



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE VIRUS RESPIRATORIOS: VIRUS SINCITAL  
RESPIRATORIO HUMANO HRSV Y MEPNEUMOVIRUS HUMANO HMPV EN  
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**KARLA ZÁRATE CONDE**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2015**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Ma. del Pilar Granda Macías**

**VOCAL:**               **Profesor: Ruth Edith Martin Fuentes**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Rocio Gabriela Tirado Mendoza**

**1er. SUPLENTE:**     **Profesor: Martha Giles Gómez**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Beatriz Ruiz Villafán**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO BIOLOGÍA DE  
MICRORGANISMOS EN LA FACULTAD DE MEDICINA UNAM.**

### **ASESOR DEL TEMA:**

**Rocio Gabriela Tirado Mendoza**

### **SUSTENTANTE:**

**Karla Zárate Conde**

## **AGRADECIMIENTOS.**

*A la Facultad de Química por permitirme realizar mis estudios en estos años.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina por permitirme realizar este trabajo.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Número de Registro.214154, por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.*

*Al Dr. Daniel Ernesto Noyola Cherpitel. Investigador de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Luis Potosí, México. Por la donación de muestras clínicas para este trabajo.*

*A la M en C. Irma López Martínez. Directora de Diagnóstico y Referencia, INDRE. Por la donación de muestras clínicas para este trabajo.*

*Al Hospital Regional Adolfo López Mateos. Por la donación de muestras clínicas para este trabajo.*

*A mi Jurado a la Q.FB. Ma. del Pilar Granada Macías, a la Q.F.B Ruth Edith Martín Fuentes y Dra. Rocio Tirado Mendoza.*

*A la Dra. Patricia Margarita Tato Profesor Titular C. por permitirme el uso de las instalaciones del laboratorio. †*

*A la Dra. Rocio Gabriela Tirado Mendoza Técnico académico Titular C T.C. por su tutoría y permitirme ser parte de su equipo.*

*A la Biol. Irma Elena López Martínez Técnico Académico Titular B T.C; por el apoyo en el procesamiento de imágenes.*

*A la Biol. Olivia Reynoso Ducoing, Técnico Académico Titular A de T.C., por el apoyo en el uso del equipo de fotodocumentación.*

*A la M. en C. Guadalupe Cerezo Lira por el apoyo en cultivo celular.*

*Al Dr. Rodolfo Acuña Soto Profesor titular C, por su apoyo en el análisis y discusión de resultados.*

*A la Lic. América Inurreta González, asistente de traducción, Facultad de Medicina UNAM. Por su ayuda en textos en inglés.*

*A la Sra. Consuelo Rodríguez Díaz por su apoyo con el material de laboratorio.*

## **AGRADECIMIENTO A PERSONAL**

*Ala Dra. Rocio, por brindarme su apoyo incondicional, por transmitirme esa pasión por la ciencia, por sus consejos y amistad incondicional.*

*A mis amigos y compañeros del laboratorio Sergio, Kike, Ernesto, Fabiola, Daniel Isaac, Carlitos, Sra. Chelo, Norvell, Mau, Vero Sandy, Ara, Moni, Lulú, Laura, Anahí, a quienes les agradezco mucho su apoyo, amistad y todos los gratos momentos de alegría a su lado.*

*A la Dra. Paty Tato por haber sido una persona increíble, por brindarme su apoyo, confianza y permitirme ser parte de su grupo de trabajo. †*

*A José Agustín, Fernando Carbajal, Sra. Elsa por el apoyo y su amistad.*

*A Yazmin, Janet, Ernesto Erik, Haydee, Ángel, Raúl, Antonio, Edgar, Pili, Chío, Celene, Laura, José Juan, José, Fanny por ser parte de mi vida y ser mis amigos entrañables en todo momento.*

*A todos los que conocí en mi estancia por Medicina Irma, Ivonne, Dr. Armando, Pérez, Evelin, Iván, Gaby, Ricardo, Erika, Jorge, Carlos, Paty, Ernesto.*

*Al M en C. Bernardo Lucas por su amistad permitiéndome ser parte de su equipo durante mi estancia en el servicio Social y todos los integrantes de su laboratorio.*

## **DEDICATORIAS**

*A mi familia.*

*A mi papá Carlos por su amor y apoyo incondicional durante estos años de mi vida, por motivarme a nunca rendirme siendo siempre de las mejores, por siempre ganarme las cosas siendo responsable, honesta, trabajadora y todos los valores que me ha inculcado; y que todo se logra a base de sacrificios, con el amor de nuestra familia juntos en todo momento buenas y malas; por haber formado parte de este gran triunfo.*

*A mi mamá Araceli por ser una mujer trabajadora que me ha enseñado a nunca rendirme; dándome aliento en los momentos que más que la necesite, por cada desvelada a mi lado; por ser esa amiga invaluable, mi confidente, maestra, por su amor incondicional en cada paso de mi vida. Gracias a ella no abandone este sueño que ahora se convierte en realidad me decía muchas veces que nada era fácil que con esfuerzo, dedicación, amor lo conseguiría y nunca dijera no puedo al contrario luchar hasta el final con humildad y agradecida con la vida.*

*A mi hermana Paola por ser mi mejor amiga, apoyarme a lo largo de la vida, por siempre estar a mi lado echándome porras para nunca rendirme, por cada desvelada, por ser mi confidente, porque cada una de mis tristezas las convertías en alegrías; por su confianza en que lograría uno de los retos más importantes de mi vida porque jamás dudo en que lo conseguiré, que cada obstáculo era un reto y que yo podía con eso y más.*

*A mi abuelita Ana que fue como mi segunda mamá ya no se encuentra a mi lado pero donde quiera que se encuentre le agradezco por su cariño, amor, por esas alegrías que compartimos juntas; ya que siempre confió en que le daría esa gran satisfacción a mis papás con las bases que han inculcado en mí lo lograría.*

*Ya que en no estará presente en este gran logro la llevare en mi mente y corazón.*

## INDICE

Resumen.....	1
<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	
1.1.- Características del virus hRSV y hMPV.....	3
1.2.- Proteínas virales.....	5
1.3.- Ciclo replicativo.....	7
1.4.- Respuesta Inmune en hRSV y HMPV.....	10
a.- Respuesta inmune innata.....	11
b.- Respuesta inmune humoral.....	12
c.- Respuesta inmune celular.....	13
<b>II.- ANTECEDENTES</b>	
2.1.- Importancia de las infecciones respiratorias agudas.....	15
2.2.- Epidemiología.....	16
2.2.1.-Importancia a nivel mundial.....	16
2.2.2.-Importancia en México.....	17
2.3.- Vacunas y tratamiento.....	18
a.- Vacunas.....	18
b.- Anticuerpos.....	19
c.- Antivirales.....	20
2.4.- Diagnostico.....	21
<b>III.-JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>IV.-PLANTEAMIENTO DEL PROBL.....</b>	<b>26</b>
<b>V.- OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>VI.- MATERIALES Y METODOS</b>	
6.1.- Muestras de pacientes pediátricos con IRA´s.....	28
6.2.- Infección en línea celular HEp-2.....	28

6.2.1.- Propagación de la línea celular.....	28
6.2.2.- Propagación y titulación de hRSV y HMPV de referencia.....	28
6.2.3.- Pases ciegos de muestras clínicas.....	29
6.3.- Ensayos de inmunofluorescencia directa.....	30
6.4.- RT-PCR de hRSV y hMPV.....	30
6.4.1.- Extracción de RNA.....	30
6.4.2.- RT-PCR.....	31
6.4.2.1.- Síntesis de DNA complementario.....	31
6.4.2.2.- Diseño y síntesis de oligonucleótidos para hRSV genes F y G para hMPV genes N y L.....	32
6.4.2.3.- Amplificación del cDNA.....	33
6.4.2.4.- Electroforesis.....	34
<b>VII.-RESULTADOS</b>	
7.1.- Propagación y titulación de hRSV y hMPV.....	36
7.2.- Aislamiento de hRSV y hMPV a partir de muestras clínicas.....	36
7.3.- Ensayos de Inmunofluoerescencia directa.....	37
7.4.- Genotipificación de muestras clínicas.....	39
7.5.-Tipo de muestra.....	41
7.6.- Diagnóstico clínico.....	41
<b>VIII.- DISCUSIÓN Y ANALISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>IX.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>X.- PERSPECTIVAS.....</b>	<b>46</b>
<b>XI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>



**ANEXOS**

**ANEXO I.- Historia Clínica.....55**

**ANEXO II.- Ensayos de IF y RT-PCR..... 66**

## **Resumen.**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que las enfermedades respiratorias son la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años. En la población infantil se consideran al Virus Sincitial Respiratorio humano (hRSV) y al Metapneumovirus humano (hMPV), como la primera y segunda causa de bronquiolitis, respectivamente. En México, las infecciones agudas del tracto respiratorio inferior constituyen la primera causa de mortalidad infantil por enfermedades infecciosas. Sin embargo, en nuestro país no se han realizado estudios epidemiológicos de la presencia e impacto de las infecciones de hRSV y hMPV, en niños menores de 5 años y particularmente en niños menores de dos años. Por ello, es preciso disponer de una herramienta diagnóstica que permita no solo identificar al agente etiológico de la infección, sino que esta identificación se realice en un corto periodo de tiempo para que el resultado obtenido contribuya al tratamiento adecuado y a los datos epidemiológicos de seguimiento de infecciones respiratorias de origen viral. Actualmente, no se ha establecido una relación entre la gravedad de la enfermedad y alguno de los subgrupos virales. Existen reportes de epidemiología que indican diferentes patrones de circulación para los subgrupos virales. Siendo la principal causa de morbimortalidad en niños menores de cinco años. Sin embargo en México no existen datos de patrones de referencia de circulación de los diferentes subgrupos, además no existen métodos de diagnóstico específico y rápido.

Este estudio pretende caracterizar y detectar los subtipos virales, y relacionarlos con las características de la enfermedad. A partir de muestras clínicas de pacientes de 0-5 años hospitalizados por infección respiratoria aguda (IRA) proporcionadas por el InDRE y el Hospital Regional Adolfo López Mateos, se llevó a cabo el aislamiento viral de hRSV y hMPV en la línea celular de carcinoma de laringe humano (HEp-2). Los aislados virales se tipificaron por ensayos de inmunofluorescencia directa y se genotipificaron por RT-PCR. Actualmente contamos con un acervo de 183 muestras. Cada muestra se procesó para su aislamiento viral (tres pases ciegos); el criterio de aislamiento se basó en la observación de efecto citopático (formación de sincitios), los aislados virales se

identificaron por ensayos de inmunofluorescencia directa. Los resultados obtenidos de las 183 de muestras analizadas correspondió un 45.90% a hRSV, 15.84% a hMPV y 38.25% a coinfecciones

Para confirmar la infección por estos virus y determinar el genotipo se realizaron ensayos de RT-PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar los genes F (tipo) y G (Subtipo) de hRSV para hMPV se amplificaron los genes N y L. Los resultados obtenidos de muestras positivas para hRSV fue de 31.69% de las cuales 23.49% fueron RSV-A y 25.68% hRSV-B, y 50.81% hMPV, y el 20.21% correspondió a coinfecciones

## I.-INTRODUCCIÓN.

### 1.1-Características del virus hRSV y hMPV.

Los Virus Sincitial Respiratorio humano (hRSV) y Metapneumovirus humano (hMPV) se clasifican de acuerdo al ICTV (por sus siglas en inglés International Committee on Taxonomy of Viruses) en el orden de los *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae* y subfamilia *Pneumoviridae*. La subfamilia tiene dos géneros: *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*. Dentro de los *Pneumovirus* se incluyen al Virus Respiratorio bovino (bRSV), Sincitial Respiratorio humano (hRSV) y virus de neumonía murina. Y dentro de *Metapneumovirus* se incluyen metapneumovirus aviar (aMPV) y metapneumovirus humano (hMPV) [1].

