MPV, HBoV, Coronavirus 229E, Coronavirus NL63, Coronavirus OC43).

El control positivo RV16 PC2 tiene clonas de tres patógenos en el panel A (Influenza A, Influenza B, RV) y tres patógenos en el panel B (RSV A, RSV B, EV)⁶⁹.

El PCR en tiempo real se realizó en el equipo CFX96™ (Biorad), bajo las siguientes condiciones:

La fluorescencia fue medida continuamente durante el aumento de la temperatura.



Los picos de fusión se derivaron a partir de la fluorescencia inicial (F) frente a las curvas de temperatura (T) por el trazado de la derivada negativa de la fluorescencia frente a la temperatura respecto a la temperatura ($-\delta F / \delta T$ respecto a T). La Tabla 10 muestra la temperatura de disociación para cada blanco.

Tabla No. 10. Rangos de temperatura de disociación de blancos.

Canal	Panel A		Panel B	
	Blanco	T_m (°C) ^a	Blanco	T_m (°C)
FAM	PIV4	64-68.5	MpV	64-68.5
	ADV	77-81.5	BoV	77-81.5
HEX	PIV1	62.5-68	CoV 229E	62.5-67.5
	PIV2	70-74	CoV NL63	70-74
	PIV3	77.5-81.5	CoV OC43	76.5-81.5
R610	INF A	61.5-66.5	RSV A	62.5-67.5
	INF B	69-73	RSV B	69.5-73.5
	RV	75.5-80.5	EV	77-81
Q670	IC ^b	63.5-68.5	IC	63.5-68.5

^a T_m , temperatura de disociación o fusión; ^b IC, control interno.

5.4.3. Análisis de resultados

El análisis de las temperaturas de disociación fue realizado mediante el software Seegene Viewer, el cual interpreta los resultados como “positivo” o “negativo”.

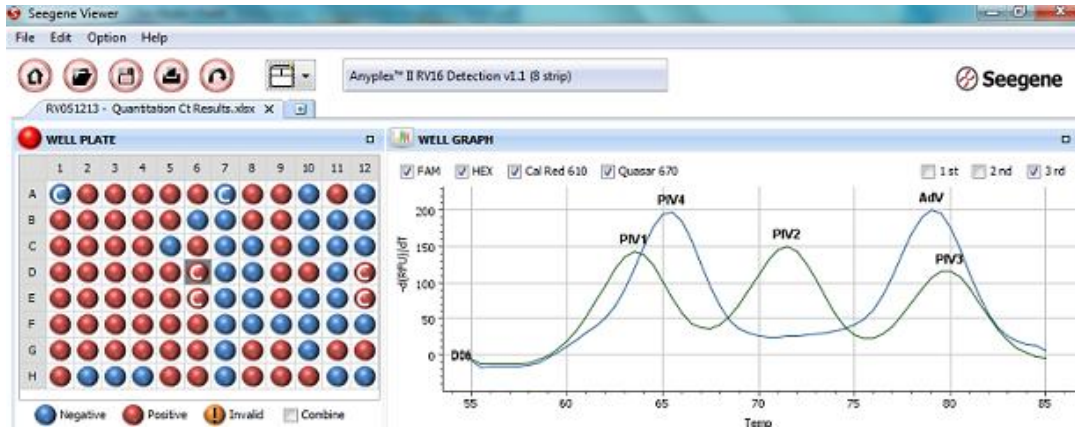


Figura 13. Visualización de resultados mediante el software Seegene Viewer.

5.5. Cálculo de los indicadores estadísticos básicos para evaluación de prueba diagnóstica

Una vez que se obtuvieron los resultados con cada una de las técnicas empleadas, se realizaron tablas de contingencia de dos categorías para calcular los datos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, que son los indicadores estadísticos que evalúan el grado de eficacia inherente a una prueba diagnóstica

Una tabla de contingencia de dos categorías o también llamada tabla de 2X2, permite comparar el método a evaluar o validar, con respecto a un método de referencia o confirmatorio, diferenciando a las muestras en positivo y/o negativo. A partir de esta tabla se calculan los cuatro parámetros básicos anteriormente mencionados.

Estándar de Oro

Para la construcción de la tabla de contingencia y del análisis de virus respiratorios detectados por hospital, se considero a un constructo como estándar de oro para ambas técnicas, el cual fue formado con:

1. Los resultados de las muestras en las cuales ambas técnicas fueron concordantes.
2. Los resultados obtenidos de 63 muestras que fueron secuenciadas por presentar discrepancia entre las técnicas empleadas.

A continuación se definen los parámetros calculados:

Sensibilidad. Capacidad de una prueba de identificar correctamente a aquellos individuos que tienen la enfermedad (o característica) de interés. Habilidad de una prueba tamiz de detectar muestras positivas cuando realmente son positivas.⁷⁰

Especificidad. Capacidad de una prueba de identificar correctamente a aquellos individuos que no tienen la enfermedad (o característica) de interés. Habilidad de una prueba tamiz de detectar muestras negativas cuando son realmente negativas.⁷⁰

Valor Predictivo Positivo. Se enuncia como la capacidad que tiene una prueba, cuando es positiva, de predecir que el paciente tiene la enfermedad.⁷¹

Valor Predictivo negativo: Es la capacidad de una prueba diagnóstica, cuando es negativa, de predecir que el paciente no tiene la enfermedad.⁷¹

Las fórmulas empleadas para determinar dichos parámetros son:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

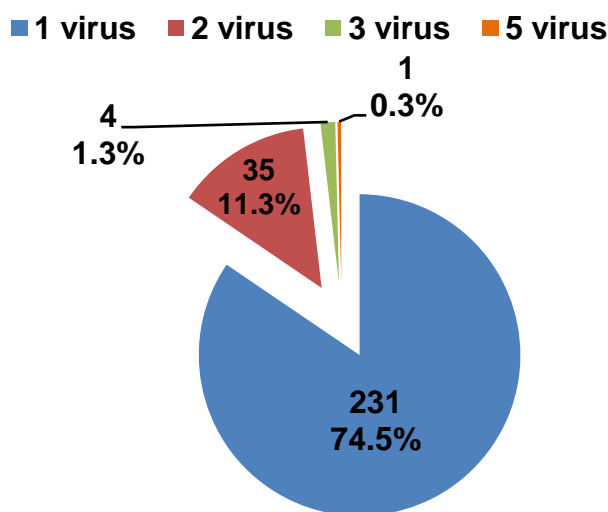
$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

6. RESULTADOS

6.1. Frecuencia de virus respiratorios

6.1.1. Resultado de virus respiratorios mediante el Estándar de oro

Se analizaron 310 muestras por ambos métodos, en 271 (87.4%) se detectó la presencia de patógenos virales respiratorios. Un solo virus fue detectado en 231 muestras (74.5%, 231/310) y más de uno, en 40 muestras (12.9%) (Véase Figura 14). Anyplex™ RV16 fue la única técnica que detectó 5 virus en una muestra.



