



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DETECCIÓN MOLECULAR DE AGENTES
PATÓGENOS, EN PACIENTES ASOCIADOS A
INFECCIONES RESPIRATORIAS BAJAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE**

BIÓLOGO

PRESENTA

BRUNO EMILIO JIMÉNEZ BARBA

DIRECTOR: M en C. Mónica Sierra Martínez

ASESOR INTERNO: M en C. Alfonso Luna Vásquez



México, D.F. Mayo del 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**HAY DOS MANERAS DE VIVIR SU VIDA: UNA
COMO SI NADA FUERA UN MILAGRO, LA
OTRA COMO SI TODO ES UN MILAGRO.
(ALBERT EINSTEIN 1879-1955).**

DEDICATORIAS.

Este trabajo está dedicado a todas aquellas personas que han formado parte de mi vida, algunos nombres siguen presentes y otros que han salido de escena, pero que sin embargo e indudablemente me han hecho crecer como persona y me han forjado en la persona que soy hoy en día, pues no sería quien soy sin ellos, por ello repetiría cada momento nuevamente para llegar hasta aquí. Creo firmemente que cada persona que conocemos y cada situación por más fácil o difícil que parezca, siempre nos aportara más de lo que esperamos. La clave de cómo vivir cada momento radica en cómo decidamos mirar cada uno de esos momentos, pues ello marcará la forma en que caminaremos por esta tesis titulada;“VIDA”.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco primeramente a DIOS por que sin el nada hubiera sido posible; posteriormente, agradezco a los pilares de mi formación mis padres, abuelos y tíos que sin ellos llegar a este momento no hubiera sido posible, en tercer lugar estas mis hermanos quienes están presentes en cada logro alcanzado hasta el día de hoy y esperando poder ser un ejemplo para sus vidas en lo poco o mucho que puedo aportarles, en cuarto lugar se encuentran todas ellas personas que uno decide adoptar en la vida y que muchos de ellos son como hermanos, estos son mis amigos y personas íntimas que saben y han decidido compartir cada sueño contado y cada meta alcanzada, y por último, se encuentran esas personas que sin sus conocimientos y su guía sería imposible conquistar y soñar, ellos son mis padres académicos también llamados Maestros e increíbles personas que me infundieron sus conocimientos, para un día así como ellos, yo infundirlos sobre alguien mas siempre con el fin de mejorar cada día más como personas. A todos ellos muchas gracias por ser parte fundamental en mi vida.

INDICE.

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	2
2.1.	VIRUS.....	2
2.2.	Bacterias.....	7
2.2.1.	Estructuras de las bacterias.....	10
2.4.	Enfermedades asociadas al tracto respiratorio inferior	13
2.4.1.	Bronquitis.....	13
2.4.2.	Neumonía	15
2.5.	Epidemiología de las enfermedades respiratorias en México	16
2.6.	Reacción en cadena de la polimerasa o PCR punto final	16
2.7.	PCR tiempo real.....	17
2.8.	Técnicas de identificación microbiológica de las enfermedades respiratorias inferiores....	19
III.	ANTECEDENTES.....	21
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
V.	JUSTIFICACIÓN.....	22
VI.	HIPÓTESIS.....	22
VII.	OBJETIVO	23
VIII.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
8.1.	Metodología.....	25
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
9.1.	Virus asociados a infecciones respiratorias	34
9.1.2.	Bacterias asociadas a infecciones respiratorias.....	40
9.1.3.	Prueba estadística (T de Student)	46
X.	CONCLUSIONES	48
XI.	PERSPECTIVAS	49
XII.	REFERENCIAS	50
XIII.	ANEXO	55

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. TAMAÑO APROXIMADO DE LOS VIRUS.....	3
FIGURA 2. TAMAÑO VIRAL EN RELACIÓN CON ESTAFILOCOCO.....	3
FIGURA 3. CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL.....	6
FIGURA 4. FORMAS BÁSICAS DE LAS BACTERIAS.....	8
FIGURA 5. ESTRUCTURA BACTERIANA.....	11
FIGURA 6. CICLO DE REPLICACION EN LA TECNICA DE PCR.....	18
FIGURA 7. TOTAL DE MUESTRAS FEMENINAS Y MASCULINAS OBTENIDAS.....	31
FIGURA 8. ANÁLISIS MEDIANTE EL SOFTWARE SEEGEN CON LOS CONTROLES POSITIVOS DEL KIT.....	32
FIGURA 9. AMPLIFICACIÓN DE MUESTRA Y CONTROL INTERNO.....	33
FIGURA 10. TOTAL, DE VIRUS DETECTADOS EN LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES.....	34
FIGURA 11. ESTRATIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS PARA EL CASO DE VIRUS.....	35
FIGURA 12. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS VIRALES EN EL GRUPO PEDIÁTRICO.....	37
FIGURA 13. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS VIRALES EN EL GRUPO JÓVENES Y ADULTOS.....	37
FIGURA 14. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS VIRALES EN EL GRUPO DE ADULTOS MAYORES.....	38
FIGURA 15. TOTAL, DE BACTERIAS DETECTADAS EN LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES.....	40
FIGURA 16. ESTRATIFICACIÓN DEL TOTAL DE MUESTRAS PARA BACTERIAS.....	41
FIGURA 17. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS BACTERIANOS EN EL GRUPO PEDIÁTRICO.....	42
FIGURA 18. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS BACTERIANOS EN EL GRUPO DE 7 A 15 AÑOS.....	43
FIGURA 19. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS BACTERIANOS EN EL GRUPO DE JÓVENES Y ADULTOS.....	43
FIGURA 20. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS BACTERIANOS EN EL GRUPO MAYOR DE 60 AÑOS.....	44

LISTADO DE ABREVIATURAS.

- **VR:** Virus respiratorios
- **IRB:** Infección de vías respiratorias bajas
- **IRA:** Infección respiratoria altas
- **TRI:** Tracto respiratorio inferior
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
- **RT-PCR:** Retrotranscriptasa de la reacción en cadena de la polimerasa
- **RPM:** Revoluciones por minuto
- **ADN:** Acido desoxiribonucleico
- **ARN:** Acido ribonucleico
- **AST:** Agar Soya Trypticaseina
- **VSR:** Virus Sincitial Respiratorio
- **VSR-A:** Virus Sincitial Respiratorio tipo A
- **VSR-B:** Virus Sincitial Respiratorio tipo B
- **ADV:** Adenovirus
- **PIV:** Parainfluenza Virus
- **HRV:** Rinovirus
- **CoV:** Coronavirus
- **Cov SARS:** Coronavirus causante de síndrome respiratorio agudo
- **hMPV:** Metapneumovirus Humano
- **hBOV:** Bocavirus Humano
- **FLU-A:** Influenza tipo A
- **FLU-B:** Influenza tipo B

RESUMEN

Introducción: Las infecciones respiratorias de las vías bajas (IRB) se presentan en general de forma aguda, por lo que frecuentemente son atendidas en los servicios de urgencias, derivadas de distintos agentes etiológicos, los que se incluyen bacterias, hongos, micoplasmas y virus (siendo estos los de mayor dificultad para diagnosticar), además de ser el motivo principal de consulta ambulatoria en niños y adultos en ambos sexos. La gran mayoría de las IRB son provocadas por virus en el 90% de los casos donde juegan un papel importante la influenza, coronavirus, Rhinovirus, Virus Sincitial Respiratorio. Sin embargo estas infecciones suelen ser más graves cuando existe la presencia de bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus ssp*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, o coinfecciones. **Objetivo:** Detectar por métodos microbiológicos las bacterias, y por métodos moleculares los virus asociados a enfermedades respiratorias en vías inferiores pulmonares, para de esta forma poder brindar un diagnóstico específico, sensible y rápido para el paciente. **Materiales y métodos:** Se emplearon 40 muestras de pacientes con infección IRB que se encontraban en terapia intensiva. Las muestras fueron obtenidas de expectoración con trampa, la identificación se realizó mediante el uso del sistema microbiológico automatizado BD[®] Phoenix 1000, las bacterias de difícil crecimiento y virus se pudieron identificar utilizando el comercial de un kit de SEEGEN[®] RV16 detección, mediante RT-PCR. **Resultados:** Se consiguió detectar bacterias y virus asociados a los pacientes con infecciones respiratorias bajas (neumonía y bronquitis), obteniendo al Virus Sincitial Respiratorio (VSR) como uno de los agentes virales infecciosos principales en pacientes pediátricos y el grupo mayor de 60 años, mientras que en el caso de las bacterias se obtuvo a *Pseudomonas aeruginosa* como la bacteria patógena más comúnmente aislada en el grupo de adolescentes, así mismo se pudo inferir si la estancia intrahospitalaria variaba en presencia de ambos patógenos observando que la estadía era mayor en los pacientes identificación de virus con respecto aquellos que tenían bacterias. **Conclusión.** Esta metodología nos permitió conocer los agentes tanto virales como bacterianos más frecuentes dentro de la población pediátrica siendo en este grupo los virus los agentes más frecuentes detectados en específico el VSR, siendo esto de gran importancia para poder otorgar un diagnóstico para el paciente y aportar un diagnóstico para el tratamiento del mismo.

PALABRAS CLAVE. Virus, bacterias, neumonía, bronquitis, PCR, qPCR.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades respiratorias son la primera causa de consulta médica en el mundo, en México se presentan alrededor de 25 millones de casos al año; estas son ocasionadas por virus (Adenovirus, Coronavirus, Rinovirus, Influenza, Parainfluenza, Virus Sincitial Respiratorio), y bacterias (*Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis*, entre otros). La gran mayoría de los agentes causales son virus, por lo tanto el 90% de estos episodios son de origen viral y el resto otros agentes. Rutinariamente la detección de un agente patogénico bacteriano se realiza mediante cultivos específicos, pero esta metodología posee limitantes importantes, como el requerir personal especializado, condiciones estrictas de preparación de los cultivos y la incapacidad para sembrar ciertas bacterias como son *Haemophilus influenzae*, bacterias del grupo Gram negativo o con ácidos micólicos en la superficie. En el caso de los virus, la identificación se realiza mediante métodos directos e indirectos, principalmente métodos serológicos que identifican anticuerpos específicos; así mismo los tiempos de espera son prolongados, ya que éstos pueden llegar a tardar de 48 a 72 horas; además debe tomarse en cuenta que estas técnicas tienen una baja sensibilidad, y especificidad. Así mismo, solo un 30% de los pacientes asociados con enfermedades respiratorias, se les realiza el estudio microbiológico (Chalmers y cols., 2011). Mientras que el 70% restante no cuenta con diagnóstico microbiológico para identificar el agente causal, ocasionando que los pacientes con infección de las vías respiratorias inferiores no tengan un tratamiento adecuado, y oportuno (Gadsby y cols., 2015).

Por ello el objetivo de este trabajo fue identificar de manera molecular los agentes patógenos de pacientes con enfermedades comunitarias que acuden al Hospital Juárez de México.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. VIRUS.

Etimológicamente, virus significa veneno en latín, un virus puede ser definido como un agente un programa o un complejo informacional macromolecular, existen algunas características específicas que definen a un virus estas son:

- a) Pequeño tamaño de 20 a 50 nanómetros (nm).
- b) Ser “parásitos” genéticos intracelulares obligados.
- c) Poseen casi siempre un solo tipo de ácido nucleico en la partícula viral, una estructura elemental y un mecanismo complejo de replicación.

Los virus carecen de sistemas enzimáticos productores de energía necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, por esta razón deben necesariamente utilizar los sistemas moleculares de las células que parasitan y es por esta cuestión que se les ha denominado **parásitos genéticos intracelulares obligados**.

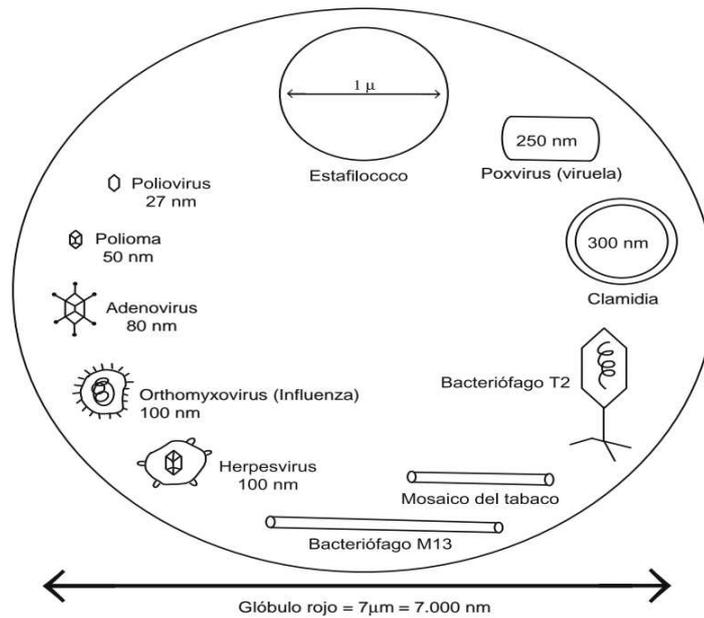
En general los virus poseen un tamaño como se muestra en la figura 1 y 2, muy inferior al de una bacteria, las bacterias se miden en micrones ($1\mu\text{m}=10^{-6}$ metros), mientras que para los virus la escala de medición la escala es en nanómetros (nm) o mili micrones (mu) que es el equivalente de 10^{-9} metros.(Carballal y cols., 1991)

Figura 1. Tamaño aproximado de los virus.

Micrón (μm)	10^{-6} metros
Milimicrón ($\text{m}\mu$) o nanómetro (nm)	10^{-9} metros
Angstrom (\AA)	10^{-10} metros
Límite de resolución de:	
Microscopio óptico	250 nm
Microscopio de fluorescencia	125 nm
Microscopio electrónico	0,5 a 0,05 nm
Tamaño promedio de los virus	20 a 300 nm
Tamaño promedio de las bacterias	0,7 a 10 μm
Linfocito	10 μm

Tamaño comparativo entre los virus y las bacterias en nanómetros. Tomado de (Carballal y cols, 2014).

Figura 2. Tamaño viral en relación con estafilococo.



Tomado de (Carballal y cols, 2014).