Los viriones de hRSV y hMPV son virus envueltos; la membrana lipídica deriva de la membrana de la célula hospedera donde se encuentran ancladas tres proteínas de superficie: la de fusión (F), la pequeña hidrofóbica (SH) y la de anclaje (G) [1]. Son virus pleomórficos de 150-300nm de diámetro (Figura1). El hRSV se clasifica en cuatro subgrupos A1, A2, B1, B2, basados en la variabilidad genética de la glicoproteína de superficie de anclaje (G). [18]

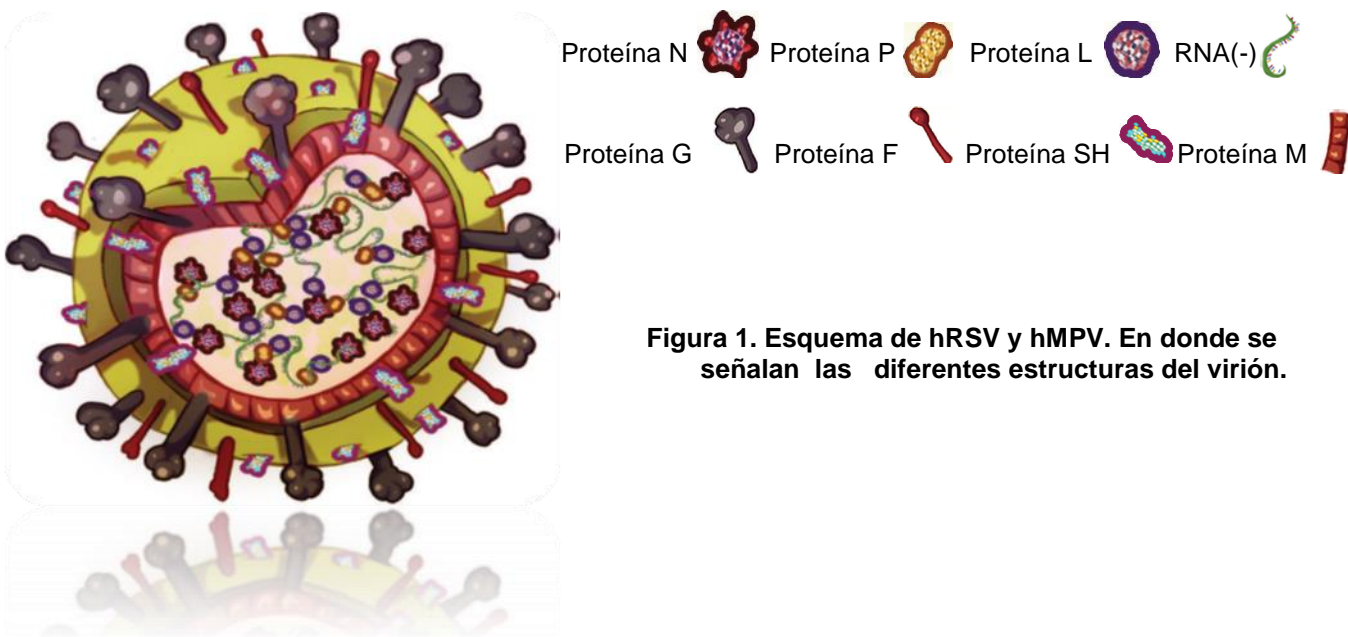
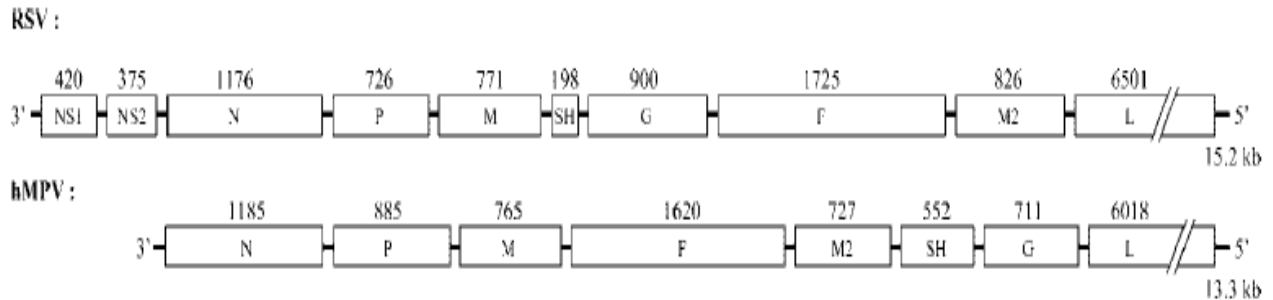


Figura 1. Esquema de hRSV y hMPV. En donde se señalan las diferentes estructuras del virión.

Su genoma es de RNA de polaridad negativa, no segmentado y de cadena sencilla (Figura 2) en el caso de hRSV de 15.2 kb y para hMPV de 13.3 kb. [3].



**Figura 2. Mapa genómico del virus Sincitial Respiratorio humano (hRSV) y Metapneumovirus (hMPV), el orden de los genes es en sentido 3'→5' en el genoma, para el caso de hRSV es -NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2, L-, codifica para 11 proteínas, 9 de ellas proteínas estructurales( N,P,L,G,F,SH,M,M2-1,M2-2) y 2 no estructurales (NS1 y NS2 ) y para hMPV codifica para 9 proteínas integrales (N,P,L,G,F,SH,M,M2-1 ,M2-2).**

La replicación de estos virus se lleva a cabo en el citoplasma e implica la síntesis de una copia complementaria exacta con polaridad positiva.

En el caso de hRSV, la hebra de RNA sentido negativo y 15.2 kb de longitud codifica para 11 proteínas, 9 de ellas proteínas estructurales( N,P,L,G,F,SH,M,M2-1,M2-2) y 2 no estructurales (NS1 y NS2 ) [3]. El genoma viral codifica para mRNA monocistrónicos a los que se les adiciona un cap (metilguanina) en el extremo 5´ y se poliadenilan en el extremo 3´. Cada gen presenta un marco de lectura abierto (ORF), excepto para M2 el cual tiene un traslape con M2-1 y M2-2 [4].

En el caso de hMPV su sola hebra de sentido negativo de RNA de 13.3 kb de longitud codifica para 9 proteínas integrales (N,P,L,G,F,SH,M,M2-1 ,M2-2).

Igual que hRSV cada gen presenta un marco de lectura abierto (ORF) [2].

Las tres glicoproteínas de superficie son: la de fusión (F), la pequeña hidrofóbica (SH) y la de anclaje (G). En la cara interna de la envoltura se localiza la proteína de la matriz (M). La nucleocápside se forma de tres proteínas, la

nucleoproteína(N), la fosfoproteína (P) y la polimerasa viral dependiente de RNA (L) que interaccionan con el RNA viral, formando un complejo ribonucleoproteico de forma helicoidal [4].

## **1.2.-Proteínas virales.**

A continuación se indican, brevemente, las características principales de las proteínas codificadas por el genoma de hRSV y hMPV.

**La nucleoproteína (N)** es la proteína de la nucleocápside y forma parte del complejo ribonucleoproteico, de alrededor de 489 y 553 aminoácidos; el 80% de la región del amino terminal de la proteína presenta una secuencia aminoacídica altamente conservada, mientras que el 20% de la región carboxilo terminal es pobremente conservado. En la replicación viral N tiene varias funciones, intervienen en la encapsidación del RNA genómico viral, se asocia con la P-L polimerasa durante la transcripción y la replicación del genoma viral.

**La fosfoproteína (P)** tiene un alto nivel de fosforilación, forma parte del complejo de la polimerasa, desempeña un papel importante en la síntesis de RNA, participa junto con la proteína L para formar el complejo de la polimerasa viral (P-L) y en conjunto con la proteína N forman un complejo de encapsidación del RNA viral.

**La proteína L (L)** esta proteína tiene un tamaño aproximado de 2200 aa, siendo la de mayor tamaño en el complejo de la polimerasa. De todas las proteínas estructurales es la menos abundante. Esta proteína es la polimerasa viral dependiente de RNA.

**La proteína de matriz (M)** es una proteína no glicosilada del componente interno del virión, se acumula en la membrana plasmática del hospedero. Esta proteína, posee de 341 a 375 aa. Es una proteína básica y algo hidrofóbica. La asociación entre F y G y su interacción con la nucleocápside ayuda en la formación de la partícula viral.

**La proteína de Fusión (F)** Esta proteína es un factor crítico en la infección y la patogenia de la familia *Paramixoviridae*. Induce la fusión de la envoltura viral con

la membrana plasmática de la célula hospedera, también se encarga de la fusión entre células lo que permite la propagación del virus, induciendo la formación de grandes sincitios. La proteína F requiere de un mecanismo de “maduración” que consiste en el corte del precursor F0 para producir el heterodímero F2-F1 unidos a través de enlace disulfuro. Dicho evento de “maduración” sucede en el compartimiento trans-Golgi y es catalizado por una enzima serina proteasa semejante a la Furina [13,106]. Este evento post-traducciona l permite la liberación del péptido de fusión que se encuentra localizado en el extremo amino terminal de la subunidad F1. Por otro lado, la subunidad F2 parece ser determinante en la especificidad de especie del hRSV humano y el hRSV bovino en cuanto a la infección de células humanas y bovinas respectivamente [107].

**La proteína de unión (G).** Es una glicoproteína integral de membrana tipo II, con un único dominio hidrofóbico cerca del extremo N-terminal, que sirve tanto de péptido señal como de anclaje a la membrana (TM) localizada en la envoltura, tiene como función principal el reconocimiento y anclaje a la célula hospedera.

**Proteínas no estructurales NS1 y NS2** Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 funcionan como antagonistas al sistema el IFN tipo I debido a que interfieren con la actividad del factor de transcripción IRF-3[7, 8]. Recientemente se demostró que la expresión temprana de estas proteínas aumentaría la replicación viral, mediante el retraso de la muerte celular programada (apoptosis) [108].

**Proteína pequeña hidrofóbica (SH)** Es una glicoproteína integral de membrana tipo II. Se expresa en la membrana plasmática de las células infectadas y en los viriones. Está anclada a la membrana mediante una secuencia hidrofóbica con el C-terminal orientado extracelularmente [109]. No se conoce exactamente la función de esta proteína, pero algunos estudios sugieren que podría participar en la fusión viral [110], o en el cambio de la permeabilidad de la membrana (como la proteína M2 de influenza A) [111]. Los últimos estudios han informado que actuaría en el bloqueo de la apoptosis de las células infectadas, desconociéndose el mecanismo mediante el cual se produciría este efecto [112.] Es una proteína que se acumula en

las células infectadas en cuatro formas diferentes (SH0, SHt, SHg y SHp), dos de ellas glicosiladas (SHg y SHp). Participa junto con las glicoproteínas F y G en la formación de sincitios en las células infectadas. [16] Se ha podido comprobar que dicha proteína está implicada en el bloqueo de la apoptosis dependiente de TNF $\alpha$  en las células infectadas. [112]

**La proteína M2-1** Tiene la función de factor anti terminación de la transcripción que es esencial para la viabilidad viral, garantizando la posesividad de la transcripción. Asimismo, incrementa la frecuencia de la lectura a través de las señales de terminación de la transcripción en los extremos de los diferentes genes [6].