No. total de muestra= 310 (100%)

Figura 14. Distribución de virus respiratorios en muestras.

Los virus más frecuentes detectados fueron: VSR A representando el 44.2% (137/310) del total de muestras, RV/EV (22.9%, 71/310), PIV (8.1%, 25/310) y AdV (7.4%, 23/310). Tabla No. 11.

Este estudio, los virus más frecuentes en co-infección con otros agentes infecciosos fueron el VSR A (9.1%, 28/310) y RV/EV (7.7%, 24/310), así como AdV (3.2%, 10/310), HBoV e INF A (2.3%, 7/310). Tabla No. 11.

Tabla No.11. Distribución de virus respiratorios en muestras.

Virus blanco	Subtipo	EN COINFECCIÓN DE				Total de muestras (%)
		Individuales (%)	2 virus (%)	3 virus (%)	5 virus (%)	
VSR	A	109 (35.2)	23 (7.4)	4 (1.3)	1(0.3)	137 (44.2)
	B	6 (1.9)	1 (0.3)			7 (2.3)
RV/EV		47 (15.2)	19 (6.1)	4 (1.3)	1(0.3)	71 (22.9)
PIV	1	5 (1.6)	1(0.3)			6 (1.9)
	2	3 (0.9)	1(0.3)			4 (1.3)
	3	7 (2.3)	1(0.3)			8 (2.6)
	4	7 (2.3)				7 (2.3)
AdV		13 (4.2)	7 (2.3)	2(0.6)	1(0.3)	23 (7.4)
INF	A	11(3.6)	6 (1.9)		1(0.3)	18 (5.8)
	B	3 (0.9)				3 (0.9)
MPV		9 (2.9)	3 (0.9)			12 (3.9)
CoV	229E/NL63	7 (2.3)	2 (0.6)			9 (2.9)
	OC43/HKU1	2 (0.6)	2 (0.6)			4 (1.3)
HBoV		2 (0.6)	4 (1.3)	2(0.6)	1(0.3)	9 (2.9)
Total		231(74.5)	35 (11.3)	4 (1.3)	1 (0.3)	310 (100%)
		271 muestras positivas (87.4 %)				

En el análisis realizado de manera independiente para cada método, se encontró que de las 310 muestras analizadas, 243 (78.4%) y 246 (79.4%) resultaron positivas por xTAG y Anyplex RV16, respectivamente. De dichas muestras, RV16 detectó la presencia de 354 virus respiratorios, mientras que xTAG detectó 298 virus respiratorios.

6.1.2. Resultado de virus respiratorios mediante Anyplex RV16

Un solo virus fue detectado en 159 muestras (51.3%, 159/310) y más de uno, en 87 muestras (28.1%, 87/310). RV16 tuvo la capacidad de detectar hasta 5 virus respiratorios en una muestra. Véase Figura 15.

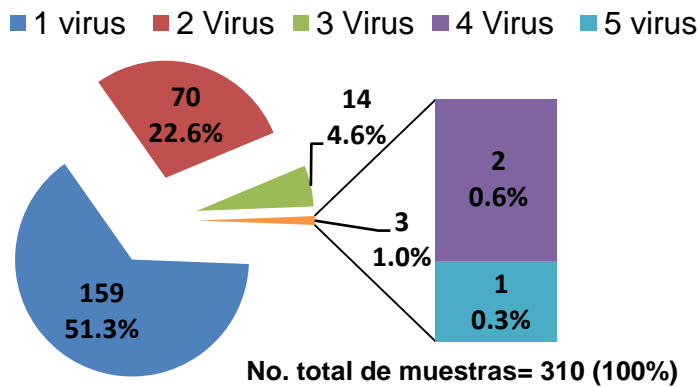


Figura 15. Distribución de virus respiratorios detectados en las muestras por RV16.

Los virus más frecuentes detectados fueron: VSR A con 49.3% (153/310), RV (20.3%, 63/310), AdV (12.6%, 39/310), CoV (7.1%, 22/310) y PIV (6.8%, 21/310).
Tabla No. 12.

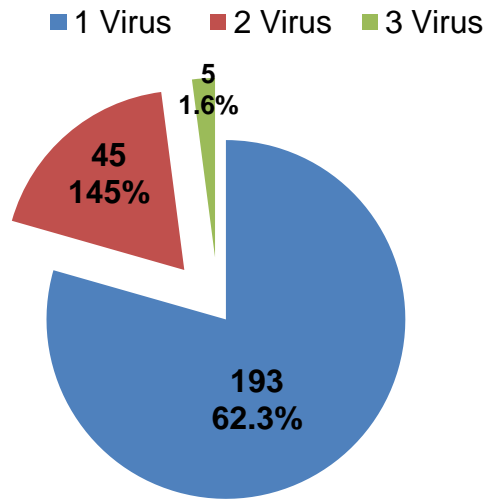
Como se menciona anteriormente, RV16 pudo detectar hasta 5 virus respiratorios en una muestra, siendo estos VSR A, RV, AdV, INF A y HBoV. De hecho, estos virus fueron los más frecuentes en co-infección representando el 20.3% (63/310), 13.2% (41/310), 9.1% (28/310) y 3.8% (12/310, HBOV e INF A) del total de muestras, respectivamente. Tabla No. 12.

Tabla No 12. Distribución de virus respiratorios en muestras pediátricas nasofaríngeas por RV16.