En cuanto a la estructura de un virus este principalmente contiene un tipo habitual de ácido nucleico ya sea contenido en ADN o ARN, los cuales constituyen el nucleocápside y asociados a proteínas son denominados como **core viral**. En el core se encuentran toda la información genética, siendo los ácidos nucleicos los responsables de la infectividad. El core está protegido a su vez por una estructura proteica denominada cápside y algunos otros poseen además una estructura lipoproteica denominada envoltura, los virus que presentan esta envoltura se denominan envueltos mientras que los que solo contienen la cápside se denominan desnudos y a la partícula completa y funcional se le denomina virión. (Carballal y cols., 1991)

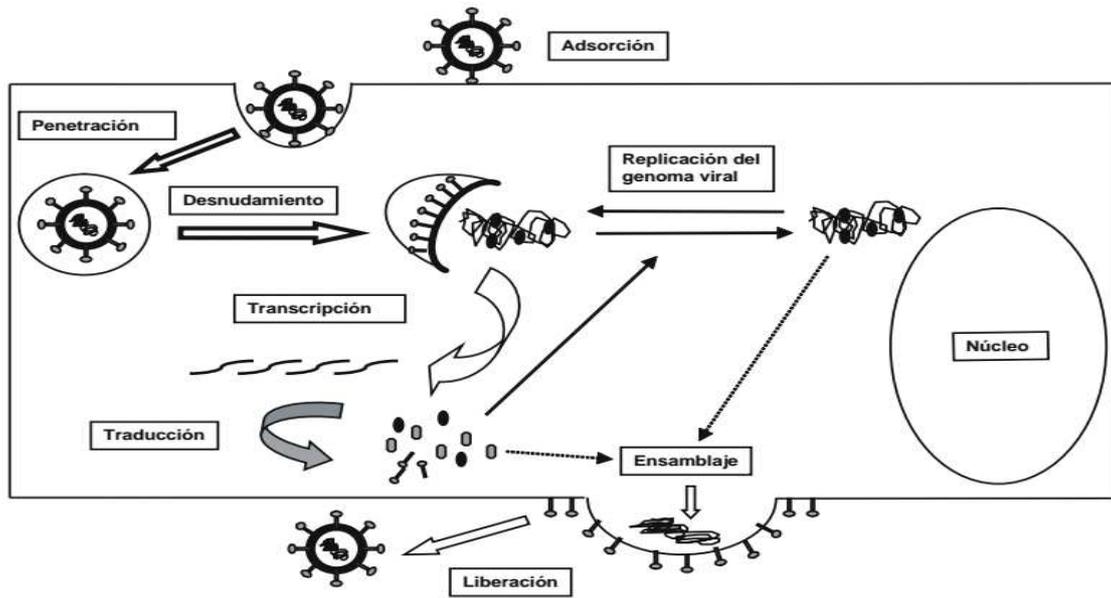
Las funciones principales de las proteínas de la cápside son:

- a) Protección del ácido nucleico del medio externo, la desecación mediada por las enzimas tisulares.
- b) Presenta estructuras que permiten la unión del virus a los receptores de membrana de la célula hospedadora.
- c) Actuar como antígenos que estimulan la respuesta inmune del hospedador.
- d) Reprimir la expresión de genes virales tempranos.
- e) Proveer interacciones especiales con las polimerasas virales en ciertos casos.

Otro rasgo muy importante en cuestión de los virus está enfocado en su replicación, al carecer de enzimas biosintéticas necesarias para su replicación los virus no crecen, no aumentan de tamaño ni su división es por fisión binaria, la replicación productiva solo se puede realizar en el interior de células vivas y permisivas por este factor la replicación viral se divide en las siguientes etapas:

- Adsorción: interacción de proteínas de superficie del virus con receptores celulares específicos.
- Penetración: a través de la membrana plasmática de la célula por pasaje directo, por fusión de membranas o por un mecanismo de endocitosis mediada por receptores, que es el más frecuente y es similar a la fagocitosis.
- Decapsidación: liberación del nucleico viral de la nucleocápside.
- Eclipse: etapa en la que no se observa viriones en el interior de la célula, ni se recupera virus infeccioso.
- Latencia: periodo que incluye al eclipse y que se extiende desde que se pierde la infectividad inicial hasta que se la recupera debido a la aparición de los nuevos viroides neoformados.
- Maduración: ensamblaje de los ácidos nucleicos neoformados con las proteínas de la cápside.
- Liberación: los viriones progenie pueden salir de la célula por lisis o por brotación a través de la membrana nuclear o del retículo endoplásmico.

Figura 3. Ciclo de replicación viral.



Ciclo por pasos de la replicación viral. Tomado de (Carballal y cols, 2014).

2.2. Bacterias

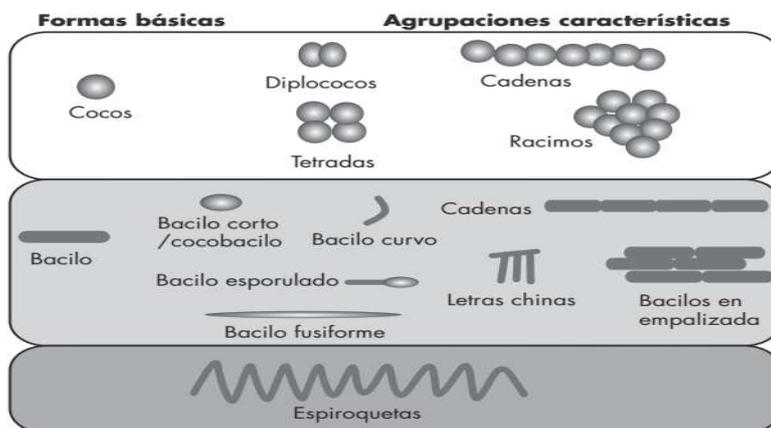
Las bacterias pertenecen al grupo de organismos conocidos como procariontes, carecen de un núcleo limitado por una membrana y de mitocondrias entre otras características. Sin embargo si tienen una estructura superficial compleja que rodea la membrana celular a la que se le denomina pared celular, su membrana proporciona una barrera osmótica y de transporte activo que mantiene las concentraciones de iones apropiadas evitando su rotura con los cambios de iones.

La composición de la pared celular es responsable de características en las bacterias que son útiles y determinantes para su taxonomía, clasificación y entendimiento de la fisiopatogenia.

Se pueden determinar formas principales en las bacterias, unas esféricas de 0.5 a 1µm denominadas “cocos”, otras cilíndricas de 0.5 a 20µm denominadas “bacilos” y unas espirales de 1 a 100µm denominadas “espiroquetas”.

Los cocos dependiendo del plano de división que tengan y la separación que se logre entre cada célula figura 4, pueden aparecer frente al microscopio formando cadenas (estreptococos), racimos (estafilococos), pares (diplococos), tétradas, sarcinas (formas cubicas)(Castro, 2014).

Figura4. Formas básicas de las bacterias.



Formas básicas de las bacterias descritas por su morfología básica.

Tomado de (García y cols, 2014).

La clasificación inicial de las bacterias se basó en su morfología y pruebas bioquímicas. Esta forma ha sido complementada con el análisis de las secuencias de ADN o rARN.

El sistema de clasificación fenotípica utiliza técnicas tradicionales en microbiología que incluyen:

- 1) Análisis de la morfología y tinción Gram: Esta técnica de identificación se ha mantenido por largo tiempo desde que fue descrita por Hans Cristian Gram en 1884, la cual permite una rápida clasificación de la mayoría de bacterias dividiéndolas en dos grandes grupos: Gram negativas y Gram positivas de acuerdo a la afinidad que tengan con los colorantes, cuyo resultado está relacionado con la pared celular que las distingue.
- 2) Requerimientos atmosféricos para su crecimiento: se refiere a las condiciones atmosféricas (requerimiento de oxígeno) en las cuales una bacteria puede crecer, de esta manera se tienen 3 grandes grupos bacterias aerobias, bacterias anaerobias, microaerófilas.
- 3) Reacción bioquímica: tiene su fundamento en la evaluación de las capacidades metabólicas demostradas por la utilización o rompimiento de diversos sustratos como carbohidratos, lípidos y proteínas.
- 4) Reacciones serológicas: se realizan utilizando anticuerpos específicos que reconocen estructuras superficiales en las bacterias que ayudan a identificar a nivel clínico antígenos superficiales que identifican algunas especie en particular o bien determina serogrupos y serotipos entre una especie determinada.

2.2.1. Estructuras de las bacterias

Las bacterias cuentan con estructuras típicas figura 5, que son las siguientes;

Membrana citoplasmática. Estructura delgada compuesta de una bicapa de fosfolípidos con proteínas intercaladas, sirve de barrera selectiva para la entrada y salida de bacterias, nutrientes y sustancias de desechos.

Citoplasma. Es un líquido o gel que contiene proteínas, aminoácidos, carbohidratos, nucleótidos, sales, iones disueltos y vitaminas, contiene además ribosomas, cuerpos de inclusión, el cromosoma bacteriano y plásmidos. Representa un lugar donde se llevan a cabo las reacciones bioquímicas involucradas en el crecimiento y metabolismo bacteriano.

Ribosomas. Responsables de la síntesis de proteínas y de aspecto granular de una bacteria observada al microscopio electrónico, compuestos por dos subunidades 50S y 30S, que en conjunto tienen un coeficiente de sedimentación de 70S.

Cuerpos de inclusión. Estructuras citoplasmáticas que se encuentran en algunas bacterias y consisten de gránulos de almacenamiento de nutrientes.

Cromosoma Bacteriano. Las bacterias no tienen un núcleo definido como las células eucarióticas. Por lo general el cromosoma bacteriano es una sola molécula circular de ADN de doble cadena que contiene toda la información genética de la bacteria. El nucleóide carece de membrana y representa un área en el citoplasma donde el ADN se agrega y no hay ribosomas.

Plásmidos. Son elementos extracromosomales autónomos más pequeños que el cromosoma bacteriano los cuales no son esenciales para el crecimiento de la bacteria pero le confieren la capacidad de transferir genes con otras bacterias y muchas contienen genes que codifican a resistencias.

Pilis o Fimbrias. Son estructuras muy delgadas y numerosas en forma de “pelo” que se encuentran en la superficie de varias bacterias en especial gram negativas,

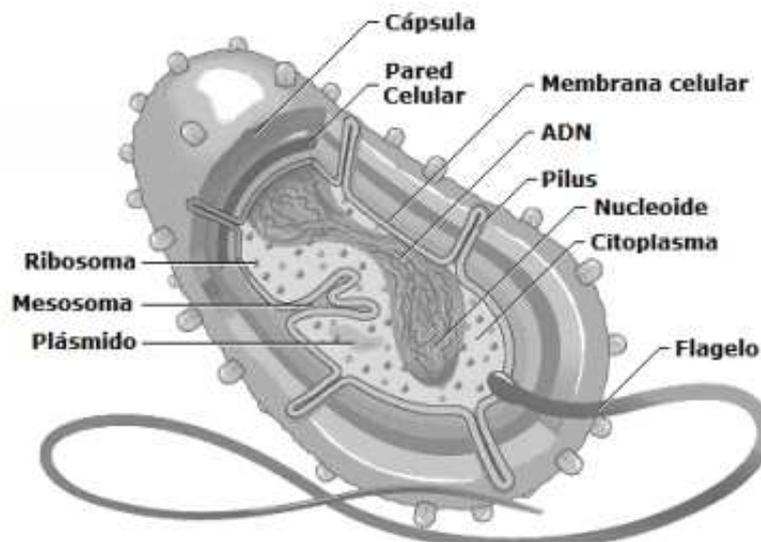
estas estructuras principalmente en procesos de adherencia a las células epiteliales ayudando a la colonización.

Flagelos. Son organelos encargados de la locomoción de las bacterias en los diferentes ambientes, en especial acuosos. Considerada como una nanomáquina la bacteria utiliza alrededor de 40 genes para su construcción y se compone de tres partes: filamento, gancho y cuerpo basal, la longitud de un flagelo varía de entre 10 a 20µm y son muy delgados aproximadamente de 20nm de diámetro.

Cápsula. Algunas bacterias desarrollan una capa externa que las recubre, dicha capsula está formada por polisacáridos con polipéptidos empaquetados, dando una apariencia rígida, cuando esta estructura no está empaquetada y no muestra una organización se le nombra glucocálix.

Pared celular. Representa una de las partes más características de la bacteria, ya que le da forma y rigidez, protegiéndola de la lisis osmótica, esta se localiza después de la membrana bacteriana y está formada por peptidoglicanos también denominado mureína.

Figura 5. Estructura bacteriana.



Tomado

de http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/document/uni_02/57/caphtm/cap0401.htm

2.3. Etiología de patógenos causantes de infecciones respiratorias

Los agentes causales de las infecciones respiratorias varía dependiendo del padecimiento que originan, para el caso de la neumonía se clasifican de muchas maneras a los efectos de las pruebas de laboratorio, estudio epidemiológico y la elección de la terapia(Purushothama V Dasaraju y cols., 1996).

La neumonía bacteriana es originada principalmente por *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*(Gargano y cols., 2015), donde se ha demostrado de manera consistente que son las bacterias aisladas con más frecuencia; así mismo estas bacterias representan el 73.9% de los aislamientos obtenidos por punción pulmonar y el 69% por hemocultivos(De León y cols., 1997).

En la categoría VR se incluyen los virus de la gripe A y B VRS, PIV tipos 1, 2 y 3, ADV, HRV, CoV 229E y OC43, y algunos enterovirus(Henderson y cols., 1979). Pero en los últimos años se han añadido a este grupo otros virus, como **hMPV**(Van den Hoogen y cols., 2001), **CoV humano NL63**(Van Den Hoogen y cols., 2004), **CoV humano HKU1**(Woo y cols., 2005)y **CoV-SARS**(Ksiazek y cols., 2003), bocavirus(Allander y cols., 2005),o los nuevos **poliomavirusHKU** (Allander y cols., 2007).

En el caso de la Bronquitis que involucra la inflamación del árbol bronquial, suele ir precedida de una infección de las vías respiratorias, siendo causada por la combinación de factores ambientales como el tabaquismo y la infección bacteriana con patógenos, tales como *H. influenzae* y *S. pneumoniae* (Purushothama V Dasaraju y cols., 1996).La bacteria *Streptococcus pneumoniae*, a pesar de los avances en la atención médica, tiene valores de mortalidad del 11% al 20%(Yoon y cols., 2014),además de esto, se conocen más de 80 serotipos de Streptococcus, pero 23 serotipos representan casi el 90% de las neumonías en los estados unidos(P. V. Dasaraju y cols., 1996)

2.4. Enfermedades asociadas al tracto respiratorio inferior

Los padecimientos de infecciones respiratorias se clasifican con respecto a la zona del tracto respiratorio, en infecciones del tracto respiratorio superior e inferior.