**El factor regulador M2-2** es responsable de cambiar la condición operacional del complejo de la polimerasa de un modo transcripcional a uno de replicación [5].

### **1.3.-Ciclo replicativo.**

El ciclo de replicación de estos dos virus, es muy similar al de otros virus de RNA de polaridad negativa (Figura 3). El ciclo comienza con la fijación del virus a la célula.

#### **Adsorción**

El primer paso consiste en la unión del virus a las células del epitelio respiratorio, además se ha reportado la infección viral de células dendríticas, macrófagos, monocitos, leucocitos polimorfo nucleares, células NK y neuronas [9,10]. Para el caso de hRSV la proteína G se une a GAGs (glicosaminoglicanos) de la superficie celular que contienen el disacárido heparan-sulfato y condroitin sulfato B. No está claro aún, si la interacción entre la proteína G y los GAGs celulares es el paso de fijación o contacto inicial. Luego de la fijación, el hRSV entra a la célula por fusión de la membrana plasmática con la cubierta viral mediada por la proteína F. Posteriormente, todos los eventos del ciclo replicativo de hRSV ocurren en el citoplasma, sin intervención del núcleo. De hecho, varios estudios muestran que la proteína G de hMPV puede no interactuar con los receptores celulares con los



cuales interacciona hRSV, por ejemplo los GAGs (como heparán sulfato y condroitin B), así como lectinas de tipo C (proteína surfactante) [11,12].

En el caso de hMPV se ha reportado que la integrina  $\alpha\beta 1$  puede actuar como receptor celular para las proteínas F y G. [12]

### **Fusión.**

El mecanismo de fusión se basa en cambios irreversibles en la conformación de la proteína F glicoproteína de superficie se sintetiza a partir de un precursor  $F_0$  que después se escinde dos sub-unidades,  $F_1$  y  $F_2$  unidas por un puente disulfuro. [13,14]

La subunidad  $F_1$  tiene tres dominios funcionales: a.- en el extremo N-terminal, un péptido de fusión, que se inserta en la membrana de la célula hospedera durante el proceso de fusión [17-21]; b.-una interacción entre HR1y HR2 que desempeñan un plegamiento de la proteína y la actividad fusogénica, c.-y una región altamente conservada (CBF1) entre las dos regiones de HR1 y 2, que participa en el plegamiento y homotrimerización de F y en el extremo C-terminal con una región transmembranal (TM) de anclaje que se inserta en la envoltura viral y una cola intracitoplasmática (C-cola) [16]. La unidad de  $F_2$  comprende con una péptida señal (PS) de la proteína en el extremo del N-terminal y una región altamente conservada (CBF2), La función de la región CBF2, y de hecho la proteína  $F_2$ , aún tiene que ser caracterizada. Cabe señalar que en la mayoría de los virus de la familia *Paramyxoviridae*, la fusión se produce en condiciones de pH neutro. Sin embargo algunos estudios con hMPV-A, han demostrado que la fusión se estimula en pH ácido (pH=4.3-5.0) [15, 11].

### **Eventos post-entrada.**

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

### **Replicación y transcripción del genoma.**

Los genomas virales en el extremo 3' tienen una región rica en uracilos, importantes para el inicio de la transcripción. Hay recalcar que tiene un solo promotor para todo el genoma viral y si la polimerasa se encuentra con las secuencias de paro, es susceptible a disociarse y reiniciar la síntesis de RNAm, esto conduce a un gradiente de RNAm, lo que indica que su concentración va disminuyendo desde el extremo 3' hacia el 5' [23].

Para la replicación, la proteína M2-2 cambia el modo operacional de la polimerasa de transcripción a replicación. Se inicia en el promotor del extremo 3' y la polimerasa prepara la síntesis del RNA sintetizando un antígenoma que es el templado para sintetizar el genoma de sentido negativo que se incorporará a los viriones. Este último proceso, de replicación se asocia con la nucleoproteína (N) conforme se van sintetizando [24].

### **Traducción de proteínas y gemación del virión.**

Las glicoproteínas de la envoltura F, G, SH sufren modificaciones post-traduccionales en el aparato de Golgi, para después dirigirse a la membrana citoplasmática de la célula hospedera. La proteína M se localiza en la cara interna de la membrana citoplasmática, donde se lleva a cabo el proceso final de ensamblaje al interactuar con las proteínas de la nucleocápside, y posteriormente llevar a cabo la gemación [25].

Además, durante este proceso se producen nuevas proteínas P, N, L, que se asocian al genoma viral para formar nucleocápsides, que se incorporarán a los viriones recién sintetizados durante la gemación en la membrana celular.

### **Liberación y fusión célula-célula.**

Los cambios morfológicos que se pueden observar en las células infectadas incluye el aumento del citoplasma, además la disminución de la actividad mitótica,

observándose células multinucleada y 'redondeo focal,' con la formación potencial de las células gigantes multi-nucleadas o sincitios [26].

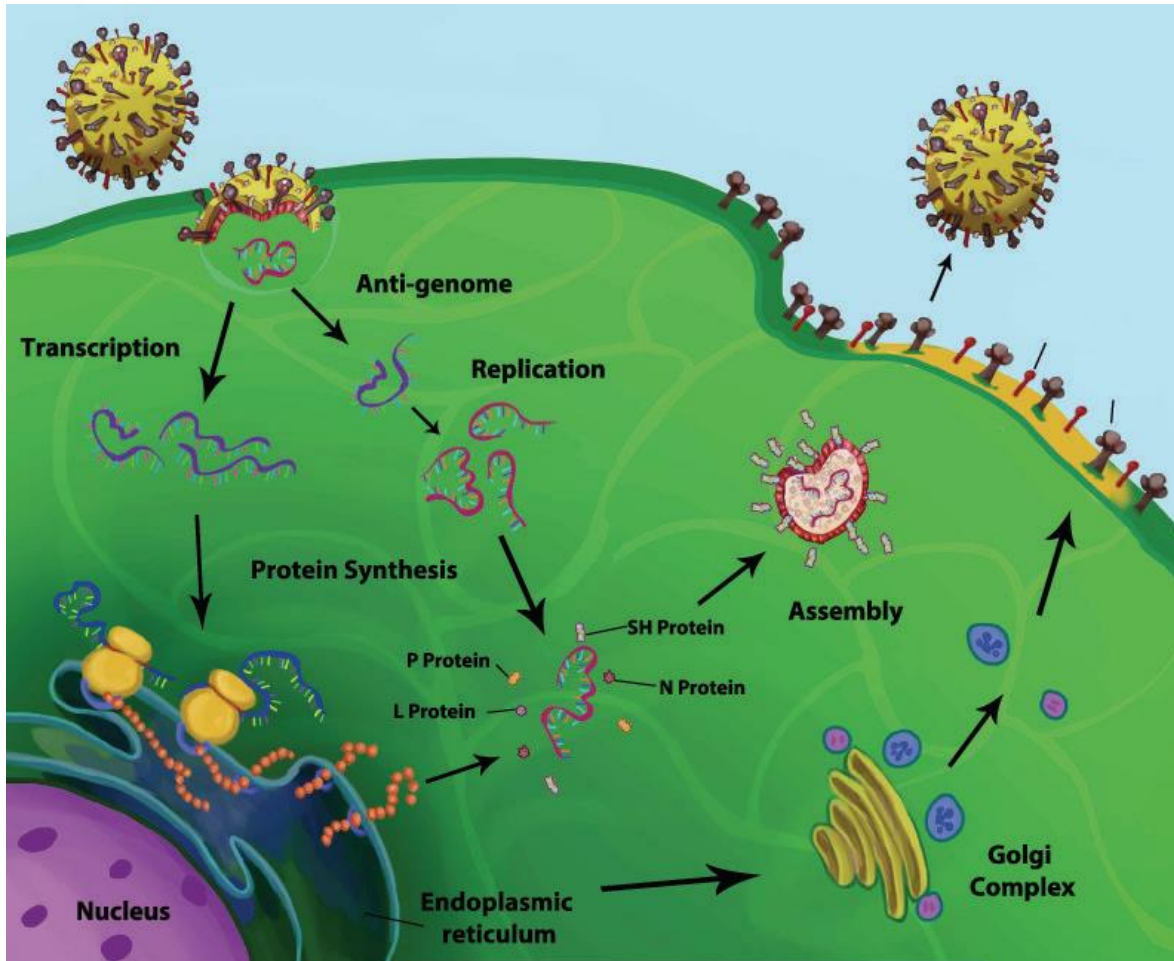


Figura 3. Representación del ciclo replicativo del virus Sincitial respiratorio humano (hRSV) [VI]

#### 1.4.-Respuesta inmune en RSV y MPV.

En ambos casos hRSV y hMPV se asocian con una variedad de síntomas y diagnósticos de infecciones del tracto respiratorio superior e inferior. Si la infección no es severa, la duración de los síntomas es generalmente menor a una semana; Sin embargo, si la infección no es tratada adecuadamente y se asocian otros factores, tanto del hospedero como del virus, se pueden adquirir enfermedades

respiratorias inferiores graves, como bronquiolitis, neumonía, croup (síndrome caracterizado por estridor, tos seca y disfonía) /laringotraqueobronquitis y asma.

#### **a) Respuesta inmune innata.**

En una infección viral aguda, se conoce que se estimula una respuesta caracterizada por la inducción de interferón de tipo I (INF), por ello los virus de RNA utilizan mecanismos para evadir esta respuesta antiviral, que implican la evasión de IFN y regulación de su respuesta. Esta producción puede deberse a la activación de la vía de señalización JAK/STAT. En el caso de los receptores tipo Toll (TLRs) y las helicasas (RIG-I y MDA-5) son los receptores de reconocimiento de patrones más comúnmente activados por infecciones virales, iniciándose una cascada de señalización que desencadena la expresión de citocinas proinflamatorias y mediadores inmunes. Algunos de los TLR que están situados en el compartimento celular endosomal, ayudando a la maduración de células dendríticas, mientras que RIG-I y MDA-5 son sensores citoplasmáticos que se han identificado como esenciales para la inducción de IFN por varios virus. La proteína mitocondrial de señalización antiviral (MAVs), es una proteína adaptadora que une a RIG-I y MDA-5 para la activación de IRF3 y NFκ-B, que en última instancia conduce a la activación de la producción de IFN de tipo.

Particularmente, en el caso de hRSV las proteínas NS1 y NS2 son las responsables de reducir la inducción de INF tipo I, se encargan de la inhibición del factor de transcripción IRF-3, de igual forma incrementa la degradación de STAT-2, lo cual tiene un efecto en la vía JACK/STAT y por lo tanto del INF.

Existe poca información sobre la interacción de hMPV y el sistema inmune innato. Sin embargo, en cultivos celulares, hMPV ha demostrado ser inductor de la vía de IFN de tipo I, que tiene lugar mediante la vía RIG-MAVS, sin la participación de MDA-5. Diferentes proteínas de hMPV se han sugerido para evadir esta vía. Por ejemplo, la fosfoproteína de hMPV-B ha demostrado ser un antagonista de IFN.