Virus blanco	Subtipo	Sin co-infección (%)	EN CO-INFECCIÓN DE				No. Total de muestras (%)
			2 Virus (%)	3 Virus (%)	4 Virus (%)	5 Virus (%)	
VSR	A	90 (29.0)	49 (15.8)	12 (3.9)	1 (0.3)	1 (0.3)	153 (49.3)
	B	4(1.3)	1 (0.3)				5 (1.6)
RV		22(7.1)	29 (9.4)	9 (2.9)	2 (0.6)	1 (0.3)	63 (20.3)
INF	A	7 (2.3)	8 (2.6)	2 (0.6)	1 (0.3)	1 (0.3)	19 (6.1)
	B	1 (0.3)	2 (0.6)				3 (0.9)
AdV		11 (3.5)	20 (6.5)	7 (2.3)		1 (0.3)	39 (12.6)
MpV		7(2.3)	3 (0.9)				10 (3.2)
CoV	229E		4 (1.3)	2 (0.6)			6 (1.9)
	NL63	2 (0.6)	4 (1.3)	2 (0.6)	1 (0.3)		9 (2.9)
	OC43	1 (0.3)	6 (1.7)				7 (2.3)
PIV	1	2 (0.6)	3 (0.9)				5 (1.6)
	2		1 (0.3)	1 (0.3)			2 (0.6)
	3	5 (1.6)		1 (0.3)	1 (0.3)		7 (2.3)
	4	5 (1.6)	2 (0.6)				7 (2.3)
HBoV		2 (0.6)	5 (1.6)	5 (1.6)	1 (0.3)	1 (0.3)	14 (4.6)
EV			3 (0.9)	1 (0.3)	1 (0.3)		5 (1.6)
Total (%)		159 (51.3)	70 (22.6)	14 (4.6)	2 (0.6)	1 (0.3)	310(100.0)
246 muestras positivas (79.4%)							

6.1.3. Resultado de virus respiratorios mediante xTAG RVP

Un solo virus fue detectado en 193 muestras (62.3%, 193/310) y más de uno, en 50 muestras (16.1%, 50/310). xTAG RVP tuvo la capacidad de detectar hasta 3 virus respiratorios en 5 muestras. Véase Figura 16.



No. total de muestras= 310 (100%)

Figura 16. Distribución de virus respiratorios detectados en las muestras por xTAG RVP.

Los virus más frecuentes detectados fueron: VSR A (31.5%, 98/310), RV/EV (30.6%, 95/310), PIV (10.6%, 33/310), MpV (6.5%, 20/310) y CoV (5.7%, 18/310).

Tabla No. 13.

RV/EV fue el virus más frecuente detectado en co-infección con otros agentes virales representando el 11.5% (36/310) del total de muestras, así como el VSR A y los CoV con el 8.0 (25/310) y 5.0% (16/310), respectivamente. Tabla No. 13.

Tabla No. 13. Distribución de virus respiratorios en muestras pediátricas nasofaríngeas por xTAG RVP.

Virus blanco	Subtipo	Sin co-infección (%)	EN CO-INFECCIÓN DE		No. Total de muestras (%)
			2 virus (%)	3 virus (%)	
VSR	A	73 (23.5)	23 (7.4)	2 (0.6)	98 (31.5)
	B	6 (1.9)	2 (0.6)		8 (2.6)
RV/EV		59 (19.0)	33 (10.6)	3 (0.9)	95 (30.6)
INF A	H3	5 (1.6)	1 (0.3)		6 (1.9)
	Indefinido	3 (0.9)	2 (0.6)		5 (1.6)
INF	B	3 (0.9)			3 (0.9)
AdV	-	6 (1.9)	4 (1.3)	2 (0.6)	12 (3.9)
MpV	-	14 (4.6)	5 (1.6)	1 (0.3)	20 (6.5)
CoV	229E		4 (1.3)	2 (0.6)	6 (1.9)
	NL63	1 (0.3)	5 (1.6)	3 (0.9)	9 (2.9)
	OC43	1 (0.3)	1 (0.3)		2 (0.6)
	HKUI			1 (0.3)	1 (0.3)
PIV	1	6 (1.9)	2 (0.6)		8 (2.6)
	2	3 (0.9)	1 (0.3)	1 (0.3)	5 (1.6)
	3	7 (2.3)	3 (0.9)		10 (3.2)
	4	6 (1.9)	4 (1.3)		10 (3.2)
Total (%)		193 (2.3)	45 (14.5)	5 (1.6)	310 (100.0)
		243 muestras positivas (78.4%)			

6.1.4. Resultado de virus respiratorios por hospital

En un análisis adicional, se encontró que las muestras procedentes del Hospital Central Ignacio Morones Prieto de San Luis Potosí y del Hospital Civil de Guadalajara “Dr. Juan I Menchaca”, presentaron el mayor porcentaje de VSR A (18.4% y 10.6%, respectivamente) del total de muestras. Las muestras del Hospital de San Luis Potosí también presentaron, junto con las del estado de Durango, el mayor porcentaje de RV/EV (6.1%, respectivamente). Cabe destacar, que las muestras procedentes del hospital del estado de Durango, fueron las únicas en las que se detectó la presencia de HBoV (sólo por Anyplex RV16) y las que presentaron el mayor porcentaje de AdV (3.2%, 10/ 310).Tabla No. 14.

Tabla No. 14. Distribución de virus respiratorios en muestras pediátricas nasofaríngeas por hospital de procedencia, de acuerdo con el resultado del estándar de oro. **HPC** Hospital Pediátrico de Coyoacán; **HGM** Hospital General de México; **HCG** Hospital Civil de Guadalajara “Dr. Juan I Menchaca”; **HSLP** Hospital Central Ignacio Morones Prieto de San Luis Potosí; **HC** Hospital Regional Universitario de los Servicios de Salud del Estado de Colima; **HD** Hospital General de Zona No 1, IMSS. Durango.