En las enfermedades asociadas al tracto superior se incluye a la nariz, la faringe y la laringe. En las infecciones respiratorias inferiores que suelen ser de mayor frecuencia dentro de la población, se asocian principalmente a los pulmones, dándole una mayor gravedad entre la población. Para estudiar las infecciones de vías respiratorias inferiores, se hace distinción entre neumonía y bronquitis. Siendo la neumonía una afección mucho más grave(Wenzel, 1987).

La mayoría de las infecciones del tracto respiratorio inferior son de origen viral y solo un pequeño número de éstos produce infección grave o fatal. Las bacterias ocasionan con menor frecuencia neumonía, pero el riesgo de muerte es mucho mayor que con las infecciones virales debido a los productos de desecho y las resistencias que éstas poseen (García-Rodríguez y cols., 1996).

2.4.1. Bronquitis

La bronquitis se define como un proceso de características inflamatorias, autolimitado, que afecta al árbol traqueo bronquial. Es considerada una afección clínica más que anatómica o histológica; la mucosa bronquial es idéntica a la del resto de las vías respiratorias, con la que constituye una unidad anatómica y funcional sin solución de continuidad. El síntoma cardinal de la bronquitis consiste en tos, que puede aparecer simultáneamente o a menudo, días después de un cuadro de rinitis (inflamación de las vías respiratorias superiores) o faringitis (inflamación de la faringe y garganta),mientras que otros síntomas como los propios del coriza, la tos persiste hasta que se vuelve productiva con expectoración mucopurulenta en los cuadros severos (ESCOBAR, 2012).

Uno de los diagnósticos clínicos más frecuentes, consiste en la inflamación e hiperreactividad del epitelio ciliado que recubre el árbol bronquial, con la consiguiente obstrucción del flujo de aire, que se manifiesta clínicamente por dificultad respiratoria y tos acompañada o no de la producción de esputo. Con frecuencia se acompaña de fiebre y afecta a todos los grupos de edad. Por la duración de los síntomas (principalmente la tos) puede clasificarse en bronquitis aguda (varias semanas) y bronquitis crónica (episodios de tres meses de duración durante dos años consecutivos). Los agentes bacterianos que se pueden encontrar son: *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*, siendo éstos los más frecuentemente implicados. El cuadro clínico está caracterizado por tos persistente de curso más prolongado que en el caso de la infección vírica, que en ocasiones puede progresar al inicio de un cuadro asmático. Los agentes respiratorios comunes, tales como *Haemophilus influenzae*, *S. pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis* no tienen un papel relevante en la bronquitis aguda. Por el contrario, en los pacientes con bronquitis crónica estos tres microorganismos adquieren el principal protagonismo al ser responsables de la mayoría de las exacerbaciones clínicas. Así, *H. influenzae* (cepas tipificables y no tipificables) es el patógeno aislado con mayor frecuencia (50% de los casos), seguido por *S. pneumoniae* (15-25% de los casos) y, en menor proporción, *Moraxella. Catarrhalis* (10-20% de los casos) y bacterias anaerobias (Meseguer y cols., 2008).

En niños y adultos sanos, la etiología vírica, por HRV, CoV, ADV y hMPV, es la más frecuente (Martinez Tomas y cols., 2007).

2.4.2. Neumonía

La neumonía es un tipo de infección respiratoria aguda que afecta a los pulmones. Éstos están formados por pequeños sacos, llamados alvéolos, que normalmente se llenan de aire al respirar. Los alvéolos de los enfermos de neumonía se encuentran llenos de líquido y pus, lo que hace dolorosa la respiración y limita la absorción de oxígeno. La neumonía es la principal causa individual de mortalidad infantil en todo el mundo. Se calcula que la neumonía mató a unos 935 000 niños menores de 5 años en el 2013, lo que supone el 15% de todas las defunciones de niños menores de 5 años en todo el mundo. La neumonía afecta a niños y a sus familias de todo el mundo, pero su prevalencia es mayor en el África subsahariana y Asia meridional (Who, 2014).

La incidencia de complicaciones por neumonía adquirida en la comunidad ha aumentado durante la última década. Según los registros de varios países, se hicieron más frecuentes en los últimos años (Moreno-Pérez y cols., 2015).

Los síntomas de la neumonía vírica y los de la bacteriana son similares, si bien los de la neumonía vírica pueden ser más numerosos que los de la bacteriana. 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 subcostal (depresión o retracción de la parte inferior del tórax durante la inspiración, cuando en las personas sanas el tórax se produce una expansión). Las sibilancias son más frecuentes en las infecciones víricas. Los lactantes con afectación muy grave pueden ser incapaces de comer o beber, y pueden presentar pérdida de consciencia, hipotermia y convulsiones (Who, 2014). Los VR son causa poco frecuente de neumonía (2-15%). Suelen estar implicados los virus de la gripe, PIV, ADV y VRS, sobre todo en adultos y durante los meses fríos del año. Producen un cuadro clínico conocido clásicamente como neumonía atípica, que se caracteriza por inicio subagudo, tos seca o escasamente productiva, ausencia de dolor pleurítico, predominio de las manifestaciones extrapulmonares (cefalea, artromialgias, etc.), condensación radiológica de tipo no lobular y disociación clínico-radiológica.

2.5. Epidemiología de las enfermedades respiratorias en México

De acuerdo al boletín epidemiológico proporcionado por la DGE (Dirección General de Epidemiología 2014) se reporta los siguientes datos:

En 2014 se reportaron en total de neumonías y bronquitis 83,576 positivos y en el distrito federal 7,211 casos. Para el caso de mortalidad se reportaron 27,493239casos asociados a enfermedades respiratorias agudas.

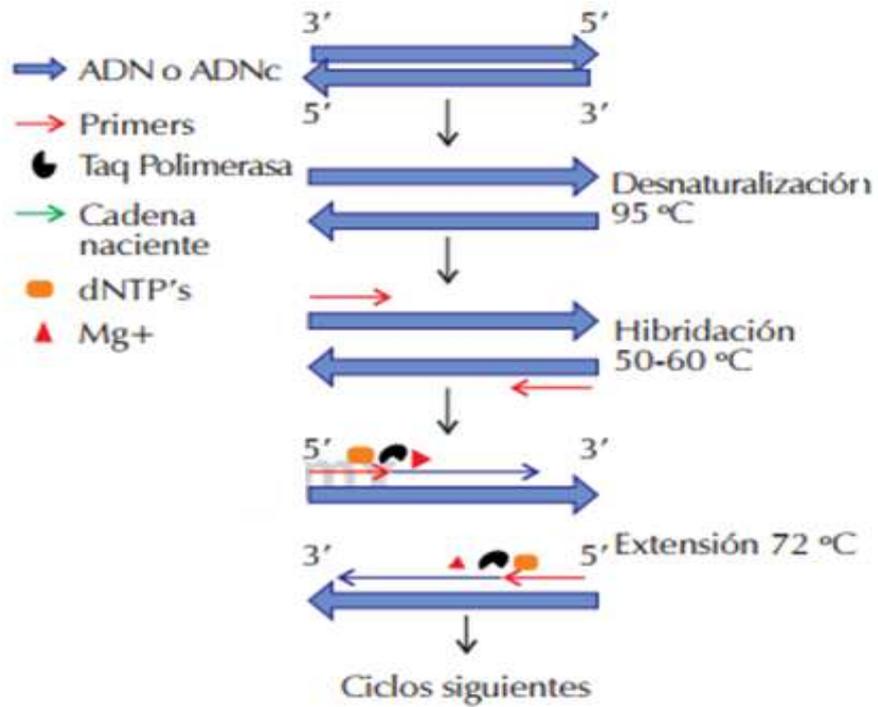
2.6. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR punto final

La PCR es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg +), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación 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 ciclos. 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 analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa(Tamay de Dios y cols., 2013).

2.7. PCR tiempo real

El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final. La nomenclatura que se usa también es diferente, si utilizamos ADN genómico entonces hablamos de una qPCR (quantitative PCR), si por lo contrario, primero obtenemos ADNc y luego hacemos la PCR, nos referimos a una RT-qPCR. Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es para cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del ARNm procedente de células o tejidos. La cantidad de ARNm que puede detectar la reacción puede ser a partir de concentraciones bajas a diferencia de la PCR punto final, que necesita una mayor concentración. Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente. Para evitar estos problemas, una alternativa es diseñar los primers utilizando programas informáticos disponibles o comprarlos ya validados de las compañías de biología molecular, quienes garantizan resultados altamente eficientes y satisfactorios para los usuarios (Tamay de Dios y cols., 2013).

Figura 6. Ciclo de replicación en la técnica de PCR.



Pasos principales de la obtención de amplicones en el PCR

Tomado y modificado de (Tamay de Dios y cols, 2013)

2.8. Técnicas de identificación microbiológica de las enfermedades respiratorias inferiores.

El diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del TRI presenta importantes limitaciones y controversias según los diferentes cuadros clínicos y los métodos diagnósticos, y su valor depende, a su vez, de un diagnóstico clínico correcto y de un tratamiento antibiótico previo. Las limitaciones estriban en la baja rentabilidad del aislamiento del agente causal y en la difícil valoración de los microorganismos aislados en relación con su significación clínica (Meseguer y cols., 2008).

La presencia de diplococos Gram positivos como morfotipo predominante en la tinción de Gram de un esputo de buena calidad, que cumpla los criterios de validez de la muestra (presencia de leucocitos y ausencia o escasez de células epiteliales), es muy sugestiva de neumonía neumocócica (57% sensibilidad y 82% especificidad). Así mismo, la detección por inmunocromatografía de membrana de la presencia del antígeno polisacárido C neumocócico en orina (80%-90% de sensibilidad y 70%-90% especificidad) orienta de forma rápida el diagnóstico etiológico inicial. Por otra parte, se recomienda la obtención de hemocultivos, que aunque son positivos para *Streptococcus pneumoniae* en solo el 20% de los pacientes, permiten la identificación definitiva del agente etiológico (Meseguer y cols., 2008).

El análisis microbiológico para *Haemophilus influenzae* se basa en el aislamiento por cultivo del microorganismo y en la tinción de Gram de un esputo de calidad, que muestra una elevada especificidad (>90%) cuando se observa la presencia predominante de bacilos gram negativos pequeños extra e intraleucocitarios (Meseguer, y cols., 2008).

Sin embargo esta metodología posee limitantes importantes, como el requerir personal especializado, condiciones estrictas de preparación de los cultivos e incapacidad para cultivar ciertas bacterias. En el caso de los virus, la identificación se realiza mediante métodos directos e indirectos, principalmente

métodos serológicos que identifican anticuerpos específicos y los tiempos de espera son prolongados, aproximadamente de 48 a 72hrs. Debido a este problema en la identificación, se han utilizado técnicas basadas en pruebas al ADN, como son la PCR y PCR múltiple, que ofrecen rapidez, bajo costo, automatización, sensibilidad y especificidad. El uso de PCR múltiple es capaz de identificar VR de forma simultánea, dado que utiliza parejas de cebadores específicas de cada virus a detectar, y que se incluyen en el mismo tubo de reacción (Coiras y cols., 2004).

Además el uso de la PCR en tiempo real realiza simultáneamente amplificación y detección, con lo que se reduce el riesgo de contaminación y el tiempo de obtención de resultados (de 10 horas para PCR convencional a 4 horas para protocolos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real(PCR-TR) (Henrickson, 2004).

III. ANTECEDENTES

De acuerdo al trabajo realizado por (Llor y cols,2006) reportó la frecuencia de bacterias implicadas en enfermedades respiratorias y obtuvo a *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, y a *Haemophilus influenzae* esto mediante un análisis multímetro, mostrando así la prevalencia de patógenos que se tenía en esta zona (Llor y cols., 2006).Otro trabajo similar sobre la etiología de las enfermedades respiratorias fue realizada por (Carroll y cols,2006)mediante el uso de un sistema automatizado microbiológico obteniendo de igual manera una alta predominancia en cuanto a bacterias Gram negativas y Enterobacterias (Carroll y cols., 2006).

En cuanto a la identificación de grupos bacterianos se han realizado trabajos con la finalidad de definir la frecuencia de bacterias asociadas a enfermedades respiratorias en centros hospitalarios, obteniendo como resultado bacterias gram negativas, esto con la ayuda de medios de cultivo selectivos y siguiendo las recomendaciones del laboratorio de Microbiología del HGCR(Clemente y cols., 2012).

Para el caso de los virus respiratorios (Corzo y cols,2015)realizó la identificación de estos y obtuvo que el VSR-A fue el más prevalente en Bucaramanga Colombia y las provincias Comunera y de García Rovira, de diciembre del 2012 a diciembre del 2013, publicando estos datos en 2015. También reportó que las diferentes etapas estacionales tenían relación con los virus identificados. En santander España se identificó la presencia de metapneumovirus, enterovirus, coronavirus humano y bocavirus (Corzo y cols., 2015).

Así mismo (Galván y cols, 2015) realizó la identificación y prevalencia de los virus respiratorios más comunes en las neumonías y obtuvo a su vez resultados sobre coinfecciones virales. También (Asner y cols, 2015) realizó un estudio prospectivo de 142 pacientes pediátricos, en donde analizó las frecuencias de coinfecciones de mayor gravedad en pacientes con problemas respiratorio.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial, México ocupa el tercer lugar en padecimientos infecciosos relacionados con las vías respiratorias, por tal motivo representan un problema para la población productiva en nuestro país; estas enfermedades pueden provocar neumonías y bronconeumonías que traen como consecuencia ausentismo laboral y escolar, además en casos graves se requiere de hospitalización; y el no tener un diagnóstico preciso puede conducir a un mayor tiempo de estancia intrahospitalaria.

V. JUSTIFICACIÓN

Con la identificación por métodos moleculares para el caso de virus y microbiológicos automatizados para bacterias, se puede conocer el tipo de agente causal en los pacientes con infecciones respiratorias del tracto inferior, ya que estos métodos tienen mayor especificidad, sensibilidad y rapidez en comparación de los métodos tradicionales que se utilizan para hacer el diagnóstico microbiológico, aportando con esto un diagnóstico más específico para el tratamiento de los pacientes.

VI. HIPÓTESIS

Los métodos más utilizados para la identificación de agentes infecciosos (virus y bacterias) son los microbiológicos y actualmente los moleculares, por lo tanto, mediante la utilización de estas técnicas RT-PCR y el uso de métodos microbiológicos se determinarán a los virus como los agentes causales más frecuentes de los cuadros clínicos respiratorios de los pacientes intubados del servicio de medicina interna.