Existen pocos reportes sobre la respuesta inmune innata en la infección por hMPV en los seres humanos, sin embargo, se ha propuesto que pueden existir diferencias entre las respuestas que presentan los hospederos ante una infección por hMPV o hRSV. Existen estudios realizados con ratones BALB/c infectados con hMPV demostraron significativamente, mayores cantidades de IFN- $\alpha$  que los de ratones infectados con hRSV. Estos hallazgos sugieren que el hMPV puede inducir una respuesta diferente a hRSV en el hospedero.

#### **b) Respuesta humoral.**

La prevalencia de anticuerpos contra hRSV y hMPV aumenta con respecto a la edad, aunque una proporción importante de las personas seropositivas, no presentan altos títulos de anticuerpos neutralizantes. La infección induce aumentos en el número de células B y la producción en suero y mucosa de anticuerpos IgM IgA e IgG siendo estos importantes en la protección a la enfermedad, sin embargo a menudo fallan al neutralizar al virus.<sup>[4,43]</sup>

La respuesta de anticuerpos a la infección primaria es ineficaz, implica la producción de anticuerpos parcialmente neutralizantes contra la proteína G y F, pero estas respuestas son reforzadas (especialmente IgG e IgA) en una reinfección. <sup>[105]</sup>.

Se ha demostrado que la proteína F de hMPV es un objetivo principal de anticuerpos neutralizantes<sup>[44]</sup>. Sin embargo como se ha observado en hRSV, la protección mediada por anticuerpos no es suficiente para evitar patogénesis de reinfecciones. Un estudio en macacos mostraron disminución de la inmunidad a las 12 semanas y una pérdida completa de la protección en 8 meses <sup>[45]</sup>.

#### **c) Respuesta celular.**

Esta respuesta es esencial para limitar la replicación del virus y contribuir a la resolución de la infección. Sin embargo algunos elementos de la respuesta inmune parecen estar relacionados con la fisiopatología de las infecciones respiratorias de

las vías inferiores, además, de tener relación con asma en niños que padecen bronquiolitis. Dado que prácticamente todos los niños presentan infección por estos dos agentes en los primeros años de vida, pero no todos desarrollan bronquiolitis y la gravedad de esta es variable, se ha propuesto que la respuesta inmune del paciente contribuya a las diversas manifestaciones de las infecciones causadas por este virus [113]. La respuesta inflamatoria a la infección se inicia en las células del epitelio respiratorio. Estas células producen diversas citocinas y quimiocinas en respuesta a las infecciones virales. Las personas con bronquiolitis producen IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, proteína inflamatoria de macrófagos-1  $\alpha$  y RANTES. En respuesta a las citoquinas, se produce una infiltración de células inflamatorias, predominantemente neutrófilos. Los macrófagos también participan en la respuesta inmune inicial. Asimismo, también se atraen linfocitos B, basófilos y eosinófilos y hacia las vías respiratorias[114].

Estos liberan diversas moléculas como histamina, leucotrienos e IgE, que se relacionan con la broncoconstricción e hiperreactividad bronquial.

Una vez iniciada la respuesta inmune, los linfocitos T cooperadores (Th) son activados, generando una respuesta adaptativa de tipo Th1 o Th2. La producción temprana de INF- $\gamma$  es primordial para que se presente una respuesta predominante Th1, mientras que una baja producción de éste, se asocia con una respuesta que es preponderantemente de tipo Th2, presentándose eosinofilia pulmonar persistente [114].

En la activación de citocinas en pacientes con primoinfección por hRSV, los niveles de las mismas entre sujetos con bronquiolitis y con infección respiratoria aguda alta se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, observando una mayor activación de citocinas de tipo Th2 en los pacientes que presentaron bronquiolitis en comparación con los que presentaron IRAA, en donde existe una mayor relación con la respuesta de tipo Th1. Esto sugiere que las manifestaciones clínicas de la infección por hRSV se relacionan con el balance entre las respuestas Th1/Th2 [115].

Se desconoce si la tendencia al predominio de una respuesta sobre la otra es inducida por hRSV, o se debe a una tendencia determinada genéticamente. Se ha mostrado que personas con algunas variantes del receptor de citoquinas CCR5 podrían tener una mayor susceptibilidad a las infecciones por hRSV. En otros estudios, se ha encontrado que la presencia de ciertos polimorfismos de una sola base (SNP) en el TLR4 se asocia significativamente con un mayor riesgo de desarrollar una infección severa por hRSV [116].

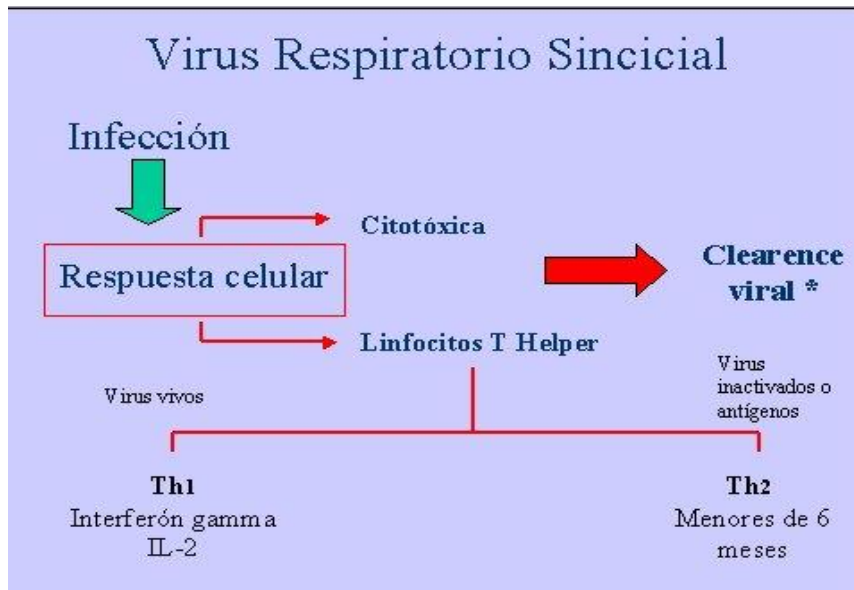


Figura 4.- Respuesta inmune de hRSV. [VII]

## **II.-ANTECEDENTES.**

### **2.1- Importancia de las infecciones respiratorias agudas (IRA).**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que las enfermedades respiratorias son la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años, las cuales constituyen un amplio grupo de enfermedades por diversos agentes causales que afectan las vías respiratorias. La mortalidad por Infección Respiratoria Aguda (IRA) se estima en 3,9 millones y 94,037, 000 de morbilidad al año en niños de 0-5años [11]. Las infecciones respiratorias agudas son una causa importante de morbilidad y mortalidad en niños en el mundo. Hasta 70% de las infecciones del tracto respiratorio superior son de etiología viral [28].

Entre los numerosos microorganismos causantes, los virus se reconocen como los agentes etiológicos predominantes en las infecciones respiratorias agudas, tanto en niños como en adultos. Los agentes etiológicos virales más comunes en las infecciones respiratorias incluyen: Adenovirus (AdV), Influenza A y B (Flu A y Flu B), Parainfluenza 1, 2, 3 y 4 (PIV 1, 2, 3), Virus Sincitial Respiratorio humano (hVSR), Metapneumovirus humano (hMPV), Coronavirus Humano (hCoV), Rinovirus (RV), Enterovirus (EV) y Bocavirus Humano (hBoV) entre otros[29]. Y entre de estos, el hRSV es el agente etiológico que se presenta con mayor frecuencia en las enfermedades respiratorias agudas [30].

En México, las infecciones agudas del tracto respiratorio constituyen una importante causa de mortalidad infantil por enfermedades infecciosas. Sin embargo, en nuestro país no se han realizado estudios epidemiológicos de la presencia e impacto de las infecciones de hRSV, hMPV en enfermedades del tracto respiratorio inferior (bronquitis, laringotraqueobronquitis (croup) y neumonía), en niños menores de 5 años. La mortalidad infantil en niños entre 0-4 años de edad, en el 2010 se reportaron 26, 712, 790 casos de IRA [14]. A pesar de la alta tasa de morbimortalidad por infecciones respiratorias reportada en México



se conoce poco acerca de su etología. Existen informes de patógenos virales respiratorios en niños en nuestro país, sin embargo la información es limitada [31-41].

La infección por hRSV también puede infectar macrófagos y monocitos, interfiriendo con sus funciones fagocíticas. Asimismo la infección a células dendríticas, induce maduración e interfiere con la inducción del INF- $\alpha$ .

Durante la bronquiolitis, se puede observar destrucción de células epiteliales ciliadas e infiltración de células mononucleares y hay un exceso de moco, lo cual provoca obstrucción de bronquios y alveolos, causando enfisema.

Mientras que para hMPV es la segunda causa de bronquiolitis y neumonía viral.

## **2.2.-Epidemiología.**

### **2.2.1.- Importancia a nivel mundial.**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que las enfermedades respiratorias son una causa de muerte en niños menores de 5 años. En la población infantil se consideran al hRSV, y hMPV como el primero y segundo agente causal de bronquiolitis, respectivamente [WHO 2012]. Las IRA's son la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años 3,9 millones y 94,037,000 de morbilidad al año 2010 [IV].

Se estima que en países en desarrollo ocurren 151,8 millones de casos nuevos anuales (95% de la incidencia mundial en menores de cinco años); 7 a 13% de los casos resultan en hospitalización [42,73].

Existen reportes que señalan al hRSV como el responsable de 3.1 millones de muertes por año que representa el 2.1% de 64 millones de casos [74]. Aproximadamente, 25% a 40% tiene signos o síntomas de la bronquiolitis o neumonía. En el caso de hMPV se reporta una incidencia menor al 1%

### **2.2.2.- Importancia en México.**

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

Se estima que más del 50% de las infecciones respiratorias son de origen viral. hRSV y hMPV siendo la primera y segunda causa respectivamente, responsables de las infecciones respiratorias agudas a nivel mundial en menores de 5 años, personas de la tercera edad e inmunocomprometidas [1,43]

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

Existen reportes epidemiológicos en nuestro país, entre los cuales se encuentra el grupo de Noyola, que realizó un estudio de epidemiología molecular para hMPV, relacionado a características clínicas en el estado de San Luis Potosí en el año 2005 [44]. Además se encuentra el trabajo reportado por Cabello y colaboradores, que realizaron la caracterización y detección viral de muestras de pacientes pediátricos en una localidad de Tlalpan en la Ciudad de México en el año 2006 [47]. En el 2007 se realizó otro estudio por Ayora en Yucatán, detectando diversos virus respiratorios mediante RT-PCR durante los meses de verano [45].

En México, la mortalidad anual por infecciones respiratorias en 2013 fue 63 792.06 casos por 5 663 088 niños de 1 a 4 años y 1 091.53 casos por 2 420 210 en niños menores de 1 año. A pesar de la gran morbimortalidad por infecciones respiratorias reportada en México se conoce poco acerca de su etiología.

En el 2009 se llevó a cabo un trabajo de detección de los principales virus respiratorios en el Instituto Nacional de Pediatría (INP), con relación a diversas manifestaciones clínicas [46].