		HOSPITAL						
Virus	Subtipo	HPC	HGM	HCG	HSLP	HC	HD	Total (%)
VSR	A	8 (2.6)	4 (1.3)	33 (10.6)	57 (18.4)	17 (5.5)	18 (5.8)	137 (44.2)
	B	1 (0.3)		3 (0.9)		3 (0.9)		7 (2.3)
RV/EV		4 (1.3)	3 (0.9)	12 (3.9)	19 (6.1)	14 (4.5)	19 (6.1)	71 (22.9)
INF	A	1 (0.3)		7 (2.3)		5 (1.6)	5 (1.6)	18 (5.8)
	B		1 (0.3)	2 (0.6)				3 (0.9)
AdV		1 (0.3)	1 (0.3)	4 (1.3)	3 (0.9)	4 (1.3)	10 (3.2)	23 (7.4)
MpV		3 (0.9)		3 (0.9)	2 (0.6)	2 (0.6)	2 (0.6)	12 (3.9)
CoV	229E			1 (0.3)			1 (0.3)	2 (0.6)
	NL63			1 (0.3)	3 (0.9)		3 (0.9)	7 (2.3)
	OC4			1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)		3 (0.9)
	HKUI				1 (0.3)			1 (0.3)
PIV	1		1 (0.3)		3 (0.9)		2 (0.6)	6 (1.9)
	2	1 (0.3)	1 (0.3)		1 (0.3)	1 (0.3)		4 (1.3)
	3	1 (0.3)	2 (0.6)			3 (0.9)	2 (0.6)	8 (2.6)
	4		1(0.3)	1 (0.3)	2 (0.6)	2 (0.6)	1(0.3)	7 (2.3)
HBoV						9 (2.9)	9 (2.9)	
Total (%)		28 (9.0)	13 (4.2)	68 (21.9)	87 (28.1)	56 (18.1)	58 (18.7)	310 (100)

6.2. Comparación de métodos

6.2.1. Descripción de resultados de virus respiratorios por método

Al realizar el comparativo de los virus detectados por cada método, es notable la diferencia numérica en la detección de VSR A, RV/EV, AdV y MpV entre los métodos; así como de las muestras co-infectadas, siendo RV16 el método que detectó mayor número de muestras de este tipo. Tabla No. 15

Tabla No. 15. Comparativo de virus respiratorios detectados por cada método en muestras pediátricas nasofaríngeas.

Virus blanco	Subtipo	Anyplex RV16 (%)	xTAG RVP (%)
VSR	A	153 (49.3)	98 (31.5)
	B	5 (1.6)	8 (2.6)
RV/EV		68 (21.9)	95 (30.6)
INF	A	19 (6.1)	11(3.5)
	B	3 (0.9)	3 (0.9)
AdV	-----	39 (12.6)	12 (3.9)
MpV		10 (3.2)	20 (6.5)
CoV	229E	6 (1.9)	6 (1.9)
	NL63	9 (2.9)	9 (2.9)
	OC43	7 (2.3)	2 (0.6)
	HKUI	-----	1 (0.3)
PIV	1	5 (1.6)	8 (2.6)
	2	2 (0.6)	5 (1.6)
	3	7 (2.3)	10 (3.2)
	4	7 (2.3)	10 (3.2)
HBoV	-----	14 (4.6)	-----
No. total de virus detectados		354	298
No. total de muestras con co-infecciones		87	50
310 muestras analizadas (100%)			

6.2.2. Correlación de resultados

La correlación de resultados se realizó con la totalidad de muestras analizadas (n=310). Se determinó la proporción en porcentaje de los valores obtenidos de verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN) al comparar cada método de detección de virus respiratorios con el estándar de oro establecido (véase Figura 17).

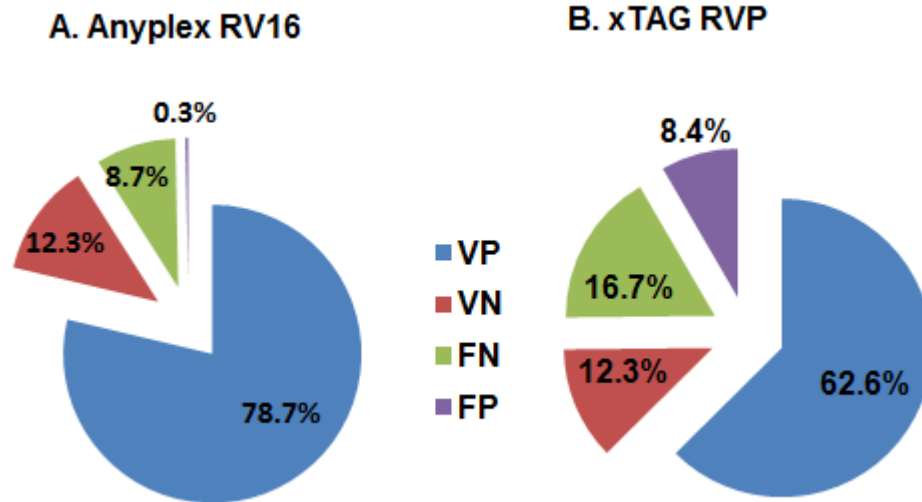


Figura 17. Representación gráfica de la proporción de los valores de VP, VN, FP y FN al comparar los métodos de detección de virus respiratorios con el estándar de oro establecido. A. Método Anyplex RV16. B. Método xTAG RVP. Obsérvese que el porcentaje de FP es mayor por xTAG, lo que da un indicio de una sensibilidad baja .VP: Verdaderos positivos, VN: Verdaderos negativos, FP: Falsos positivos y FN: Falsos negativos.

A continuación se presentan las tablas de contingencia 2X2 de los métodos evaluados:

Tabla No. 16. Tabla de contingencia 2X2 de la técnica de PCR multiplex para la detección de virus respiratorios Anyplex RV16.

	Estándar de Oro			Total
		+	-	
Método a evaluar Anyplex RV16	+	VP 244	FP 1	245
	-	FN 27	VN 38	65
Total		271	39	310

Tabla No. 17. Tabla de contingencia 2X de la técnica de PCR multiplex para la detección de virus respiratorios xTAG RVP.

	Estándar de oro			Total
		+	-	
Método a evaluar xTAG RVP	+	VP 194	FP 26	220
	-	FN 52	VN 38	90
Total		246	64	310

Posteriormente se determinaron los parámetros de desempeño: sensibilidad y especificidad de cada método, así como los valores predictivos tanto positivo como negativo (Tabla No.18).