VII. OBJETIVO

Detectar por métodos microbiológicos las bacterias, y por métodos moleculares los virus asociados a enfermedades respiratorias en vías inferiores pulmonares, para de esta forma poder brindar un diagnóstico específico, sensible y rápido para el paciente.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Identificar el género y especie bacteriana presente en la muestra con el uso de un sistema microbiológico automatizado.
- ❖ Identificar los virus involucrados en la infección del paciente mediante el uso de un sistema de detección viral en tiempo real.
- ❖ Correlacionar los datos clínicos en relación de la estancia intrahospitalaria, con los datos obtenidos del servicio de bacteriología y los moleculares para el caso de los virus.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

Población de Estudio:

Pacientes hospitalizados de medicina interna del Hospital Juárez de México.

Tamaño de muestra:

- 57 muestras.

Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico de infecciones respiratorias de las vías bajas (neumonía y bronquitis).
- Pacientes de edad indistinta.
- Muestras tomadas por expectoración con trampa.

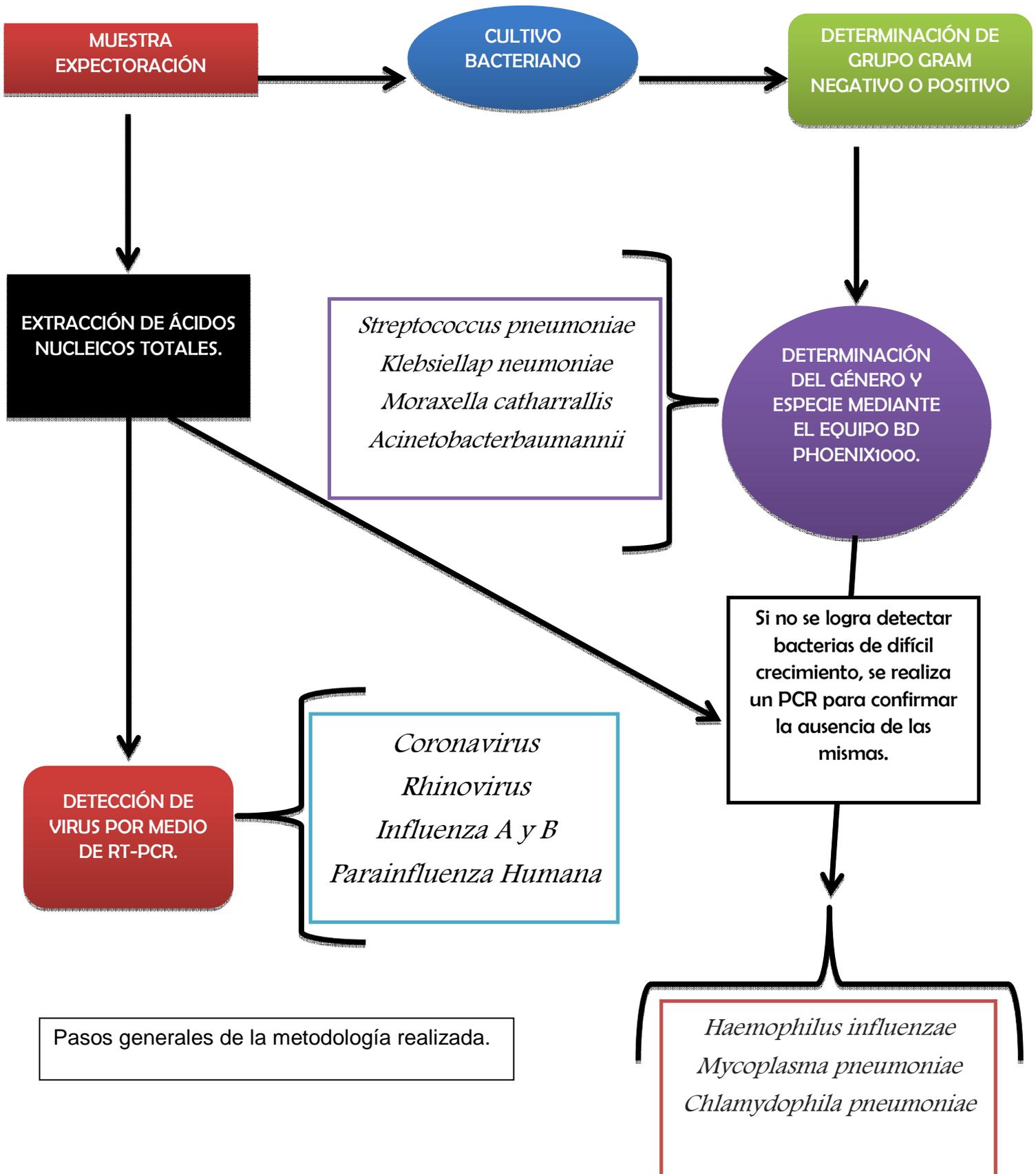
Criterios de exclusión

- Pacientes cuya muestra sea insuficiente para realizar todas las metodologías.
- Pacientes que hayan iniciado el tratamiento con antibióticos.

Criterios de eliminación

- Pacientes que no tengan muestra adecuada para realizar todas las metodologías planteadas.

8.1. Metodología.



- TOMA DE MUESTRA (EXPECTORACIÓN): El paciente expectoró en un vaso estéril de boca ancha la primera flema de la mañana (en el caso de las expectoraciones sin trampa) para la evaluación de los patógenos de las vías respiratorias inferiores. Una vez que se recibió la muestra, se transportó y se rotuló en número consecutivo. En seguida se tomaron 2 mL de muestra para la extracción de ADN y ARN, en el caso de la identificación viral; lo restante se utilizó para la identificación de bacterias.
- SIEMBRA: La muestra se sembró mediante un asa de 100 y 1000 ufc/ul en los medios de cultivo, los cuales favorecen el crecimiento de colonias. Una vez que se obtuvo la cantidad suficiente de colonias, se aislaron y se sembraron en los medios básicos selectivos MacConkey (para identificar Gram negativas) y sal y manitol (para bacterias Gram positivas) y se esperó el resultado en 24 horas.
- IDENTIFICACIÓN BACTERIANA MEDIANTE EL EQUIPO BD PHOENIX 1000: una vez que se clasificó por grupo bacteriano, se seleccionaron las colonias específicas tomando en cuenta la morfología y la abundancia de las mismas. Después se llevó a cabo una dilución del medio salino de 0.5 a 0.57 Macfarland, a su vez se tomó un tubo de medio AST y se le adicionó una gota de Azul de Lamer, el cual funciona como un catalizador. Una vez preparada la solución AST, se tomó una alícuota de 25ul de la solución salina con la dilución bacteriana y se vertió en el frasco de AST. Una vez concluidas estas mezclas se vertió la solución AST como la dilución bacteriana en el panel respectivo, para posteriormente introducir en el equipo automatizado de BD PHOENIX 1000 y en 24 horas después de crecimiento en el equipo, se obtuvo el resultado para la identificación bacteriana (género y especie).

- EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE EL KIT RTP® PATHOGEN KIT: Una vez que se obtuvo la caracterización bacteriana, se procesó la muestra para la detección de virus respiratorios:
 1. Lisis de la muestra: se agregaron 200uL de la expectoración en un tubo de extracción y 200ul de agua destilada, se agitó con el vórtex hasta que la muestra se homogenizó, posteriormente se incubó en una placa de calentamiento GENETICS a 65° C por 15 min, seguido de 95°C por 10 min.
 2. Unión de ADN y ARN: Se agregó 400ul de la solución de unión en el tubo de extracción y se vortexeó la muestra hasta que se homogenizó. Se paso la muestra a un tubo con filtro, se cerró la tapa y se centrifugó por 2 minutos a 11000 RPM, se descartó la solución en el tubo de residuos y se conservó el tubo con filtro.
 3. Primer lavado del tubo RTA spin filter: se colocó el filtro en otro tubo de residuos y se agregó 500ul de Wash Buffer R1 para después centrifugar a 11000rpm por 1 minuto y posteriormente desechar el tubo de residuos, pero conservando el filtro.
 4. Segundo lavado del tubo RTA spin filter: Se colocó el filtro en otro tubo de residuos y se agregó 700ul del Wash Buffer R2 para posteriormente centrifugar a 11000rpm por 1 minuto y descartar el tubo de desechos conservando el filtro en un tubo eppendorf.
 5. Elución del ADN y ARN: Se Agregó en el tubo eppendorf 60ul del Elution Bufer previamente incubado a 65°C y se centrifugó a 11000rpm durante 3 minutos.

- SÍNTESIS DEL RNA A cDNA MEDIANTE EL USO DEL KIT COMERCIAL DE SEEGENE cDNA SYNTHESIS PREMIX V1.1:

Se realizó posteriormente la síntesis de ARN a cADN con el kit comercial cDNA Synthesis Automix V1.1

Para la preparación de la mix para PCR se agregaron las siguientes cantidades de reactivos:

10UI	ALÍCUOTA PREMIX
2uL	PRIMERS DE HEXÁMEROS
8uL	ÁCIDOS NUCLEICOS
20uL	VOLUMEN TOTAL

1. Para la síntesis en PCR punto final se establecieron las siguientes condiciones de acuerdo a las especificaciones del kit:

SEGMENTO	No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	25°C	5 min
2	1	37°C	60min
3	1	95°C	2min

Y se almacenaron los cADN a -20°C hasta su uso.

- RT-PCR: posteriormente se realizó la amplificación del cADN en PCR en tiempo real mediante el uso del kit comercial Seegene Anyplex II RV16 Detection V1.1 el cual está diseñado para detectar los virus de influenza A/B, virus Sincitial respiratorio A y B, Adenovirus Humano, Metapneumovirus Humano, Coronavirus Humano 229E,NL63,OC43, Parainfluenza virus Humano 1/2/3/4,Rhinovirus Humano A/B/C, Enterovirus Humano y Bocavirus Humano 1/2/3/4.

Para la preparación de la mezcla de PCR en tiempo real se adicionaron:

5uL	4XRV16 A TOM OR B TOM
5UI	4X Anyplex PCR Master Mix
2uL	RNase-free water
12uL	Volume total del PCR Mastermix

Y se agregó a esta cantidad final 8ul de cADN para aforar la mezcla a 20ul, a su vez se realizaron dos negativos con las soluciones RV16PC1 Y RV16PC2 y se introdujeron las muestras al equipo BioRad CFX96 con las siguientes condiciones para su amplificación:

SEGMENTO	TEMPERATURA	DURACION	NO. DE CICLOS
1	50°C	4 min	
2	95°C	15 min	
3	95°C	30 sec	30
4	60°C	1 min	
5	72°C	30 sec	
6	GOTO 3,29 more times		
7	55°C	30 sec	
8	Melting curve 55°C-85°C		
9	95°C	30 sec	10
10	60°C	1 min	
11	72°C	30 sec	
12	Goto9,9 more times		
13	55°C	30 sec	
14	Metilng curve 55°C-85°C		
15	95°C	30 sec	10
16	60°C	1 min	
17	72°C	30 sec	
18	Goto 15,9 more times		

19	55°C	30 sec
20	Melting curve 55°C-85°C	

- USO DEL PROGRAMA SEEGEN VIEWER: este programa llevó a cabo un análisis mediante las curvas de amplificación obtenidas en la PCR en tiempo real para poder así asignar el patógeno que se detectó en las muestras mediante el uso de los fluoróforos específicos para cada virus, por lo cual es muy importante exportar el archivo obtenido en la corrida de RT-PCR para poder obtener el resultado específico de cada muestra.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se realizó la recolecta de 57 muestras biológicas de expectación con trampa del servicio de bacteriología del Hospital Juárez de México, de las cuales 27/57 fueron del género femenino y 30/57 del género masculino (figura 7).

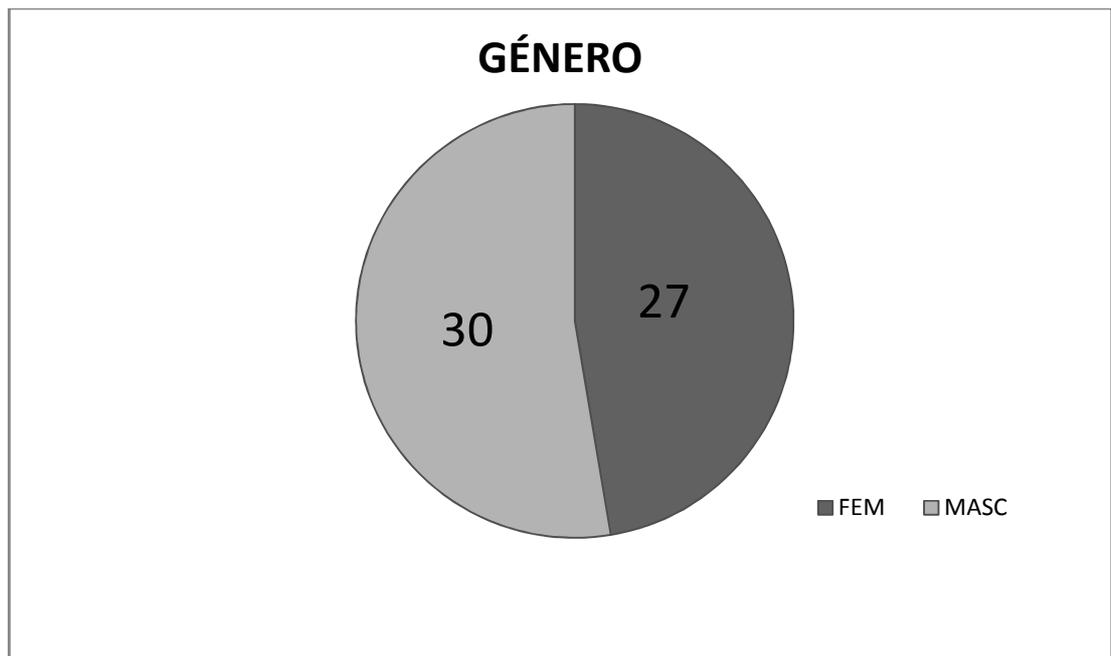


Figura 7. Total de muestras femeninas y masculinas obtenidas.