Uno de los reportes epidemiológicos más recientes, fue el publicado en 2012, realizado en el periodo de 2004-2008, este estudio se realizó en el Hospital Infantil

de México Federico Gómez. La detección de los virus respiratorios : Adenovirus (AdV), Influenza A y B (Flu A y Flu B), Parainfluenza 1, 2, 3 y 4 (PIV 1, 2, 3), Virus Sincitial Respiratorio humano (hRSV), Metapneumovirus humano (hMPV), Coronavirus Humano (hCoV), Rinovirus (RV) mediante ensayos de IF de un panel de virus respiratorios, sin embargo es importante señalar que estos autores no reportan la presencia de hMPV, debido a que no lo incluyeron en el panel de detección [48].

Conocida la importancia e impacto de las IRA's en nuestra población mexicana infantil de 0-5 años, se debe contar con una vigilancia epidemiológica nacional actualizada de los virus respiratorios que circulan a lo largo del año. Se han realizado muy pocos estudios epidemiológicos representativos, la mayoría de ellos realizados por ensayos de IF (Inmunofluorescencia) que representa una desventaja ya que se pueden tener falso negativos. Por lo tanto, este trabajo pretende fortalecer las redes de vigilancia epidemiológica mediante una metodología molecular que permita conocer de manera más precisa la presencia, prevalencia de las infecciones respiratorias como agentes etiológicos virales del tracto respiratorio con un diagnóstico rápido, sensible y costeable para dar un adecuado tratamiento.

## **2.3.- Vacunas y tratamiento**

### **a.-Vacunas.**

Existen diversas estrategias empleadas en el diseño de vacunas contra hRSV y hMPV. Estas incluyen vacunas recombinantes, atenuadas, quiméricos, y de subunidades [49-51].

La primera vacuna diseñada para hRSV, consistió que a partir de un virus inactivado tratado con formalina. El uso de esta vacuna manifestó un aumento en la severidad de la enfermedad con un aumento en el número de hospitalizaciones y muerte. Varios mecanismos se han propuesto como responsables de este

fenómeno, inmuno-potenciación de la infección y un desequilibrio de la relación Th1/Th2 con un sesgo hacia el perfil Th2 [52-55].

Además, también para hRSV se ha empleado la genética reversa, es decir; se realizan mutaciones directamente sobre la secuencia del RNA viral. De esta manera se tienen cepas mutantes con proteínas deletadas a partir de las cepas atenuadas sensibles a la temperatura [56].

Del mismo modo se han desarrollado vacunas para hRSV basadas en subunidades. Un ejemplo de ello la vacuna BBG2Na con base en la glicoproteína G, resultó ser prometedora en seguridad e inmunogenicidad. Se encuentra en fase III, contiene la región central más conservada de la glicoproteína G (G2Na) con los aminoácidos 130 a 230, unida a la porción fijadora de albúmina de la proteína G de estreptococos con el fin de aumentar la vida media de la primera. La vacuna BBG2Na se obtiene por síntesis en *Escherichia coli* transfectada con los genes necesarios con lo cual se evita la glicosilación de la proteína G que ocurre en células eucariotas de mamíferos [57].

Para hMPV, se continúa desarrollando vacunas, considerando que es un virus reemergente. Se han evaluado vacunas químicas donde se sustituyen las proteínas N y P de hMPV.

La proteína F se ha utilizado para desarrollar vacunas candidatas de subunidades. La vacunación en animales de laboratorio con la proteína F soluble ha demostrado inducir la inmunidad protectora contra hMPV A y B [58]. Además, la vacunación de DNA con un plásmido que lleva el gen F o la vacunación con una proteína F purificada soluble que carece del dominio transmembranal, ha inducido inmunidad protectora [59].

Para el caso de MPV se pretende emplear vacunas con el uso de VLP's (Virus-like particles). [120-122]

## **b.- Anticuerpos.**

La administración de una versión humanizada de un anticuerpo monoclonal contra la proteína F del hRSV (Palivizumab) protege a individuos alto riesgo de desarrollar infección contra el hRSV [60-64]. Desafortunadamente, su utilización es costosa y existe preocupación sobre la aparición de nuevas cepas virales resistentes debido a la naturaleza cuasi-especie de los virus tipo RNA. Afortunadamente, se han diseñado mediante mutagénesis nuevas variantes de Fab y de anticuerpos IgG, los cuales muestran una mejoría en cuanto a su capacidad de neutralizar el hRSV en un orden que va desde 44 hasta 1.500 veces sobre el Palivizumab [65].

## **c.- Antivirales**

Aunque la evidencia experimental indica que la Ribavirina interfiere de manera eficiente con la transcripción y la replicación viral, los resultados clínicos son desfavorables y su utilidad se ha dirigido para tratar la infección en un grupo especial de individuos inmunodeficientes y durante los primeros días de un curso severo de la enfermedad [57,67-69].

Sin embargo, el campo de investigación en antivirales ha presentado interesantes propuestas. La formulación RFI-641, previene la unión y la fusión del virus con la membrana celular [70-71]. La inhalación de RFI-641, reduce significativamente la carga viral en el tracto respiratorio inferior de los monos verdes africanos. Sin embargo, la droga falló en mostrar una reducción consistente en el tracto respiratorio superior [72-74]. Lo anterior parece indicar que la droga RFI-641 tiene potencial en proteger contra la infección. Estos antivirales son utilizados para el tratamiento de hRSV.

Tabla 1- Profilaxis contra la infección de Sincitial respiratorio.

Estrategia Profiláctica	Mecanismo	Ejemplo	Observación
Antivirales	Mutación	ribavirina, viramidina, merimepodib	Efecto agonista hRSV, con efectos adversos [78]
	Inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa	ribavirina, viramidina, merimepodib [79-83]	
	Efectos inmunoestimulantes	Ribavirina	
	Subunidades	BBG2Na-Proteína G	
Inhibidores de fusión	Inhibición de la unión a la proteína de fusión de células	Peptido-HR121,HR212,RhoA Químico-BMS-433771,RF-614	Inhibidores de la fusión de péptidos prometedores contra hRSV; inhibidores de la fusión química con efectos secundarios [84-88]
Nanoparticulas	Inhibición de unión a célula	Nanoparticulas silvestres, nanoparticulas de oro siRNA-ALN.RSV01	Campo emergente, estudios concluyentes requeridos[89-90]
Terapia anti sentido	RNA de interferencia	Oligómeros morfolinos fosforodiamidato Extractos de plantas: <i>Cinnamomum cassia</i> , <i>Cimicifuga foetida</i> ,	Efectivo y seguro ALN-RSV01 fase completa IIb, clínica segura [91-95]
Etnobotánicos	Probables inhibidores de Fusión, antiinflamatorios		Sheng-Ma-Ge-Gen-Tang, Ginger, etc. decocción modificada Dingchuan, Liu-He-Tang, extracto de agua de regaliz[96-102]

## 2.4.- Diagnóstico.

El diagnóstico específico del hRSV y hMPV se hace mediante la detección del virus, sus antígenos o por el hallazgo de secuencias específicas de su material genético en las secreciones respiratorias [75]. El tipo y calidad de las muestras son muy importantes para garantizar la sensibilidad y especificidad de las pruebas que se llevan a cabo para la detección viral.

El requisito primordial y principal cuando se analiza las muestras del tracto respiratorio es que estas deben contener el mayor número posible de células epiteliales; que son en las que fundamentalmente se replica y se puede encontrar el virus. Para detectar los microorganismos asociados a las enfermedades respiratorias existe una amplia variedad de técnicas para tomar muestras como los hisopados nasales, nasofaríngeos, aspirados nasofaríngeos, lavados nasales, esputo y muestras de saliva entre otras, las cuales deben ser obtenidas durante los primeros días de la enfermedad. El transporte de las muestras debe realizarse

refrigeradas (a 4 °C) con objeto de asegurar la infectividad de las partículas virales para el caso del aislamiento en células. La recuperación de los virus respiratorios se favorece con un medio de transporte adecuado, que consiste en una solución salina a pH neutro con estabilizadores proteicos, como albúmina sérica bovina, antifúngicos y antibióticos para reducir el crecimiento de bacterias y hongos que pueden estar presentes en la muestra [117].

Se ha demostrado que los lavados nasales o aspirados nasofaríngeos son las muestras que ofrecen la mayor sensibilidad para la detección del virus cuando se compara con hisopados nasofaríngeos [76]. Sin embargo la toma de hisopados es menos agresiva para el paciente, no requiere equipos especiales y también pueden ser tomadas en pacientes que no estén hospitalizados. Durante la toma del hisopado hay que tener en cuenta obtener células de la nasofaringe infectadas con el virus, para este fin se ha visto que los hisopos fibrosos son más efectivos y mejoran la calidad de la muestra incrementando la posibilidad de obtener un buen resultado diagnóstico [103-104].

En el diagnóstico de la etiología de la infección respiratoria aguda resulta fundamental, debido a que representa una ayuda importante en el manejo del paciente y el control de los brotes epidémicos anuales, así sea causado por virus como influenza, adenovirus, parainfluenza o virus sincitial respiratorio, conocer el agente implicado permite disminuir el uso de antibióticos, orientar el manejo individual del paciente, aislarlo y de esta forma interrumpir la transmisión. Este diagnóstico puede adoptar una estrategia doble; por una parte, la que se fundamenta en métodos directos, como los que son capaces de recuperar el virus mediante su aislamiento en cultivo celular y aquellos que permiten detectar el virus en las secreciones respiratorias del paciente (detección de antígenos y/o de ácidos nucleicos). Por otra parte, el diagnóstico indirecto valora la presencia de una respuesta inmunitaria de tipo humoral mediante la detección de anticuerpos específicos en el suero.

La detección en las secreciones, de antígenos y ácidos nucleicos virales permite la realización de un diagnóstico rápido, que ayuda a la toma de decisiones terapéuticas. Por el contrario, el aislamiento en cultivo celular es un diagnóstico, costoso y demorado, pero de extraordinaria importancia en la caracterización epidemiológica, antigénica y filogenética de estos virus. En la actualidad, el interés de la serología se encuentra principalmente en la realización de estudios poblacionales para la evaluación de la cobertura vacunal.

El aislamiento viral depende de diversos factores, entre los cuales se encuentran la calidad de la muestra clínica, los reactivos requeridos en el proceso, la susceptibilidad de los cultivos celulares elegidos y la experiencia técnica del personal que realiza los diferentes procedimientos. Una vez que los virus se aíslan, se facilita su análisis posterior, por ejemplo, la caracterización de cepas circulantes, los estudios fenotípicos de resistencia a antivirales y el descubrimiento de nuevos virus o serotipos. [118]

El aislamiento ha sido considerado el estándar de oro para la detección de virus y es el método de referencia por el cual se puede hacer la confirmación de la infectividad del virus; la identificación de los virus capaces e incapaces de infectar y causar enfermedad; cosa que no es posible hacerse usando métodos de amplificación de ácidos nucleicos, ni con, la de detección de antígenos virales, volviéndose de esta forma el aislamiento viral en cultivo celular una herramienta muy útil [118].

Hay que tener en cuenta que el buen manejo y la preparación de las muestras clínicas para este fin debe ser el ideal, debido a que los virus respiratorios se inactivan muy fácilmente.

Para el aislamiento de hRSV y hMPV se usan frecuentemente cultivos de células Hep-2, aunque también suelen implementarse cultivos de células primarias de riñón de mono o fibroblastos humanos, luego de la infección de estas células, se



espera la aparición de efecto citopático (ECP) dentro de los 3–7 días siguientes; dicha aparición de ECP permite la identificación de la replicación viral en la monocapa de células, observándose células multinucleadas. Posteriormente, la caracterización del virus aislado se realiza por inmunofluorescencia mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, esta caracterización se hace muy importante en los casos en los que el ECP no es claro o muy difícil de apreciar.