Tabla No. 18. Indicadores estadísticos básicos de los métodos analizados.

Parámetro	Anyplex RV16	xTAG RVP
Sensibilidad	90.0 %	78.9 %
Especificidad	97.4 %	59.4 %
Valor predictivo positivo	99.6 %	88.2 %
Valor predictivo negativo	58.5 %	8.4 %

6.2.3. Sensibilidad y especificidad.

La sensibilidad y especificidad fue calculada para cada blanco de acuerdo a lo establecido por el estándar de oro (Tabla No. 19). Algunos blancos virales fueron agrupados para llevar a cabo el análisis de sensibilidad y especificidad (p. ej. rinovirus/enterovirus y los coronavirus).

La tabla No. 19 muestra que RV16 fue más sensible que xTAG para AdV [100% (23/23) contra 52.2.% (12/23)], INF A [83.3% (15/18) contra 53.3% (8/15)], RSV A [97.8% (134/137) contra 69.6% (94/135)] y CoV OC43/HUKI [(100% (4/4) contra 50.0% (2/4)] pero menos sensible para los PIV [80.0% (20/25) contra 95.0% (19/20)], RSV B [71.4% (5/7) contra 80.0% (4/5)], RV/EV [83.1% (59/71) contra 86.9% (53/61) y MpV [83.3% (10/12) contra 90.0% (9/10)].

En cuanto a la especificidad, cabe destacar, que si bien, RV16 tiene baja sensibilidad para MpV comparada con xTAG, la especificidad del primero es mayor con respecto al segundo (100.0% contra 96.0%). RV16 presentó alta especificidad para la mayoría de virus respiratorios, mientras que xTAG tuvo importantes variaciones de este parámetro.

Tabla No. 19. Porcentaje de sensibilidad y especificidad de dos métodos de PCR múltiple para la detección e identificación de virus respiratorios.

Virus	Anyplex RV16		xTAG RVP	
	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
AdV	100.0	94.6	52.2	100.0
INF A	83.3	98.7	53.3	98.9
INF B	100.0	100.0	100.0	100.0
PIV1	83.3	100.0	100.0	98.9
PIV2	50.0	100.0	100.0	98.9
PIV3	87.5	100.0	100.0	98.9
PIV4	85.7	99.7	83.3	98.2
RV/EV	83.1	96.5	86.9	81.9
RSVA	97.8	89.7	69.6	97.9
RSVB	71.4	100.0	80.0	98.6
MpV	83.3	100.0	90.0	96.0
CoV 229E/NL63	100.0	98.1	100.0	97.8
CoV OC43/HKU1	100.0	99.0	50.0	99.6
HBoV	100.0	98.4		

7. DISCUSIÓN

La detección de virus respiratorios por PCR múltiple ha sido descrita como una importante herramienta para la identificación de patógenos en infecciones del tracto respiratorio^{53,59}. Este estudio compara la capacidad de detección e identificación de virus respiratorios de Anyplex RV16 contra xTAG RVP.

El método de RV16 presentó una mayor sensibilidad (90.0%) y especificidad (97.4%) con respecto a xTAG (78.9% y 59.4%, respectivamente). Aunado a estos resultados, se observaron altos valores predictivos positivos y negativos (Tabla No. 18). Los resultados obtenidos son un indicativo de la eficiencia del método RV16 como prueba diagnóstica.

Particularmente, ambos métodos mostraron alta sensibilidad y especificidad para INF B, CoV 229E y NL63 (Tabla No.19). Sin embargo, hay notable variabilidad en la detección de AdV y CoV OC43/HKUI. RV16 presenta una muy alta sensibilidad para cada uno (100%), mientras que xTAG presentó una sensibilidad baja (52.2% y 50.0%, respectivamente). Un estudio publicado en el año 2011, el cual evaluó estuches comerciales múltiples de diagnóstico de virus respiratorios⁷², reportó la sensibilidad de xTAG para estos coronavirus en 48.1%, mientras que otro estudio publicado en el 2013⁶⁷, reportó una sensibilidad de 26.1%; ambos reportes ponen de manifiesto la baja capacidad de detección de CoV OC43/HKUI por xTAG, por tanto, los resultados obtenidos en este estudio son concordantes con lo ya reportado.

En este estudio, la sensibilidad de detección de AdV por RV16 es superior a la de xTAG en aproximadamente un 48%. *Popowitch y colaboradores*⁷³ reportan la disminución en la detección de AdV especie C (serotipo 1, 2, 5 y 6), serotipo 7A (especie B) y serotipo 41 (especie F) por xTAG RVP, y observan una notable pérdida de detección de los serotipos 1,3 y 5. Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con la disminución y pérdida en la detección de serotipos de AdV por xTAG y reflejan la variación en la cobertura de los tipos serológicos de AdV que tiene cada método.

En el caso específico del VSR A, RV16 muestra una superioridad del 28% en la sensibilidad de detección comparada con XTAG. Varios estudios, que comparan métodos moleculares de detección viral múltiple, han mostrado valores similares a los obtenidos en este estudio, en donde la capacidad de detección de xTAG RVP para este paramyxovirus es baja, rondando entre el 60 y 87% como máximo reportado y para RV16 entre el 98 y 100% ^{66-67,72-74}.

RV16 presentó baja sensibilidad comparada con xTAG para RV (83.1% contra 86.9%). El uso de blancos específicos para cada género de picornavirus fuera de la región 5' no codificante (5' UTR) puede comprometer la sensibilidad de detección, especialmente de los rinovirus, debido a que se sabe que es una región altamente conservada de cualquiera de los RV y EV, la cual también puede amplificar miembros de otros géneros ^{67,72}. Por esta razón, XTAG combina a los RV y EV como un solo blanco. RV16 diferencia entre RV y EV, lo que puede explicar su reducida sensibilidad. El análisis realizado en este estudio sugiere que RV16 presenta reactividad cruzada en la detección de estos virus por la ocurrencia de que el 80% de las muestras positivas para EV (4/5) son positivas también para RV.