De acuerdo con los resultados obtenidos por (Inés clemente y cols, 2012), reportó que la incidencia en varones era mucho mayor que en las muestras femeninas, en una proporción de 3:1 aproximadamente, estos resultados así mismo coinciden en proporción con los resultados obtenidos por (Essa y cols., 2015) en donde reportó que obtuvo en varones una N de 210 y en el género femenino una N de 114 muestras positivas, lo cual sugiere un comportamiento muy similar en este trabajo en donde el género masculino obtiene un mayor número de muestras positivas en relación con el género femenino, este comportamiento se deduce en que una diferencia en niveles de esteroides sexuales entre un sexo y otro, pudiera también determinar la diferencia entre la respuesta inmune de uno u otro sexo al mismo

estímulo antigénico, o determinar funciones inmunológicas diferentes entre ambos sexos, el dimorfismo inmunológico se demostró con la observación de que las hembras de diferentes especies producen niveles más altos de inmunoglobulinas circulantes, y típicamente presentan una respuesta inmune de tipo humoral más pronunciada en contra de la infección(De León-Nava y cols., 2006).

Posteriormente se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales mediante el Kit Stratec molecular Patogen kit, para después realizar la tipificación por PCR multiplex en tiempo real de los diferentes patógenos asociados a enfermedades respiratorias, para su posterior análisis con el software SEEGEN el cual cuenta con un control interno para garantizar la extracción y controles positivos para 18 Tipos de virus diferentes (Figura 8 y Figura 9).

Figura 8. Análisis mediante el software SEEGEN con los controles positivos del kit.



Amplificación de los controles positivos del kit Seegene Anyplex II RV16 Detection V1.1, en la parte superior se muestran las curvas de amplificación a temperaturas específicas para la amplificación de cada cepa viral, y en la parte inferior de la imagen, se muestra la validación positiva de las 18 cepas virales.

Figura 9. Amplificación de muestra y control interno.



En la parte superior de la imagen se puede apreciar, la amplificación del control interno del kit Seegene Anyplex II RV16 Detection V1.1 para validar la extracción de los ácidos nucleicos amplificando a 66 grados centígrados, y amplificación de una muestra de un paciente que da resultado positivo a VSR-B, mientras que la parte inferior se observa la validación positiva tanto del control interno como de la muestra positiva del paciente.

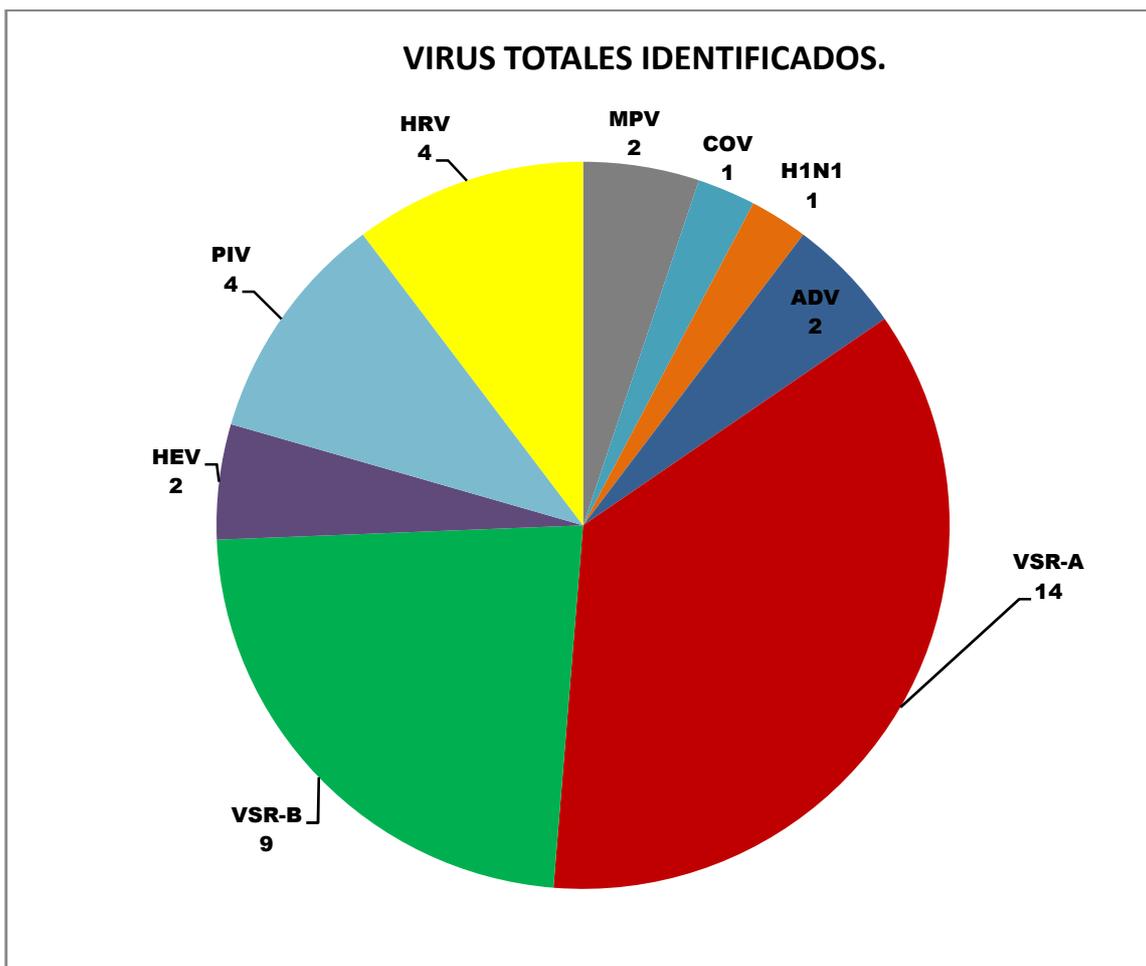
La utilización de una prueba molecular para la detección de muestras con diagnóstico de infecciones respiratorias ha demostrado ser una herramienta de gran apoyo para poder proporcionar un diagnóstico oportuno y pronto en relación a pacientes con un diagnóstico grave del tracto respiratorio, ya se bronquitis o neumonía, a su vez como indica (Essa y cols., 2015) una prueba molecular hace posible no solo otorgar un diagnóstico oportuno en menos tiempo de espera, sino que así mismo hace posible la detección múltiple de varios agentes virales para tomar en cuenta incluso coinfecciones en el mismo paciente, siendo esto causa de su complicación y alargando a su vez su estancia intrahospitalaria.

El desarrollo y la incorporación de métodos moleculares como la transcripción reversa (RT) seguida de una PCR para el diagnóstico de HRV, ha aumentado la sensibilidad de su detección. La incorporación de estos métodos para su diagnóstico, ha permitido asociar a los HRV con infecciones respiratorias, no solo del tracto superior sino también del inferior, tales como neumonía y bronquiolitis en niños (Marccone y cols., 2012).

9.1. Virus asociados a infecciones respiratorias

De los resultados se encontró que 37/57muestras fueron positivas a VR, de las cuales 14/37 corresponden a VSR-A, 9/37 fueron positivos a VSR-B y 4/37 positivos a HRV, (Figura 10).

Figura 10. TOTAL, DE VIRUS DETECTADOS EN LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES.



Virus Sincitial Respiratorio (VSR A Y B), Parainfluenza virus (PIV), Rinovirus Huamano (HRV), Metaepnovirus (MPV), Coronavirus (COV), Influenza tipo A pandémica (H1N1), Adenovirus (ADV).

De acuerdo al trabajo realizado por (Essa y cols., 2015) reportó que el virus más frecuente dentro de su población fue el HRV en un 41.6%, seguido por FLU-A 15.1%, y VSR-A 13.1%; sin embargo en este trabajo el virus más común detectado fue el VSR, de acuerdo a (Olvera y cols., 2002) el virus de influenza al igual que el VSR presenta una incidencia estacional muy marcada, los brotes son más frecuentes en invierno y primavera (tiempo en el que se realizó este estudio), estos resultados coinciden con el trabajo presentado por (Bonzel y cols., 2008) quienes reportaron al VRS como el más frecuentemente detectado en pediátricos en un 44.1% (112 muestras), seguido por hBov en un 19.3% (49 muestras) este análisis lo realizó en temporada de invierno, en donde además los pacientes con neumonía y bronquitis fueron los más frecuentes diagnosticados.

De este total se realizó la estratificación de las muestras positivas, para poder observar el comportamiento de las infecciones virales, en los diferentes grupos de edad (Figura 11).

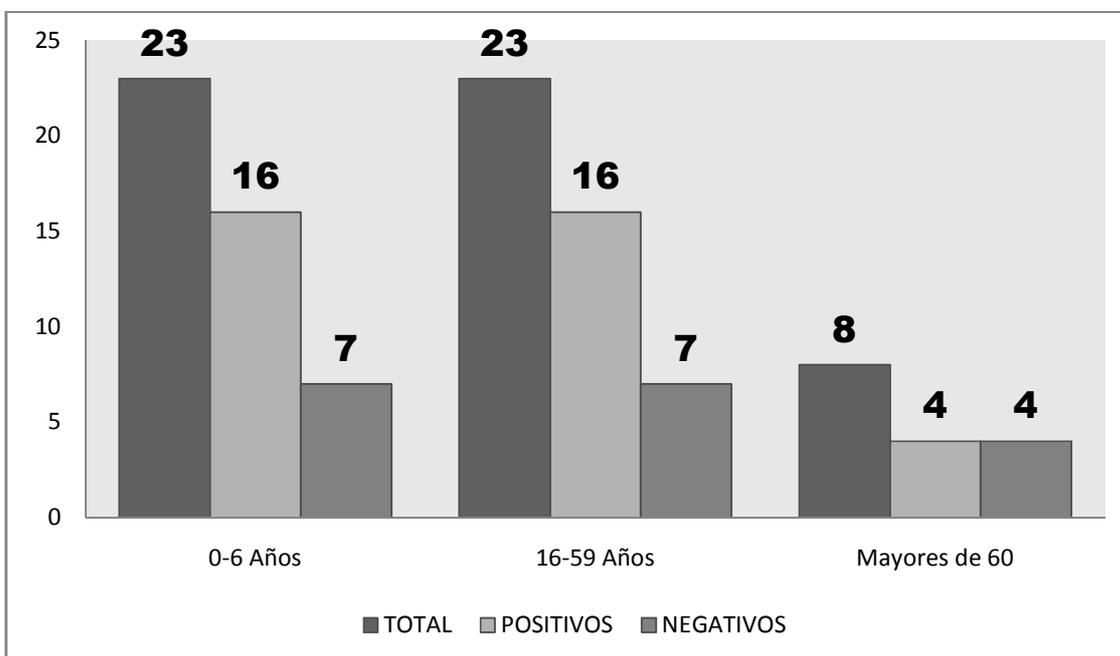


Figura 11. ESTRATIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS PARA EL CASO DE VIRUS

La etiología de la neumonía en la infancia es más amplia que en el adulto, de acuerdo con (Macedo y cols.) y varía en función de la edad, aunque los virus son la causa más frecuente (70-90% de los casos), seguidos de las bacterias (10-20%). Esto indica que la etiología de las enfermedades respiratorias no es la misma de acuerdo con los distintos grupos de edad, ya que el comportamiento de la enfermedad estará mediado en relación al agente infeccioso que éste contraiga y cómo el paciente responda para combatir a la infección.

Y como lo indica (Macedo and Mateos), en las edades extremas de la vida su incidencia es mayor que en el resto de la población y es en estos pacientes en quienes tiene consecuencias más graves, por lo cual, realizar una estratificación en los grupos de edades es primordial, ya que de ello depende el tratamiento y procedimiento a seguir del paciente, esto representa un problema relevante en salud pública, tanto en sus aspectos sociales como económicos: elevada morbimortalidad, altas tasas de hospitalización, estadía hospitalaria prolongada y costos elevados.

De estos mismos grupos de edades se llevó a cabo el análisis por patógenos encontrados en los grupos y se obtuvieron las siguientes gráficas que muestran los VR detectados y su frecuencia en el grupo pediátrico (Figura 12), posteriormente en el grupo de adultos (Figura 13) y por último en el grupo de mayores de 60 años(Figura 14).

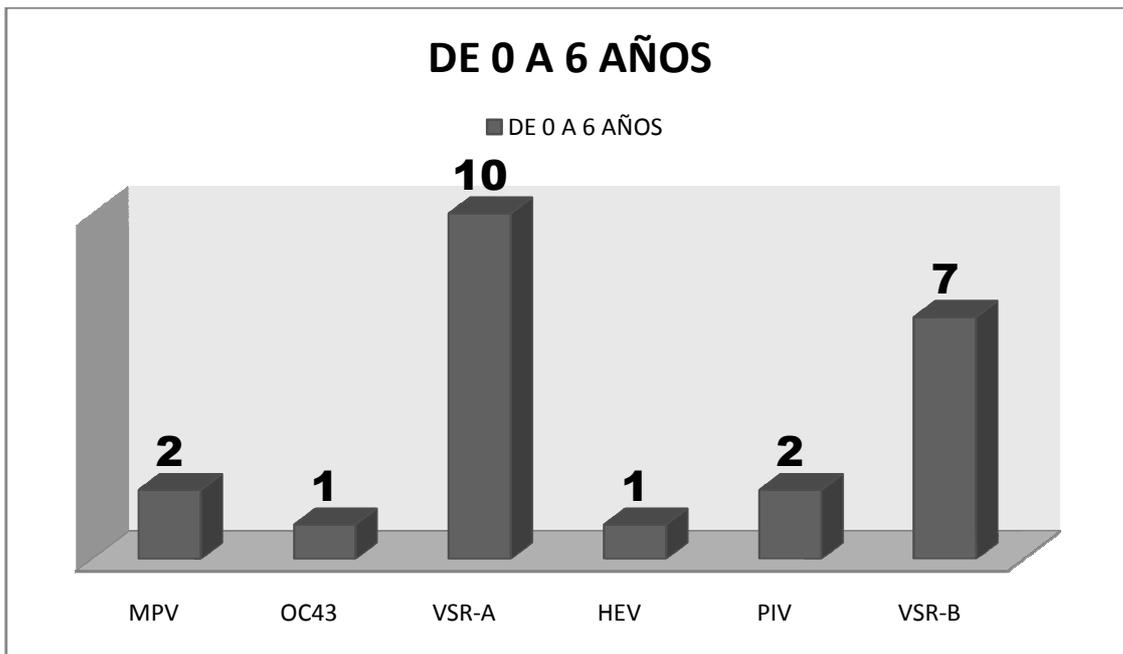


Figura 12. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS VIRALES EN EL GRUPO PEDIÁTRICO