Otro método es la detección de los antígenos virales a pesar de necesitar una alta calidad de muestra tienen como ventaja ser independientes de la capacidad infectiva del virus, además permiten una obtención rápida de resultados. Cabe señalar también que una de las desventajas más frecuentes es la dificultad de interpretación de los resultados, porque la especificidad se verá reflejada en el evaluador y su experiencia; adicionalmente la sensibilidad de estas técnicas suele ser baja. Estos métodos son usados para la detección directa de antígenos virales en la muestra clínica o en cultivos celulares infectados previamente. Los anticuerpos utilizados para el diagnóstico van dirigidos contra los antígenos que se sitúan en la superficie del virus.

Los métodos moleculares implementados para el diagnóstico, permiten la detección de ácidos nucleicos basados en la búsqueda y el reconocimiento del genoma viral en el cultivo celular o en la muestra clínica. La reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) es la técnica más empleada. En el caso del hRSV, antes de la reacción de amplificación debe hacerse una reacción de transcripción inversa para transformar el RNA del virus en cDNA. Regularmente, las técnicas de PCR están diseñadas para evaluar la presencia de secuencias génicas muy conservadas, como las que codifican para las proteínas G y F, y el evaluar la proteína G también podría permitir la diferenciación entre los subtipos A y B del hRSV [121].

### **III.- JUSTIFICACIÓN.**

Ambos virus hRSV y hMPV son de gran importancia a nivel mundial por ser los dos primeros agentes etiológicos de infecciones respiratorias en niños menores de cinco años, causando cuadros respiratorios desde leves hasta enfermedades respiratorias severas, como bronquiolitis, bronquitis y neumonía. Sin embargo, en nuestro país no existen patrones de referencia de circulación de los diferentes subgrupos virales por estaciones, además no existen método de diagnóstico rápido y específico. Por lo tanto es importante implementar técnicas moleculares para identificar y tipificar al agente viral para poder dar un diagnóstico acertado de las infecciones causadas por ambos virus.

#### **IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Los reportes epidemiológicos moleculares indican diversos patrones de circulación para los subgrupos virales. En nuestro país no existen reportes estadísticos sobre patrones de circulación de los subgrupos virales, además de no contar con un método de diagnóstico rápido y específico por lo que es indispensable montar un método de diagnóstico molecular para apoyo de detección y vigilancia epidemiológica en México.

## **V.-OBJETIVOS.**

### **General**

Determinar la prevalencia, en el periodo estacional invierno-primavera, de los virus hRSV y/o hMPV que circulan o co-circulan en nuestra población, para el fortalecimiento de las redes de vigilancia epidemiológica mediante técnicas moleculares rápidas y específicas para genotipificar ambos virus.

### **Particulares**

1. Aislar a los virus referencia para hMPV y hRSV.
2. Aislar hRSV y hMPV a partir de exudados faríngeos y nasofaríngeos de pacientes pediátricos.
3. Realizar ensayos de inmunofluorescencia directa a los aislados virales para detectar la presencia de hRSV y hMPV en las muestras.
4. Corroborar la infección por hMPV y hRSV mediante ensayos de RT-PCR con los oligonucleótidos diseñados.
5. Determinación de hRSV y hMPV por RT-PCR para muestras positivas y negativas previamente detectadas por IF.
6. Relacionar la frecuencia y características virales con características clínicas en las muestras.

## **VI.- MATERIALES Y METODOS.**

### **6.1.-Muestras de pacientes pediátricos con IRA.**

Este estudio se llevó a cabo con muestras obtenidas en colaboración con el InDRE (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos), la Facultad de Medicina de la UASL y Hospital General Adolfo López Mateos (Anexo 1).

### **6.2.-Infección en línea celular HEp-2.**

#### **6.2.1.-Propagación de la línea celular.**

Para la propagación, mantenimiento y preservación de la línea celulares HEp-2 (carcinoma epitelial de laringe humano) catálogo de la ATCC CCL-23, se utilizó medio mínimo esencial Dulbecco modificado (DMEM, GIBCO), suplementado con 5% v/v de suero fetal bovino (SBF, GIBCO), previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos y glutamina (GIBCO) a una concentración final de 2mM.

#### **6.2.2.-Propagación y titulación de hRSV y hMPV de referencia.**

Propagación de virus respiratorios. hRSV de referencia cepa Long subtipo A y subtipo B (18537) y Metapneumovirus (hMPV obtenido en el laboratorio a partir de una muestra clínica).

Infectar monocapas de células HEp-2 confluentes con el virus de referencia hRSV cepa Long (A y B 18527) o cepa control interno de hMPV en presencia de DMEM, antibiótico y glutamina en ausencia de suero, este medio se denomina DMEM incompleto. Las células infectadas se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> y se observan diariamente hasta la identificación del efecto citopático (ECP), que en el caso de ambos virus puede presentarse como células gigantes multinucleadas o sincitios. Posteriormente, a la observación de ECP, la suspensión viral se cosecha y se adiciona MgSO<sub>4</sub> a una concentración 0.1M para

estabilizar la infectividad del virus y se almacena a  $-70^{\circ}\text{C}$ . En el caso de hMPV se eligieron concentraciones más bajas a las reportadas por Tollefson *et al*<sup>[93]</sup> en un rango de 0.01%-0.005 % para poder observar el ECP

Titulación de la infectividad viral por  $\text{TCDI}_{50}$  (denominado así por sus siglas en inglés Tissue Culture infectious dose affecting 50% of the cultures).

Este ensayo se lleva a cabo en monocapas de células HEp-2 confluentes crecidas en placas de 96 pozos. La suspensión viral se diluye en un factor de 3 con DMEM incompleto. Con las diluciones de la suspensión viral se infectaron las monocapas de células HEp-2 en presencia de DMEM incompleto y se incubaron hasta la observación de ECP. La determinación del título viral se llevó a cabo por  $\text{TCID}_{50}$ , de acuerdo a la fórmula de Kärber,

$$\text{TCDI}_{50} = -\Delta + [-\partial (S-1/2)] \text{ donde:}$$

$\Delta$ =última dilución en donde todos pozos presentan efecto.

$S$ =suma de los % de todas las diluciones de donde se presentó efecto citopático (100% a 0%)

$\partial$ =  $\log_{10}$  del factor de dilución.

El título viral se expresó en  $\text{TCDI}_{50}/\text{ml}$ .

### **6.2.3.-Pases ciegos de muestras clínicas.**

Las muestras obtenidas del InDRE, la Facultad de Medicina de la UASL y Hospital General Adolfo López Mateos se aislaron por pases ciegos (3). Monocapas de células HEp-2 confluentes se infectaron con cada una de las muestras en presencia de DMEM incompleto; se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera húmeda y 5% de  $\text{CO}_2$  y se observan diariamente hasta la observación de (ECP).

Se les realizaron tres pases ciegos, el aislado viral se cosecha y se almacena a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  para posteriormente realizar la identificación de los tipos virales por inmunofluorescencia directa.

### **6.3.-Ensayos de inmunofluorescencia directa.**

La inmunofluorescencia directa se llevó a cabo en células HEp-2 previamente cultivadas durante 24 horas a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>, posteriormente se infectaron con 150µl de muestra y se incubó 2 horas a 37°C, transcurrido el tiempo se retira el inóculo y se completa con DMEM incompleto y se incubaron 48 horas. Las células se fijaron con metanol a -20°C durante 5 min y con acetona -20°C durante 30 segundos. Se dejó secar al aire y se bloqueó con PBS (Buffer de Fosfatos)-ABS (Albumina Sérica Bovina) al 1% durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron 1 hora con el anticuerpo en una dilución 1:10 en PBS al 0.1%, se lavó 3 veces con PBS durante 10 minutos y finalmente se observaron en un microscopio de epifluorescencia (MIGHTY BRIGHT Scientific Instruments) (Anexo 2).

Como control positivo se usaron células HEP-2 infectadas con los virus de referencia comparándolas con las muestras clínicas en forma aguda y control negativo células HEp-2 sin infectar las cuales se trabajaron en forma paralela.

### **6.4.-RT-PCR de hRSV y hMPV.**

#### **6.4.1- Extracción de RNA.**

La extracción de ARN total de los virus de referencia y de las muestras, se realizó después de la infección de células HEp-2 con la suspensión viral de muestras clínicas y virus de referencia transcurrido las 48 horas. Después de transcurrido el tiempo establecido, las monocapas de HEp-2 se re suspendieron con 1ml de TRIzol (Invitrogen Cat. no. 15596-026) en varias ocasiones y posteriormente se pasaron a tubos eppendorf de 1.5ml, se le adiciono un volumen de 200 µL de cloroformo frío grado molecular por cada ml de TRIzol. Se agitó por unos segundos en un vortex (MAXI MIX PLUS) y se centrifugó por 10 minutos a 10,000rpm en una centrifuga 5415-C. Al finalizar este tiempo, se observaron dos fases una orgánica y otra inorgánica; la fase orgánica que contiene al DNA y

proteínas se descarta. La fase inorgánica superior contiene al RNA, esta fase se traspara a un tubo eppendorf estéril al cual se le adiciona 500  $\mu$ L de isopropanol frio grado molecular y posteriormente se dejó precipitando a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Trascurrido este tiempo se pasaron a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos y se centrifugan por 10 minutos a 10,000 rpm y se decantó el sobrenadante. El botón de RNA se lavó con etanol al 75% v/v y se centrifugo por 10 minutos a 10,000rpm, se decantó el sobrenadante y el botón se dejó secar. El botón de RNA se resuspendió en 30  $\mu$ L de agua DEPC (dietilpirocarbonato). La concentración del RNA se determinó mediante el empleo de un espectrofotómetro de luz UV a 260nm (JENGAY 7305 Spectrophotometer). La concentración se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g} = \text{DO}_{260\text{nm}} \times \text{factor de dilución} \times 40\mu\text{g} \times 1\text{ml}.$$

Nota: Una solución de RNA cuyo valor de D.O.es igual a 1 tiene aproximadamente una concentración de 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$

## **6.4.2.-RT-PCR.**

### **6.4.2.1.-Síntesis del DNA complementario**

La síntesis de DNA se realizó a partir de una concentración de 3 $\mu\text{g}$  de RNA. El volumen de RNA equivalente a 3 $\mu\text{g}$  se colocó un tubo eppendorf de 0.2ml al cual se le adiciono 4 $\mu\text{l}$  de Buffer de reacción 5X (Invitrogen), 2 $\mu\text{l}$  de DTT (Invitrogen) 0.1M, 1 $\mu\text{l}$  de dNTP's 10 mM (Invitrogen), 0.5 $\mu\text{l}$  de inhibidor de RNasa (Invitrogen), 3 $\mu\text{g}$  de RNA y se le adiciono agua DEPC hasta completar un volumen de 20 $\mu\text{l}$ . Posteriormente se llevó a cabo la amplificación en un termociclador (BIO RAD)



### 6.4.2.2.- Diseño y síntesis de oligonucleótidos específicos para hRSV genes F y G y para hMPV los genes N y L.

Las secuencias para determinar el tipo y subtipo viral para hRSV y hMPV, fueron previamente diseñados en el laboratorio. En este trabajo se diseñaron los oligonucleótidos para el subtipo B (18537) de hRSV. Para el diseño se utilizó el programa GenBank donde se encuentra la secuencia completa de hRSV (18537), de ahí se convierten a formato FASTA y posteriormente se emplea el programa IDT para el diseño de los oligonucleótidos para el subtipo B ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)). Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la tabla Tabla 2.