El significado clínico de distinguir RV y EV no está bien definido. Sin embargo, el diagnóstico específico de virus respiratorios es de considerable importancia con el fin de entender la epidemiología y la patogénesis de la infección viral del tracto respiratorio ⁵³. Los RV están siendo re-evaluados como importantes agentes de IRA ^{16,75}, por lo que una alta capacidad de detección por cualquier método diagnóstico es sumamente importante. RV16 ha mostrado baja sensibilidad para la detección de la especie C de RV, la cual podría estar asociada con más enfermedades del tracto respiratorio que los RV A y B ⁶⁷. Considerando lo anterior y los resultados obtenidos en este estudio, la sensibilidad del método RV16 debe ser mejorada.

En este estudio, se detectó en 40 muestras (12.9%) la presencia de más de un virus respiratorio (Véase Figura 14), siendo el VSR A y RV/EV los virus más comúnmente asociados con infecciones por agentes múltiples (Tabla No.11). La

capacidad de RV16 para detectar co-infecciones fue superior a la de xTAG; el primero pudo detectar hasta 5 virus en una muestra, mientras que el segundo un máximo de 3 virus. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros estudios⁷⁶⁻⁷⁷, en donde xTAG presenta poca capacidad para detectar co-infecciones. El significado clínico de las co-detecciones virales aún no está claro y sigue siendo tema de discusión si confiere o no mayor gravedad a los cuadros respiratorios en los que se detecta⁷⁸⁻⁸⁰.

Una ventaja notable de RV16 frente a xTAG RVP es que puede detectar a HBoV. El HBoV es un virus que ha sido descrito como un virus respiratorio, aunque su papel en la enfermedad aún no está muy claro, frecuentemente es co-detectado con otros virus causantes de infecciones en el tracto respiratorio^{9,16,50}. En este estudio, el 77.7% de los HBoV detectados se encuentran en co-infección con otros virus, siendo estos RV/EV, RSV A, AdV, PIV 3 y CoV.

Además de la sensibilidad y la especificidad, la facilidad de uso y el tiempo requerido, son factores importantes a considerar cuando se elige un ensayo de PCR múltiple para la detección e identificación de patógenos. xTAG requiere entre 8 y 10 horas de trabajo (4 a 5 días si el procedimiento no se realiza de manera continua), cinco pasos distintivos de preparación de reactivos, diferentes programas de termociclado, varias enzimas y reactivos^{55,67,72}. En contraste, RV16 requiere de menos tiempo y trabajo (6 a 8 horas: de 3 a 4 horas para la extracción y transcripción inversa de RNA y DNA, y de 3 a 4 h para la PCR).

Finalmente, hay una notable diferencia en el costo de los estuches de cada método. El estuche de RV16 para 50 pruebas, tiene un costo aproximado de \$36,370 MXN. Para procesar 96 muestras se requiere de dos estuches, lo que equivale a un total aproximado de \$ 72,740 MXN. El estuche de xTAG RVPv1 para 96 pruebas, tiene un costo de \$200,180 MXN, al que además, se le debe sumar el costo de otros reactivos necesarios que no incluye el estuche. Sin duda, el costo de los métodos de diagnóstico para cualquier patógeno, es un factor de suma importancia para los laboratorios clínicos, sobretodo del sector público, que en

muchas ocasiones no cuentan con los recursos necesarios para adquirirlos. Así pues, es apreciable un método con alta eficacia y baja costo.

8. CONCLUSIONES

- El método de PCR múltiple en tiempo real Anyplex™RV16, en general tiene una sensibilidad (90% vs 78.9%) y especificidad (97.4% vs 59.4%) superior a la de xTAG™RVP, para el diagnóstico de virus respiratorios.
- La sensibilidad de detección para RV/EV por RV16 necesita ser mejorada.
- RV16 presenta mayor capacidad para la detección de múltiples virus (más de 4) en una sola muestra, comparado con xTAG (≤ 3 virus/muestra).
- Anyplex RV16 requiere de menor tiempo para la detección e identificación de virus respiratorios y además, su metodología es sencilla. El costo del escuche comercial es 5 veces menor que el de xTAG.
- Los virus respiratorios más comúnmente detectados en 310 muestras de lavados nasofaríngeos de niños menores de 5 años con diagnóstico clínico y/o radiológico de neumonía de varios centros hospitalarios de México fueron: VSR A (44.2%), RV/EV (22.9%), PIV (8.1%), AdV (7.4%) e INF A (5.8%).

9. REFERENCIAS

1. Robaina Suárez, G. & Campillo Molieva, R. Morbilidad y manejo de infecciones respiratorias agudas en menores de 5 años. *Revista Cubana de Pediatría* **75**, 0-0 (2003).
2. Valero, N., *et al.* Etiología viral de las infecciones respiratorias agudas. *Investigación Clínica* **50**, 359-368 (2009).
3. Grief, S.N. Upper respiratory infections. *Prim Care* **40**, 757-770 (2013).
4. Heikkinen, T. & Jarvinen, A. The common cold. *Lancet* **361**, 51-59 (2003).
5. Piñeiro Pérez, R., *et al.* Documento de consenso sobre el diagnóstico y tratamiento de la faringoamigdalitis aguda. *Anales de Pediatría* **75**, 342.e341-342.e313 (2011).
6. Mandell, G.L., Dolin, R. & Bennett, J.E. *Mandell, Douglas y Bennet: Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*, (Elsevier Health Sciences Spain, 2011).
7. *Harrison, principios de medicina interna*, (México etc., McGraw-Hill Interamericana, 2008).
8. Brook, I. Acute sinusitis in children. *Pediatr Clin North Am* **60**, 409-424 (2013).
9. Verma, N., Lodha, R. & Kabra, S.K. Recent advances in management of bronchiolitis. *Indian Pediatr* **50**, 939-949 (2013).
10. Alcon, A., Fabregas, N. & Torres, A. Pathophysiology of pneumonia. *Clin Chest Med* **26**, 39-46 (2005).
11. OMS. Vol. 2014 (2012).
12. Almasri, M., Papa, A., Souliou, E., Haidopoulou, K. & Eboriadou, M. Respiratory syncytial virus infection in hospitalized children older than 2 years with community-acquired pneumonia. *Hippokratia* **17**, 146-149 (2013).
13. AEP. Asociación Española de Pediatría: Protocolos de Infectología (Infecciones respiratorias virales). (2014).
14. OMS. Enfermedades respiratorias crónicas: Asma. Vol. 2014 (2011).
15. Nantanda, R., Tumwine, J.K., Ndeezi, G. & Ostergaard, M.S. Asthma and pneumonia among children less than five years with acute respiratory symptoms in Mulago Hospital, Uganda: evidence of under-diagnosis of asthma. *PLoS One* **8**, e81562 (2013).
16. Tsukagoshi, H., Ishioka, T., Noda, M., Kozawa, K. & Kimura, H. Molecular epidemiology of respiratory viruses in virus-induced asthma. *Front Microbiol* **4**, 278 (2013).
17. Fujitsuka, A., *et al.* A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infect Dis* **11**, 168 (2011).
18. Grissell, T.V., *et al.* Interleukin-10 gene expression in acute virus-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **172**, 433-439 (2005).
19. OMS. Vol. 2014 (2009).
20. DGE. Información Epidemiológica. Vol. 2014 (ed. Salud, D.G.d.E.S.d.) (Dirección General de Epidemiología. Secretaria de Salud, 2014).
21. DGIS-SINAIS. Vol. 2014 (Dirección General de Información en Salud, Sistema Nacional de Información en Salud).
22. Do, A.H.L., *et al.* Viral Etiologies of Acute Respiratory Infections among Hospitalized Vietnamese Children in Ho Chi Minh City, 2004–2008. *PLoS One* **6**, e18176 (2011).
23. Knipe, D.M. & Howley, P.M. *Fields Virology*, (LiWolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007).
24. Gan, S.W., *et al.* The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *J Biol Chem* **287**, 24671-24689 (2012).