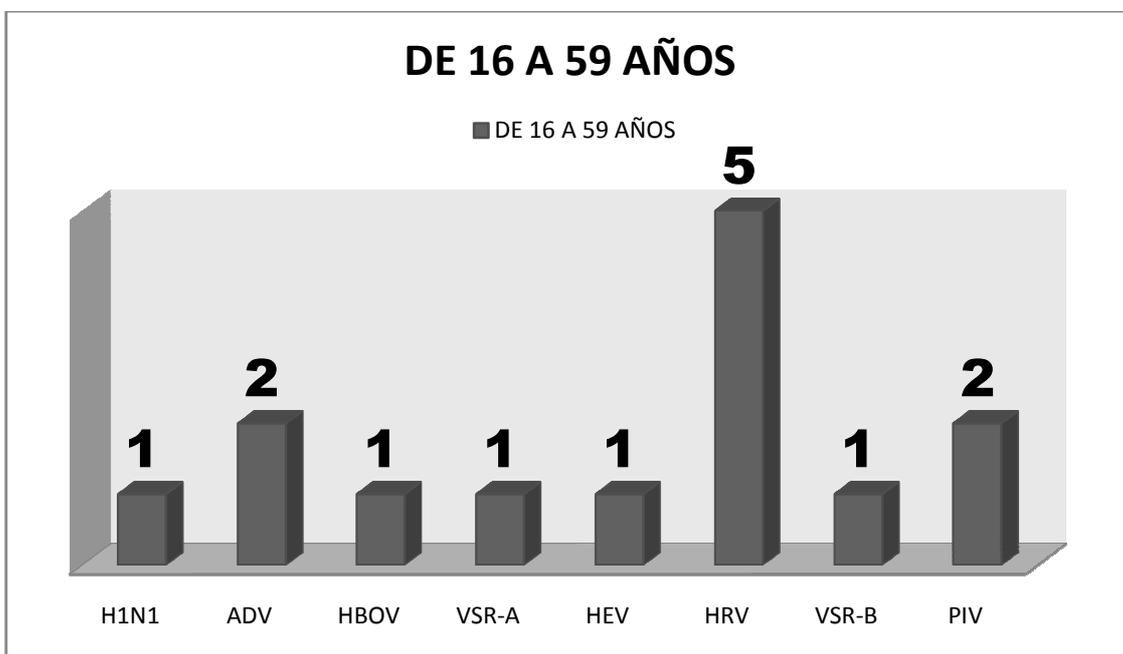


Figura 13. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS VIRALES EN EL GRUPO JÓVENES Y ADULTOS

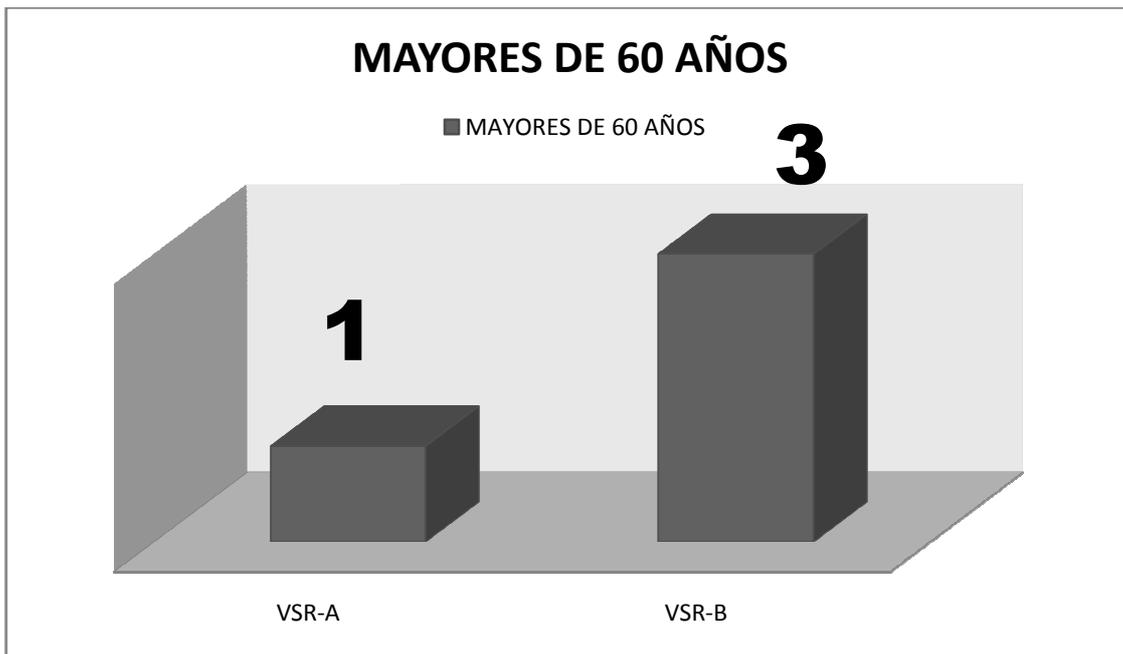


Figura 14. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS VIRALES EN EL GRUPO DE ADULTOS MAYORES

El trabajo realizado por (García y cols., 2001) reportó que de 612 lactantes, el 81% fue positivo para el VSR, lo cual tiene relación a lo encontrado en las 23 muestras de las cuales 16 de estas fueron positivas a patógenos virales, siendo el VSR el más frecuente en este rango de edad, detectado en 14 muestras tanto en forma individual como en coinfecciones con otro virus principalmente entre VSR-A y VSR-B, así como con el PIV y HRV.

El VSR es uno de los virus más comunes, Además, la infección por VRS se ha asociado con un comportamiento más agresivo y una mayor necesidad de hospitalización(Díaz y cols., 2015).

Además, el grupo pediátrico es uno de los grupos con mayor importancia de poder diagnosticar rápidamente, ya que el no hacerlo puede poner de por medio la supervivencia del infante, puesto que aún no cuenta con un sistema inmunológico más maduro que el de los otros grupos de edad.

El grupo de 7 a 15 años no fue positivo para ningún VR, por lo cual no se incluyó ningún resultado de este grupo dentro del estudio viral, por otro lado, en el grupo de 16 años a 59 años se presentó una mayor presencia del HRV, como indica (Marcone y cols., 2012), HRV son los agentes causales más frecuentes de resfrío común. También están asociados con otitis media aguda en niños y sinusitis en adultos. Cabe destacar que el impacto y la asociación de HRV con diferentes cuadros clínicos han sido subestimados debido a la falta de métodos diagnósticos suficientemente sensibles y específicos (Marcone, y cols., 2012).

(Martínez, 2010) Menciona que el HRV se trata de un virus respiratorio más común en escolares y en adultos: dos tercios de los resfríos comunes son responsabilidad del HRV y hasta la mitad de las exacerbaciones asmáticas se han reconocido como consecuencia de la infección por éste.

De acuerdo con el trabajo realizado por (Sanchén Casas y cols., 2014), reportó que de 111 muestras, 62 niños y 49 adultos, el rinovirus humano estuvo asociado en un 61.3% en niños, sin embargo, en adultos este se asoció más para las vías altas y en coinfecciones con otros agentes virales, por lo cual menciona que se portó “muy agresivo”, así mismo, cada año es el causante de 50% de los resfriados, además de bronquiolitis, neumonía y coinfecciones en edades tempranas de la vida.

En cuanto al grupo de mayores de 60 a pesar de ser pocas muestras se obtuvieron resultados positivos para VSR-B. En el estudio realizado por (Rabagliati y cols., 2007) reporta que los pacientes más afectados por este agente son los adultos mayores con patologías crónicas de base en un 25%.

La incidencia de VSR en pacientes asmáticos evidencia que este agente pudiera jugar un papel importante como factor de riesgo en la patogénesis del asma bronquial en el adulto (Valero y cols., 2005).

9.1.2. Bacterias asociadas a infecciones respiratorias.

En cuanto a bacterias 16/57 fueron positivas, teniendo a *Pseudomonas aeruginosa* como la bacteria más frecuente detectada, con 4/16 dentro de las positivas (Figura 15).

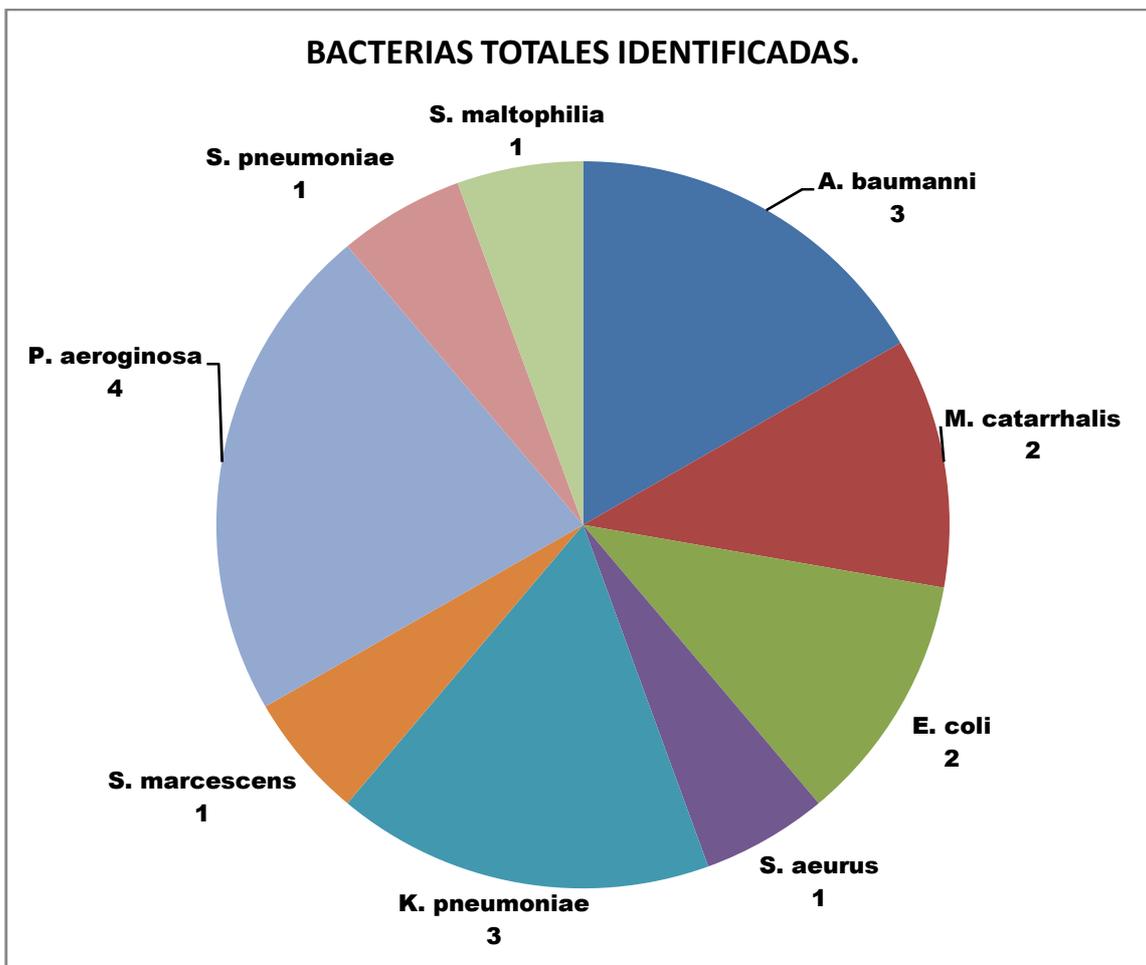


Figura 15. TOTAL, DE BACTERIAS DETECTADAS EN LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

La bacteria más representativa fue *Pseudomona aeruginosa*, la cual es un microorganismo oportunista frecuentemente implicado en infecciones de origen nosocomial, esta detección es de importancia debido a que la incidencia de infecciones por esta bacteria va en aumento; además esta bacteria posee un sistema de resistencia y es capaz de poseer nuevos mecanismos de resistencia (Mañas y cols., 2003), por lo cual se muestra la importancia de realizar una detección de patógenos bacterianos y estudios de resistencia, para de esta forma poder identificar cepas que representan un riesgo grande para el paciente.

Así mismo de acuerdo con (Mañas y cols., 2003), logró encontrar en muestras respiratorias a *Pseudomona aerogirasa* en un 40.2%.

De igual forma se estratificaron las muestras positivas a bacterias para observar el comportamiento bacteriano en los distintos grupos de edad (Figura 16).

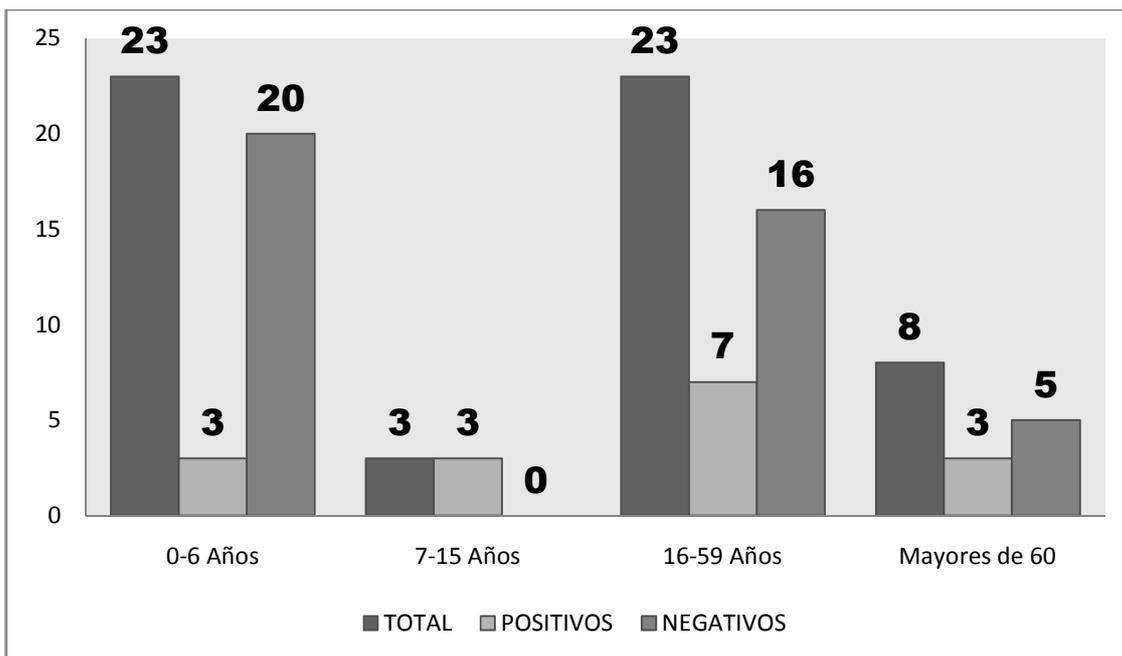


Figura 16. ESTRATIFICACIÓN DEL TOTAL DE MUESTRAS PARA BACTERIAS

Como ya se mencionó anteriormente, las enfermedades respiratorias suelen ser muy frecuentes en los dos extremos de la vida, tanto pediátricos y adultos mayores, por lo cual es importante llevar a cabo una detección oportuna, así como un diagnóstico temprano, con el fin de evitar una complicación de salud en el paciente y acortar su estadía en el hospital, sin embargo en los dos grupos extremos no se observaron muchas muestras positivas para bacterias respiratorias, a excepción del grupo de 7 a 15 años, el cual resultó ser positivo a bacterias respiratorias en el 100% de las muestras.