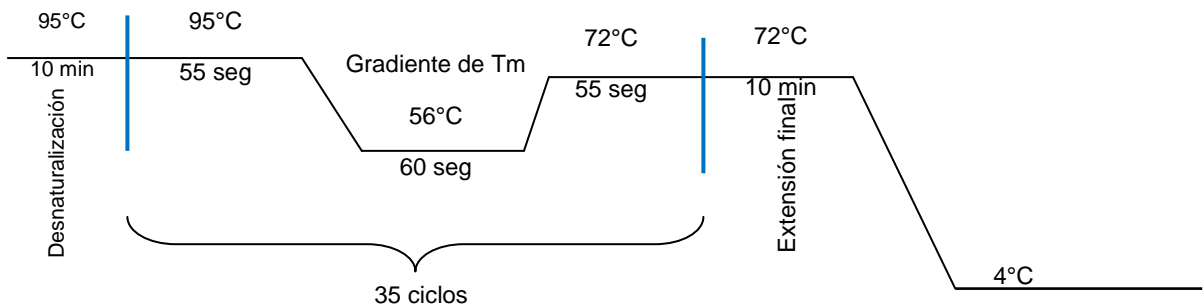
Cebadores para Virus Sincitial Respiratorio Humano hRSV				
Sentido	Secuencia	Gen	Tamaño de amplificado pb.	Región del gen
Ff1	5'ATGAACAGTTTAACATTACCAAGTGA3'	F	193	1127-1320
Fr1	5''CCACGATTTTATTGGATGCTG3'			
Gf2	5'CCCAACATACCTCACT3'	G <sub>A</sub>	549	275-824
Gr2	5'GAGGAGGTTGAGTGGAAG3'			
frGB2	5'CATGCCAAACACAAGAATCAAC3'	G <sub>B</sub>	109	10-305
rvGB2	5'ATTCATCATCTCTGCCAATCAC3'			
Cebadores para Virus de Metapneumovirus hMPV				
Sentido	Secuencia	Gen	Tamaño de amplificado pb.	Región del gen
Nfw	5'-CAACAGCAGTGACACCCTC-3'	N	599	148-747
Nrv	3'-ACTCATACCGTTTCGTAA-5'.			
Lfw	5'-CAACCAGGAAAACAGCGACA-3'	L	447	8920- 9367
Lrv	5'-GACACCATCCTTCAATACCG-3'			

**Tabla 2: Oligonucleótidos y secuencia para amplificar los genes de hRSV y hMPV**

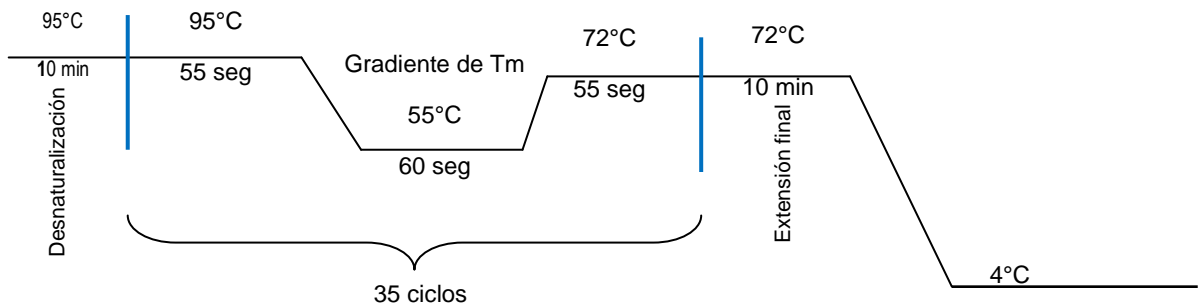
### 6.4.2.3.- Amplificación del cDNA.

En un tubo eppendorf estéril de 0.2ml se adicionaron 7µl de cDNA (templado), 5 µl de Buffer 10X PCR (Invitrogen), 1µl de dNTP's 10mM (Invitrogen) ,1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50Mm (Invitrogen), 0.2 µl de My Taq DNA polimerasa (BIO 21105), 5µl del cebador en una concentración 10 µM y agua DEPC para un volumen total de 50 µl. A continuación se muestran los ciclos de amplificación para cada gen de hRSV (F y G) y hMPV (L y N).

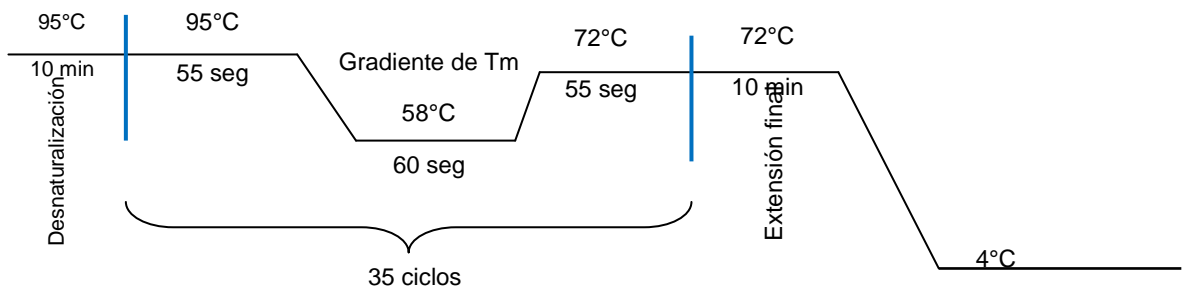
- Para el gen F de hRSV.



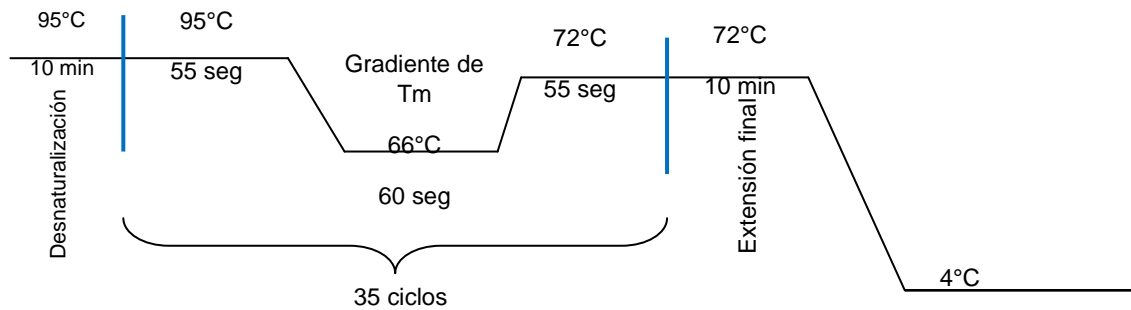
- Para el gen G<sub>A</sub> de hRSV.



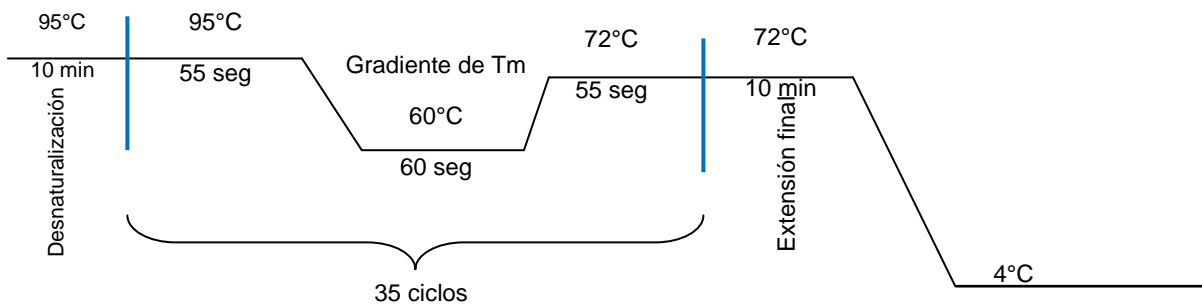
- Para el gen G<sub>B</sub> de hRSV.



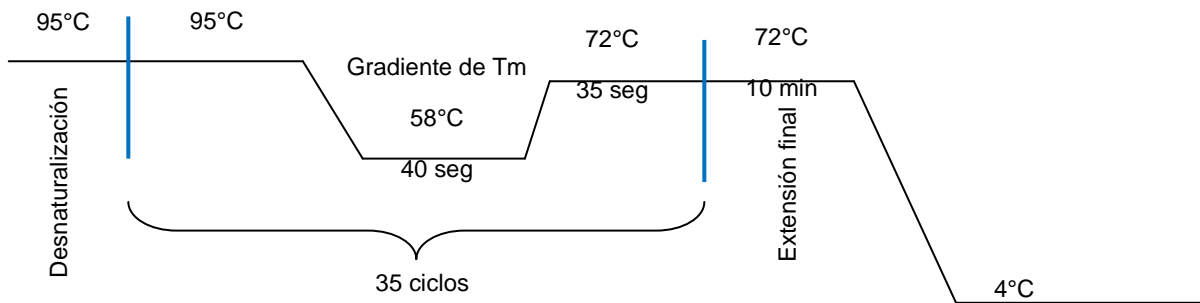
- Para el gen L de hMPV.



- Para el gen N de hMPV.



- Para el control interno de  $\beta$ - actina



#### 6.4.2.4.- Electroforesis.

Los productos de amplificación de las muestras y controles se observaron en geles de agarosa de 1.5%, teñidos con bromuro de etidio; las imágenes se visualizaron y documentaron en un transiluminador bajo luz UV y analizadas con el software Quantity One. (BIO-RAD Software the molecular imager FX and personal Molecular imager FX; the GS-700 and GS-10 imaging densitometers; the

gel doc 1000/2000 and Chem doc gel documentation systems the fluor-S and fluor-S MAX multi imagers; and the versa DOC).

## VII.- RESULTADOS.

### 7.1.- Propagación y titulación de hRSV y hMPV de referencia.

La propagación y titulación de las cepas para ambos virus hRSV y hMPV, se determinó en la línea celular HEp-2 por TCDI<sub>50</sub> hasta la observación del efecto citopático (ECP). El título viral para la cepa Long de hRSV es de  $5.6 \times 10^6$  y para hMPV es de  $1.5 \times 10^5$  como se muestra en la figura 5

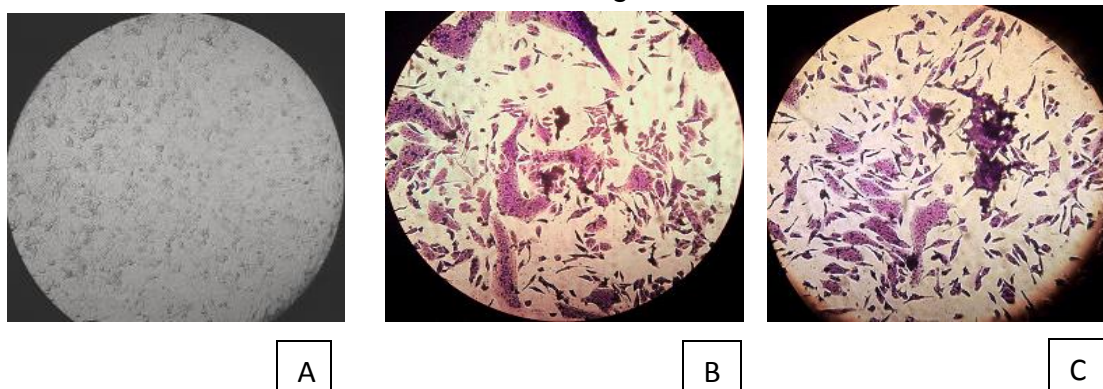


Figura 5. Efecto citopático en controles de referencia de hRSV y hMPV. A. Células HEp-2 sin infectar. B.- EPC de hRSV en células HEp-2. C.- EPC de hMPV en células HEp-2.