25. Collins, P.L., Fearn, R. & Graham, B.S. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **372**, 3-38 (2013).
26. UNAM. Infecciones respiratorias en niños: Virus Sincitial Respiratorio (RSV). Vol. 2014.
27. USC & IPN. VIROLOGÍA – CAPÍTULO DIECISÉIS:VIRUS DE LA PARAINFLUENZA, SINCICIAL RESPIRATORIO Y ADENOVIRUS. (2010).
28. Ciencewicky, J.M., *et al.* A genetic model of differential susceptibility to human respiratory syncytial virus (RSV) infection. *FASEB J* (2014).
29. Nair, H., *et al.* Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **375**, 1545-1555 (2010).
30. Henderson, J., *et al.* Hospitalization for RSV bronchiolitis before 12 months of age and subsequent asthma, atopy and wheeze: a longitudinal birth cohort study. *Pediatr Allergy Immunol* **16**, 386-392 (2005).
31. Sigurs, N., *et al.* Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 137-141 (2005).
32. Kahn, J.S. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev* **19**, 546-557 (2006).
33. Principi, N. & Esposito, S. Paediatric human metapneumovirus infection: Epidemiology, prevention and therapy. *J Clin Virol* (2014).
34. Williams, J.V., Tollefson, S.J., Nair, S. & Chonmaitree, T. Association of human metapneumovirus with acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **70**, 1189-1193 (2006).
35. Hermos, C.R., Vargas, S.O. & McAdam, A.J. Human metapneumovirus. *Clin Lab Med* **30**, 131-148 (2010).
36. Waman, V.P., Kolekar, P.S., Kale, M.M. & Kulkarni-Kale, U. Population Structure and Evolution of *Rhinoviruses*. *PLoS One* **9**, e88981 (2014).
37. Wang, L. & Smith, D.L. Capsid structure and dynamics of a human rhinovirus probed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Protein Sci* **14**, 1661-1672 (2005).
38. Zhao, R., *et al.* Human rhinovirus 3 at 3.0 Å resolution. *Structure* **4**, 1205-1220 (1996).
39. Verdaguier, N., Blaas, D. & Fita, I. Structure of human rhinovirus serotype 2 (HRV2). *J Mol Biol* **300**, 1179-1194 (2000).
40. Jacobs, S.E., Lamson, D.M., St George, K. & Walsh, T.J. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev* **26**, 135-162 (2013).
41. Andreoletti, L., Renois, F., Jacques, J. & Leveque, N. [Human enteroviruses and respiratory infections]. *Med Sci (Paris)* **25**, 921-930 (2009).
42. Jacques, J., *et al.* Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005. *J Clin Microbiol* **46**, 206-213 (2008).
43. OMS. (2014).
44. UNAM. INFLUENZA, INFLUENZA A (H1N1), INFLUENZA A (H7N9). Vol. 2014 (ed. Parasitología, F.d.M.D.d.M.y.) (2013).
45. Dominguez, O., Rojo, P., de Las Heras, S., Folgueira, D. & Contreras, J.R. Clinical presentation and characteristics of pharyngeal adenovirus infections. *Pediatr Infect Dis J* **24**, 733-734 (2005).
46. Perlman, S. & Dandekar, A.A. Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nat Rev Immunol* **5**, 917-927 (2005).
47. Allander, T., *et al.* Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12891-12896 (2005).