De estas muestras positivas se realizó a su vez la estratificación de las bacterias más frecuentes encontradas, en el primer grupo de 0 a 6 se obtuvo a Klebsiella Pneumoniae como la más común (Figura 17), el segundo grupo de 7 a 15 años de edad, no se obtuvo patógeno bacteriano más frecuente (Figura 18), en el tercer grupo, de 16 a 59 años, el patógeno bacteriano más frecuente encontrado fue Pseudomona Aerogirasa (Figura 19), y por último en el grupo mayor de 60 años se observó que la más frecuente fue Pseudomona Aerogirasa (Figura 20).

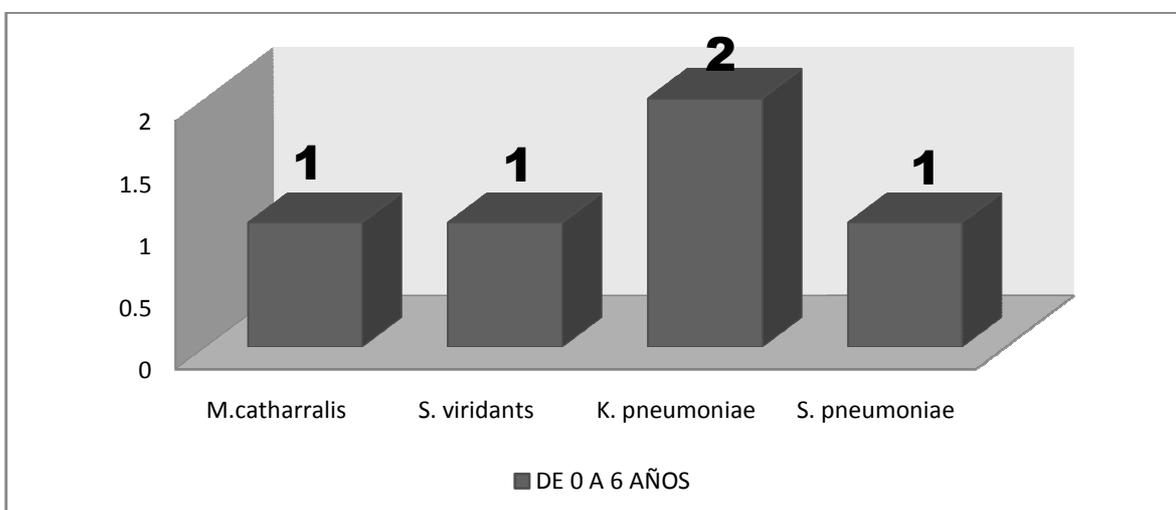


Figura17. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS BACTERIANOS EN EL GRUPO PEDIÁTRICO

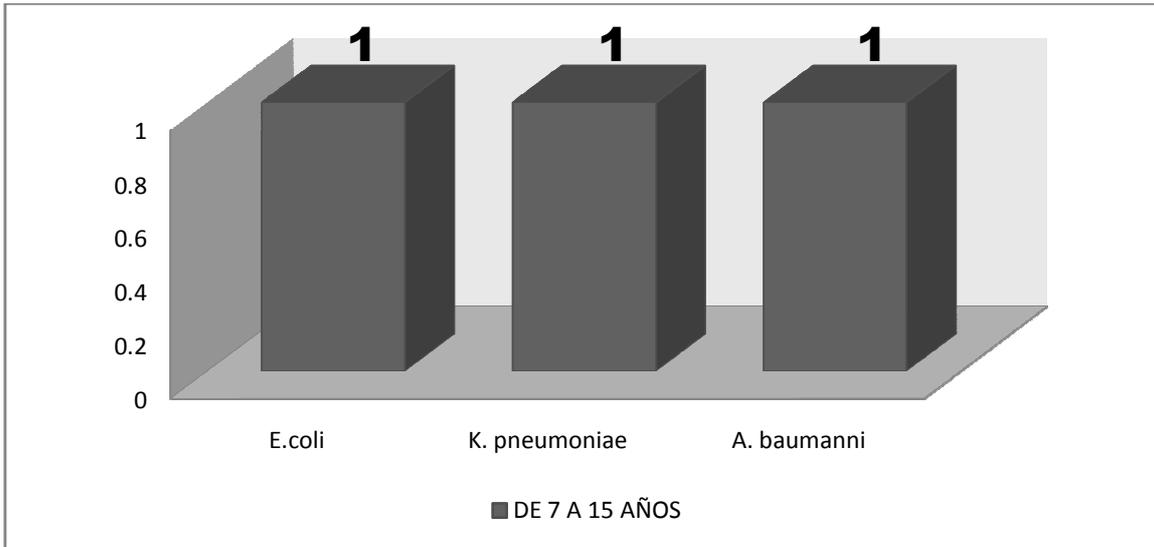


Figura 18. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS BACTERIANOS EN EL GRUPO DE 7 A 15 AÑOS

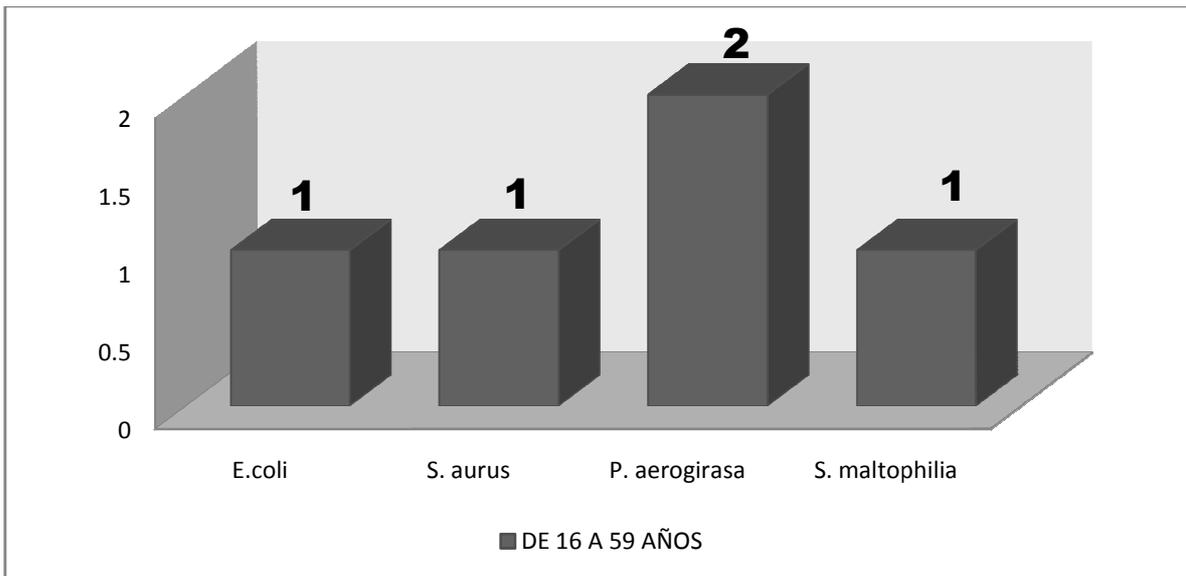


Figura 19. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS BACTERIANOS EN EL GRUPO DE JÓVENES Y ADULTOS

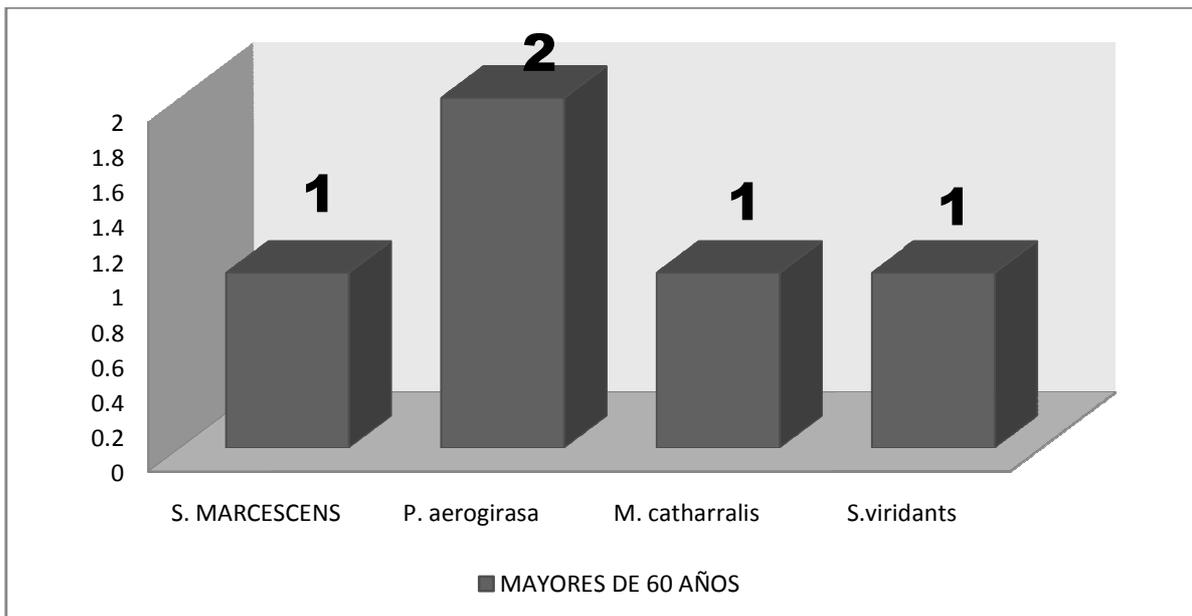


Figura 20. DETECCIÓN DE LOS PATÓGENOS BACTERIANOS EN EL GRUPO MAYOR DE 60 AÑOS

Klebsiella pneumoniae ha resultado un patógeno de importancia clínica como lo indica (Toro y cols., 2010) ya que existe un claro aumento en la prevalencia de *K. pneumoniae* resistente, lo que explica además estancias hospitalarias prolongadas y una tasa de mortalidad que según algunos autores es de 27,3%. Una característica muy importante de *K. pneumoniae* es su alta resistencia a los antibióticos beta-lactámicos, principalmente por la producción de beta-lactamasas, enzimas que hidrolizan dichos medicamentos, entre las cuales las de mayor interés son las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas; lo importante de esta resistencia radica en que los betalactámicos, potentes bactericidas, son los antibióticos más a menudo prescritos en el mundo, por lo cual es importante el poder llevar a cabo una identificación de estos patógenos principalmente en el grupo pediátrico, y de igual forma detectar si estos patógenos no están en coinfección con otro agente ya sea bacteriano o viral que provoque un daño grave a la salud del infante.

Otro patógeno que cabe destacar su presencia es *S.pneumoniae* que en niños menores de cinco años causa infecciones como otitis media, sinusitis o neumonía, que pueden ir acompañadas de otras enfermedades invasoras como meningitis y bacteriemia (Solórzano-Santos y cols., 2005).

Además existen 90 serotipos de *S. pneumoniae*, de los cuales casi la mitad han sido implicados en distintas enfermedades, lo que ha complicado el desarrollo de una vacuna con cobertura total de los serotipos (Mulholland, 1999).

Cabe destacar que en este estudio la presencia bacteriana fue muy homogénea a pesar de ser detectada en pocas muestras, y en otros casos se encontró presente en coinfecciones virales, siendo principalmente el VSR, aumentando de esta forma la estancia intrahospitalaria del paciente.

9.1.3. Prueba estadística (T de Student)

Así mismo se realizó una prueba estadística para observar si la estancia intrahospitalaria de los pacientes era mayor en presencia de virus que en relación con las bacterias, por lo cual primero se comparo la estancia en días contra la presencia de los patógenos en los pacientes, y se realizo una prueba de F con un intervalo de confianza $p > 0.05$ de confianza (cuadro 1), para poder primeramente concluir se existía una diferencia significativa en cuanto a la varianza para ambos grupos de pacientes

Cuadro 1. Resultados obtenidos de la prueba de F.

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	<i>Bacterias</i>	<i>Virus</i>
Media	10.71428571	16.41666667
Varianza	47.6043956	60.25362319
Observaciones	14	24
Grados de libertad	13	23
F	0.790066938	
P(F<=f) una cola	0.33651951	
Valor crítico para F (una cola)	0.411742562	

Se puede observar con esta distribución F, que las varianzas son desiguales al comparar el valor de F contra el valor critico para F, por lo cual, para realizar la distribución de T de Student (cuadro 2) debe realizarse suponiendo varianzas desiguales y con un intervalo de confianza de $p > 0.05$.

Cuadro 2. Resultados obtenidos de la prueba de t.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	<i>Bacterias</i>	<i>Virus</i>
	Variable 1	Variable 2
Media	10.71428571	16.41666667
Varianza	47.6043956	60.25362319
Observaciones	14	24
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	30	
Estadístico t	2.345471159	
P(T<=t) una cola	0.012904192	
Valor crítico de t (una cola)	1.697260851	
P(T<=t) dos colas	0.025808	
Valor crítico de t (dos colas)	2.042272449	

La diferencia del estadístico t contra los dos valores críticos nos permite concluir que, si existe una diferencia significativa entre la media de la estancia intrahospitalaria de los pacientes con agente viral, que con respecto a los pacientes con bacterias como agentes infecciosos, sin embargo la estancia hospitalaria dependerá principalmente del paciente y la evaluación tanto previa del diagnóstico clínico como del resultado obtenido en el laboratorio para poder brindar un diagnóstico más rápido y oportuno al paciente.

X. CONCLUSIONES

- Se logró identificar tanto los agentes virales como los bacterianos asociados a las infecciones respiratorias de los pacientes mediante métodos microbiológicos en el servicio de bacteriología, y moleculares para el caso de los virus, lo cual fue de gran importancia para brindar un diagnóstico oportuno y rápido.
- El uso del sistema microbiológico automatizado permitió obtener el género y la especie bacteriana en las muestras obtenidas para su evaluación.
- En el caso de las muestras negativas a bacterias se logró identificar el agente viral involucrado en la enfermedad apoyada por el sistema de PCR en tiempo real, el cual demostró ser un método sensible y rápido para la detección viral.
- Se pudo correlacionar los datos clínicos con los datos moleculares obtenidos, así como los datos obtenidos del servicio de bacteriología.

XI. PERSPECTIVAS

Este trabajo puede abrir la pauta para llevar a cabo enfoques distintos de analizar, tal es el caso del diseño de una prueba molecular para la detección viral específica del VSR y una prueba molecular para la detección de bacterias respiratorias de difícil crecimiento. Un diagnóstico erróneo puede aumentar la estancia intrahospitalaria del infante, por esta razón cabe señalar que la implementación de una prueba de este tipo es necesaria para poder ofrecer un diagnóstico certero y rápido que agilice el tiempo de espera del paciente.

Así mismo este trabajo puede ser llevado a un enfoque epidemiológico, con el fin de poder obtener una incidencia de los tipos de virus y bacterias respiratorias más frecuentes dentro de la población hospitalaria, aunado a esto, y mediante estos sistemas de detección, puede sumarse el revisar las coinfecciones más frecuentes y las complicaciones que éstas originan en el paciente con bronquitis y neumonía, tanto para los casos pediátricos, como para los adultos, los cuales se han sido poco estudiados.

XII. REFERENCIAS

1. Chalmers T, Singanayagam F, y cols. (2011). Epidemiology, antibiotic therapy, and clinical outcomes in health care–associated pneumonia: a UK cohort study. *Clinical infectious diseases*, 53(2), 107-113.
2. Gadsby M, Russell M, y cols. (2015). Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infection. *Clinical Microbiology and Infection*.
3. Carballal O. (1991). *Virología médica*: Librería El Ateneo Editorial.
4. Castro. (2014). *Bacteriología médica basada en problemas*: Editorial El Manual Moderno.
5. Dasaraju L. (1996). Infections of the respiratory system. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX).
6. Gargano H, yCookson. (2015). Pneumonia Prevention during a Humanitarian Emergency: Cost-effectiveness of Haemophilus Influenzae Type B Conjugate Vaccine and Pneumococcal Conjugate Vaccine in Somalia. *Prehospital and disaster medicine*, 1-10.
7. De León A L, De la Cruz P, y cols. (1997). *Infeción respiratoria aguda*: ISS, Ascofame.
8. Henderson C, Collier D, y cols. (1979). The etiologic and epidemiologic spectrum of bronchiolitis in pediatric practice. *The Journal of pediatrics*, 95(2), 35-39.
9. Van den Hoogen, de Jong, Groen, Kuiken, y cols. (2001). A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature medicine*, 7(6), 719-724.
10. Van Den Hoogen, Osterhaus, yFouchier. (2004). Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *The Pediatric infectious disease journal*, 23(1), S25-S32.

11. Woo L, Huang T, y cols. (2005). Phylogenetic and recombination analysis of coronavirus HKU1, a novel coronavirus from patients with pneumonia. *Archives of virology*, 150(11), 2299-2311.
12. Ksiazek E, Goldsmith Z, y cols. (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, 348(20), 1953-1966.
13. Allander T, Eriksson B, y cols. (2005). Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36), 12891-12896.
14. Allander J, Gupta N, y cols. (2007). Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clinical infectious diseases*, 44(7), 904-910.
15. Yoon Y, Sohn L, y cols. (2014). Impact of preceding respiratory viral infections on the clinical severity of patients with pneumococcal pneumonia. *Influenza Other Respir Viruses*, 8(5), 549-556. doi: 10.1111/irv.12265
16. Dasaraju, yLiu. (1996). Infections of the Respiratory System. In Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed.). Galveston (TX).
17. Wenzel. (1987). *Prevention and control of nosocomial infections*: Williams & Wilkins.
18. García-Rodríguez, yPicazo. (1996). Microbiología médica general. *Mosby*, 378-379.
19. Escobar. percepción sobre las infecciones respiratorias agudas que poseen las madres de niños menores de 5 años que consultan en el hospital distrital de horqueta, año 2.012.
20. Meseguer C, Bellacasa O. (2008). Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(7), 430-436.
21. Martínez T, Menéndez V, Reyes C, Santos D, y cols. (2007). Pulmonary nocardiosis: risk factors and outcomes. *Respirology*, 12(3), 394-400.
22. Moreno-Pérez Martín, García M, y cols. (2015). *Neumonía adquirida en la comunidad: tratamiento de los casos complicados y en situaciones*

- especiales. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP) y Sociedad Española de Neumología Pediátrica (SENP). Paper presented at the Anales de Pediatría.*
23. Ibarra T, Velasquillo. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
 24. Aguilar C, Garcia C, y cols. (2004). Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *Journal of medical virology*, 72(3), 484-495.
 25. Henrickson. (2004). Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *The Pediatric infectious disease journal*, 23(1), S6-S10.
 26. Llor C, yHerrerías. (2006). Etiología bacteriana de la agudización de la bronquitis crónica en atención primaria. *Archivos de Bronconeumología*, 42(8), 388-393.
 27. Carroll, Glanz, Borek, Burger, y cols. (2006). Evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*, 44(10), 3506-3509.
 28. Clemente M, Alarcón M, y cols. (2012). Infecciones respiratorias: etiología y patrones de resistencia en el hospital general de Ciudad Real. *Rev Esp Quimioter*, 31-36.
 29. Corzo V, Rugeles R, y cols. (2015). Prevalencia de virus respiratorios en población menor de 5 años con infección respiratoria aguda en Bucaramanga y las provincias Comunera y de García Rovira, Santander, diciembre del 2012 a diciembre del 2013. *Iatreia*, 27(4-S), S17.
 30. Galván R, yAspa. (2015). Revisión sobre las infecciones no bacterianas del aparato respiratorio: neumonías víricas. *Archivos de Bronconeumología*.
 31. Asner R, Petrich R, y cols. (2015). Is virus coinfection a predictor of severity in children with viral respiratory infections? *Clinical Microbiology and Infection*, 21(3), 264. e261-264. e266.

32. Essa O, Altawalah K, y cols. (2015). Mixed Viral Infections Circulating in Hospitalized Patients with Respiratory Tract Infections in Kuwait. *Advances in virology*, 2015.
33. De León-Nava, y Morales-Montor. (2006). Dimorfismo sexual inmunitario: ¿pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2? *Revista de investigación clínica*, 58, 161-169.
34. Marcone R, Videla E, y cols. (2012). Rinovirus: Frecuencia en niños con infección respiratoria aguda, no internados. *Medicina (Buenos Aires)*, 72(1), 28-32.
35. Olvera S, Gutiérrez Z. (2002). Patogenia de las infecciones respiratorias por virus. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 15(4), 239-254.
36. Bonzel T, Schrotten S, y cols. (2008). Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *The Pediatric infectious disease journal*, 27(7), 589-594.
37. García G, Álvarez R, y cols. (2001). *Infecciones virales de vías respiratorias inferiores en lactantes hospitalizados: etiología, características clínicas y factores de riesgo*. Paper presented at the Anales de Pediatría.
38. Diaz-Romero, Pérez-Gil, Bedolla-Barajas, y cols. (2015). Viral coinfection in acute respiratory infection in Mexican children treated by the emergency service: A cross-sectional study. *World Health*, 1, 6.
39. Martínez. (2010). Rinovirus: ¿ algo más que un resfrío común? *Medwave*, 10(05).
40. Sanchén Casas, Acosta Herrera, Piñón Ramos, y Cordero Rodríguez. (2014). Aislamientos virales en niños y adultos con infecciones respiratorias agudas. *Medisan*, 18(8), 1094-1100.
41. Rabagliati S, Montecinos A, y cols. (2007). Utilidad de la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real en el diagnóstico de infecciones por virus respiratorio sincicial en adultos. *Revista chilena de infectología*, 24(6), 441-445.

42. Valero A, Arias A, y cols. (2005). Contribución del Virus Sincicial Respiratorio y Bacterias a la presencia de Asma en una población adulta. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 30(6), 356-360.
43. Mañas, Martínez, y Ruiz. (2003). Situación actual de la resistencia de la *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4), 450-452.
44. Toro C. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *Iatreia*, 23(3), 240-249.
45. Solórzano-Santos, Ortiz-Ocampo, Miranda-Novales, Echániz-Avilés, y cols. (2005). Serotipos prevalentes de *Streptococcus pneumoniae* colonizadores de nasofaringe, en niños del Distrito Federal. *Salud Pública de México*, 47, 276-281.
46. Mulholland. (1999). Magnitude of the problem of childhood pneumonia. *The Lancet*, 354(9178), 590-592.

XIII. ANEXO

Protocolos de técnicas realizadas.

- **Extracción mediante el kit STRATEC MOLECULAR PATHOGEN KIT**

1. LISIS DE LA MUESTRA:

Se toma 400µL de muestra previamente homogenizada con el uso del vortex y se vierte en el tubo de extracción, este se tapa y se vortexea asta homogenizar la muestra, una vez homogenizada se deja incubar en un termoblock a 65°C durante 15 min.

2. UNION DEL DNA Y RNA.

Se añaden 400µL de solución de unión en el tubo de extracción y se vortexea, posteriormente se transfiere el contenido en un tubo RTA con filtros para centrifugado, se cierra e tubo RTA y se centrifuga durante 1 min a 11000 rpm, posteriormente se retira en filtro y se desecha la camisa de residuos de RTA, el fisltro se coloca en una nueva camisa de residuos de líquidos.

3. PRIMER LAVADO DEL FILTRO DE RTA.

Se añade 500µl del buffer de lavado R1 en el filtro de RTA y se centrifuga a 11000 rpm por un minuto y se desecha la camisa con el contenido, mientras el filtro se transfiere a otra camisa de recepción de residuos.

4. SEGUNDO LAVADO DEL FILTRO DE RTA.

Se añade 700µL del buffer de lavado R2 en el filtro de RTA y se centrifuga a 11000 rpm por un minuto y se desecha la camisa con el contenido, mientras el filtro se transfiere a otra camisa de recepción de residuos, una vez terminado se repite el centrifugado para remover todo el sobrante del buffer R2 en el filtro.

5. ELUCION DEL DNA Y RNA

El filtro se coloca en un tubo ependorff y se añade 60µL del buffer de elución (previamente incubado a 65°C), este se tapa y se centrifuga a 11000 rpm durante 3 minutos, posteriormente se desecha el filtro y se conserva el contenido en el tubo ependorff.

	<p>Please read the protocols carefully prior to the start of the preparation procedure!</p> <p>Add 400 μl of volume adjusted sample material <i>optional: incubate for 10 min at 37°C in a thermomixer (only gram-positive bacteria)</i></p> <p>incubate for 10 – 15 min. at 65°C in a thermomixer <i>optional: incubate for 5 - 10 min. at 95°C in a thermomixer</i></p> <p><i>If you want to add nucleic acids for extraction control, please add at this point</i></p> <p>for optimal binding conditions add 400 μl Binding Solution and mix the sample completely by pipetting up and down or by vortexing</p> <p>transfer the sample on the RTA Spin Filter, incubate for 1 min. centrifuge for 2 min. at 11.000 x g (11.000 rpm)</p> <p>discard the flow-through with the RTA Receiver Tube put the RTA Spin Filter in a new RTA Receiver Tube</p> <p>pipet 500 μl Wash Buffer R1 onto the RTA Spin Filter centrifuge 1 min. at 11.000 x g (11.000 rpm) discard the flow-through and the RTA Receiver Tube transfer the RTA Spin Filter into a new RTA Receiver Tube</p> <p>pipet 700 μl Wash Buffer R2 onto the RTA Spin Filter centrifuge for 1 min. at 11.000 x g (11.000 rpm) discard the flow-through and the RTA Receiver Tube transfer the RTA Spin Filter into a new RTA Receiver Tube</p> <p>to eliminate any traces of ethanol, centrifuge again for 4 min at maximum speed discard the RTA Receiver Tube</p> <p>transfer the RTA Spin Filter into a RNase free 1.5 ml Elution Tube pipet 60 μl of Elution Buffer R (<u>preheated to 65°C</u>) directly onto the membrane of the RTA Spin Filter incubate for 3 min at RT centrifuge for 1 min at 11.000 x g (11.000 rpm)</p> <p>discard the RTA Spin Filter and place the eluted pathogen NA immediately on ice!</p>
--	--

- **ANYPLEX RV16 DETECTION.**

✓ Transcripción reversa:

1. Ponga los tubos de reactivos y de muestras en el instrumento, prepare la siguiente mezcla:

2 µl	Random Hexamer
8 µl	RT Buffer
2 µl	RT Enzima Mix
8 µl	Acido nucleico de muestra
20 µl	Volumen Total

2. Realizar la reacciones de síntesis de cDNA como se muestra a continuación:

Segmento	Número de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	25° C	5 min
2	1	37° C	60 min
3	1	95° C	2 min

✓ Preparación del PCR tiempo real:

A. Preparación de PCR Master Mix

5 µl	4X RV16 A TOM o B TOM
5 µl	4x Anyplex PCR Master Mix (con UDG)
2 µl	Agua libre de RNasa
12 µl	Volumen Total de PCR Mastermix

Nota: Calcular la cantidad necesaria de cada reactivo necesitado basado en el número de reacciones (muestras y controles).

B. Mezcle por inversión 5 veces o en el vortex.

C. Tome una alícuota de 12 μ l de la PCR Mastermix en tubos de PCR y cierre las tapas.

D. Adicione 8 μ l de cada muestra de ácidos nucleicos dentro del tubo.

12 μ l	PCR Master Mix
8 μ l	Muestra de ácido nucleico
20 μ l	Volumen Total de reacción

Una vez concluida la mezcla se programa el termociclador en tiempo real donde se programan el protocolo del experimento, programación de la placa de lectura y el inicio del ensayo, para posteriormente poder iniciar el análisis de datos obtenidos.