48. Gurda, B.L., *et al.* Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae. *J Virol* **84**, 5880-5889 (2010).
49. Moreno M, C., Solís O, Y. & O`Ryan G, M. Bocavirus humano: Estudios en la literatura médica y en Chile. *Revista chilena de infectología* **26**, 504-510 (2009).
50. Allander, T. Human bocavirus. *J Clin Virol* **41**, 29-33 (2008).
51. Rihkanen, H., *et al.* Respiratory viruses in laryngeal croup of young children. *J Pediatr* **152**, 661-665 (2008).
52. Tregoning, J.S. & Schwarze, J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev* **23**, 74-98 (2010).
53. Mahony, J.B. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* **21**, 716-747 (2008).
54. SEIMC. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Documentos científicos. (2014).
55. Ginocchio, C.C. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. *J Clin Virol* **40 Suppl 1**, S11-14 (2007).
56. Mullis, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* **262**, 56-61, 64-55 (1990).
57. Saiki, R.K., *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988).
58. Tamay-de-Dios, L., Ibarra, C. & Velasquillo, C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* **2**, 70-78 (2013).
59. Jartti, T., Soderlund-Venermo, M., Hedman, K., Ruuskanen, O. & Makela, M.J. New molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract infections in children. *Paediatr Respir Rev* **14**, 38-45 (2013).
60. Templeton, K.E., Scheltinga, S.A., Beersma, M.F., Kroes, A.C. & Claas, E.C. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* **42**, 1564-1569 (2004).
61. Grassi, G., *et al.* A rapid procedure for the quantitation of low abundance RNAs by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **22**, 4547-4549 (1994).
62. Ginocchio, C.C. Strengths and weaknesses of FDA-approved/cleared diagnostic devices for the molecular detection of respiratory pathogens. *Clin Infect Dis* **52 Suppl 4**, S312-325 (2011).
63. Merante, F., Yaghoubian, S. & Janeczko, R. Principles of the xTAG respiratory viral panel assay (RVP Assay). *J Clin Virol* **40 Suppl 1**, S31-35 (2007).
64. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**, 1026-1030 (1993).
65. Anaya, J.-M.C.p.I.B. *Autoinmunidad y enfermedad autoinmune*, (Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, 2005).
66. Cho, C.H., *et al.* Evaluation of a novel real-time RT-PCR using TOCE technology compared with culture and Seeplex RV15 for simultaneous detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* **57**, 338-342 (2013).
67. Kim, H.K., Oh, S.H., Yun, K.A., Sung, H. & Kim, M.N. Comparison of Anyplex II RV16 with the xTAG respiratory viral panel and Seeplex RV15 for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* **51**, 1137-1141 (2013).
68. Seegene. (2014).

69. Seegene. Anyplex™ User Manual. Anyplex™ II RV16 Detection, for use with CFX96™ Real-time PCR System (Biorad)). (2012).
70. Szкло, M. & Nieto, F.J. *Epidemiología intermedia : conceptos y aplicaciones*, (Madrid Díaz de Santos, Madrid, 2003).
71. Álvarez-Martínez, H.E. & E, P.-C. Utilidad clínica de la tabla 2X2. *Revista de Evidencia e Investigación Clínica* **2**, 22-27 (2009).
72. Gharabaghi, F., Hawan, A., Drews, S.J. & Richardson, S.E. Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clin Microbiol Infect* **17**, 1900-1906 (2011).
73. Popowitch, E.B., O'Neill, S.S. & Miller, M.B. Comparison of the Biofire FilmArray RP, Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP fast multiplex assays for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* **51**, 1528-1533 (2013).
74. Babady, N.E., et al. Comparison of the Luminex xTAG RVP Fast assay and the Idaho Technology FilmArray RP assay for detection of respiratory viruses in pediatric patients at a cancer hospital. *J Clin Microbiol* **50**, 2282-2288 (2012).
75. Papadopoulos, N.G., Sanderson, G., Hunter, J. & Johnston, S.L. Rhinoviruses replicate effectively at lower airway temperatures. *Journal of Medical Virology* **58**, 100-104 (1999).
76. Dabisch-Ruthe, M., Vollmer, T., Adams, O., Knabbe, C. & Dreier, J. Comparison of three multiplex PCR assays for the detection of respiratory viral infections: evaluation of xTAG respiratory virus panel fast assay, RespiFinder 19 assay and RespiFinder SMART 22 assay. *BMC Infect Dis* **12**, 163 (2012).
77. Raymaekers, M., de Rijke, B., Pauli, I., Van den Abeele, A.M. & Cartuyvels, R. Timely diagnosis of respiratory tract infections: evaluation of the performance of the RespiFinder assay compared to the xTAG respiratory viral panel assay. *J Clin Virol* **52**, 314-316 (2011).
78. Martin, E.T., Kuypers, J., Wald, A. & Englund, J.A. Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children. *Influenza Other Respir Viruses* **6**, 71-77 (2012).
79. Peng, D., et al. Multipathogen infections in hospitalized children with acute respiratory infections. *Virology Journal* **6**(2009).
80. Richard, N., et al. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* **27**, 213-217 (2008).

ANEXO

Glosario

Cianosis: Es una coloración azulada de la piel, mucosas y lechos ungueales, usualmente debida a la presencia de concentraciones iguales o mayores a 5 g/dL de hemoglobina sin oxígeno en los vasos sanguíneos cerca de la superficie de la piel, o de pigmentos hemoglobínicos anómalos (metahemoglobina o sulfohemoglobina) en los hematíes o glóbulos rojos. Debido a que la cianosis depende de la cantidad y no de un porcentaje de hemoglobina desoxigenada, es mucho más fácil hallarla en estados con aumento en el volumen de glóbulos rojos (policitemia) que en aquellos casos con disminución en la masa eritrocitaria (anemia). Puede ser difícil de detectar en los pacientes con piel muy pigmentada.

Conjuntivitis: Inflamación de la conjuntiva, el tejido fino y transparente que cubre el interior del párpado y la parte blanca del ojo. Esta inflamación hace más visibles los vasos sanguíneos, lo que le da al ojo un color rosado o rojizo.

Disnea: Es la sensación de falta de aire o dificultad para respirar.

Estridor: Sonido agudo y anormal producido por el flujo de aire turbulento a través de una vía aérea obstruida parcialmente a nivel de la supraglotis, la glotis, subglotis y/o la tráquea. Es el resultado de la inflamación alrededor de las cuerdas vocales (laringe) y la tráquea (tráquea). Cuando el aire refluye del estridor a través de este conducto se reduce, las cuerdas vocales vibran con un ruido de ladridos.

Otalgia: Dolor de oído, que puede ser causado por algún tipo de afección en la articulación temporomandibular, en los dientes, la faringe o en el propio oído.

Otorrea: Secreción serosa, serosanguinolenta o purulenta procedente del conducto auditivo externo, y también de la caja del tambor cuando, a consecuencia de enfermedad, se ha perforado la membrana timpánica.

Rinorrea: Flujo o emisión abundante de líquido por la nariz, generalmente debido a un aumento de la secreción de mucosidad nasal.

Taquipnea: Aumento de la frecuencia respiratoria por encima de los valores normales (>20 inspiraciones por minuto).

Tiraje subcostal: Depresión o retracción de la parte inferior del tórax durante la inspiración, cuando en las personas sanas el tórax se produce una expansión.