### 7.2.- Aislamiento del hRSV y hMPV a partir de muestras clínicas.

El aislamiento viral a partir de cada una de las muestras se llevó a cabo en monocapas de células Hep-2 confluentes crecidas en placas de 24 pozos se infectaron con cada una de las muestras clínicas en presencia de DMEM incompleto; se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> y se observaron diariamente hasta la aparición de ECP. Se realizaron tres pases ciegos de cada una de las muestras de acuerdo con lo descrito anteriormente. Después de observar el ECP, se cosecho el sobrenadante y se almaceno a -70°C, hasta su procesamiento para la identificación de los tipos virales por inmunofluorescencia directa. El cambio morfológico es variable y puede aparecer a partir del 3er día al día 10. (Figura 6).

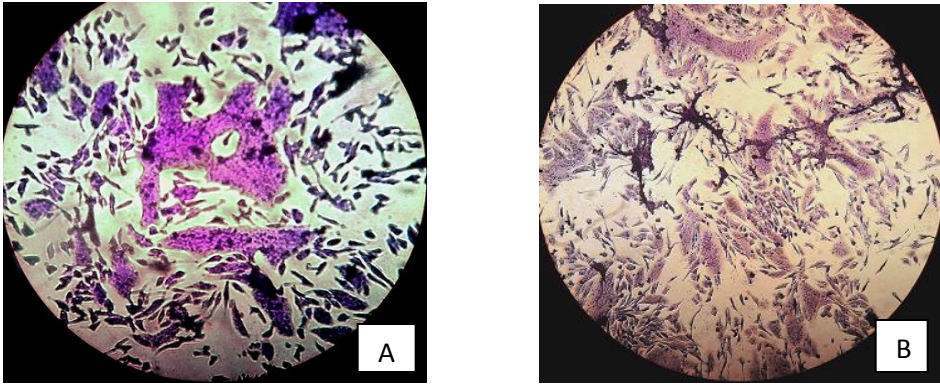


Figura 6. Efecto citopatico en muestras clínicas A.- Muestra clínica 9024 y B.-Muestra Clínica 051

### 7.3.- Ensayos de Inmunofluorescencia directa.

Los ensayos preliminares de identificación de los tipos de virus se realizaron por pruebas de IF en las cuales se obtuvo de 183 un 45.9 % a hRSV, 15.84% a hMPV, 38.25% a coinfecciones y 16.93% negativas para hRSV y hMPV.

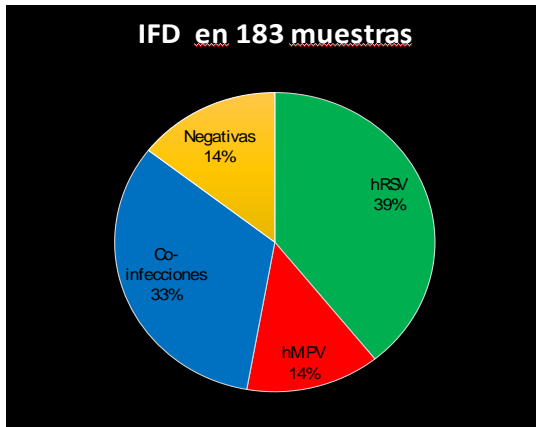
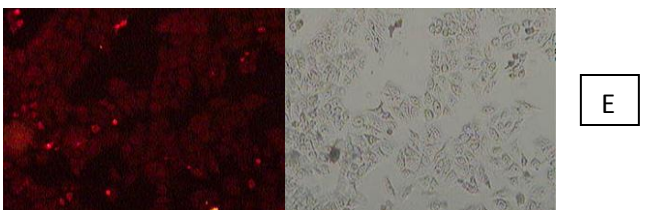
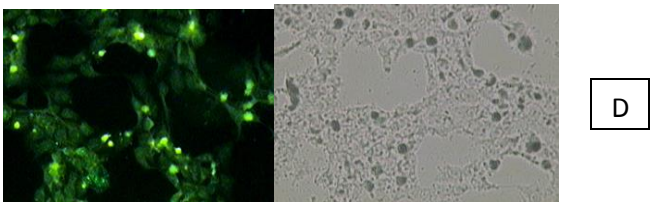
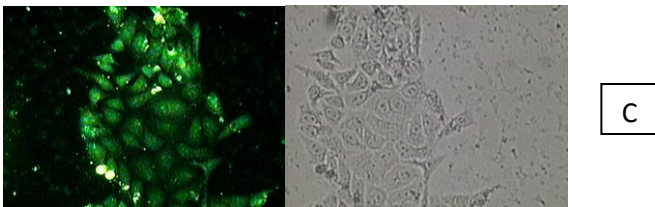
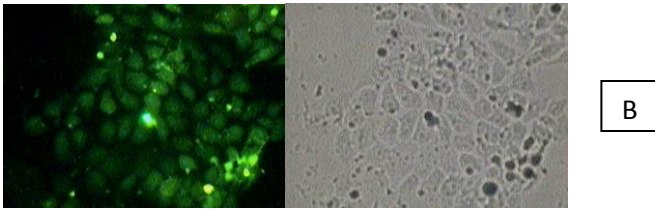
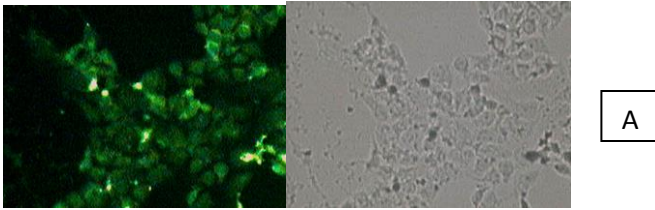


Tabla 3: Resultados por identificación de IFD

virus detectado	% de muestras positivas
hRSV	45.90
hMPV	15.84
Co-infecciones	38.25
Negativas	16.93

Grafica 1. Agentes virales identificados por IFD en muestras clínicas con IRA's.



**Figura 7.- Ensayo de IFD en luz UV y Luz visible .A.-Control positivo de hRSV, B.-Control positivo hMPV, C.-Muestra positiva para hRSV (4112), D.-Muestra positiva para hMPV (5524) E.-Control negativo células sin infectar.**

#### 7.4.- Genotipificación de muestras clínicas.

Para la tipificación de las muestras clínicas para hRSV se utilizaron los oligonucleótidos que amplifican al gen F y para el subtipo los oligonucleótidos G<sub>A</sub> y G<sub>B</sub>. Para el caso de hMPV se amplificaron los genes N y L. Se analizaron un total de 183 muestras, los resultados mostraron 31.69% positivas para hRSV, de las cuales 23.49 % fueron subtipo A y 25.68 del Subtipo B. La figura 8 es un gel representativo de las muestras analizadas.

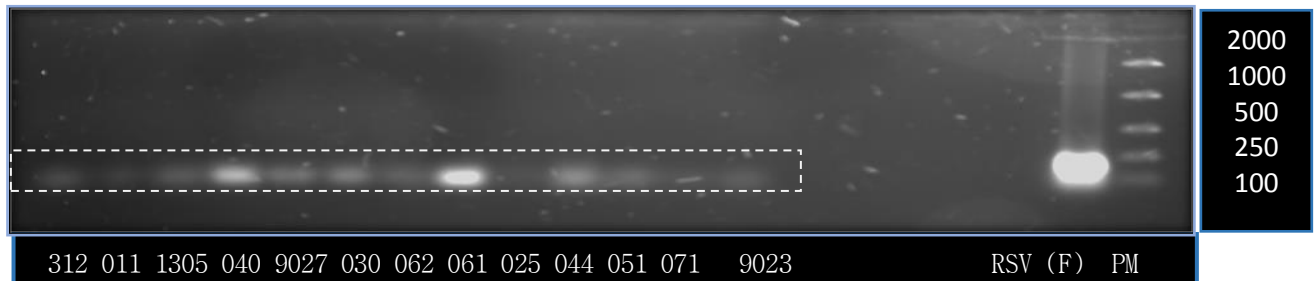


Figura 8 Amplificación de hRSV (F 193pb).En donde se encuentra las muestras positivas 312,011,1305,040,9027,030,062,061,025,044,051,071,9023,control positivo hRSV (F) y marcador de peso molecular .



Figura 9. Amplificación de hRSV subtipo B (G<sub>B</sub> 106pb) donde se observa el marcador de peso molecular, control negativo (células sin infectar HEp-2), muestras 611, 1044, 1232, 4108, 3112, 4516, 408, 308.

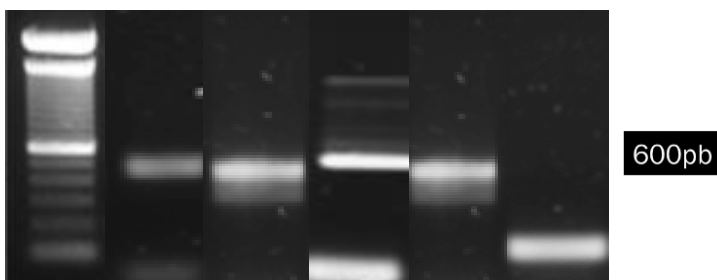


Figura 10. Amplificación de los genes N (599pb) de hMPV. En donde se muestra el marcador de peso molecular, Control positivo (N), muestras positivas 1937, 1576, 109, y  $\beta$ - actina (205pb) para aprobar la integridad del RNA



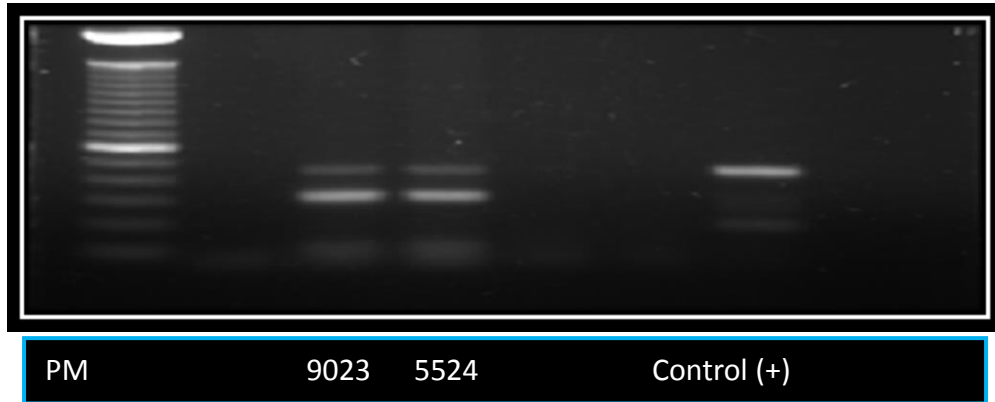
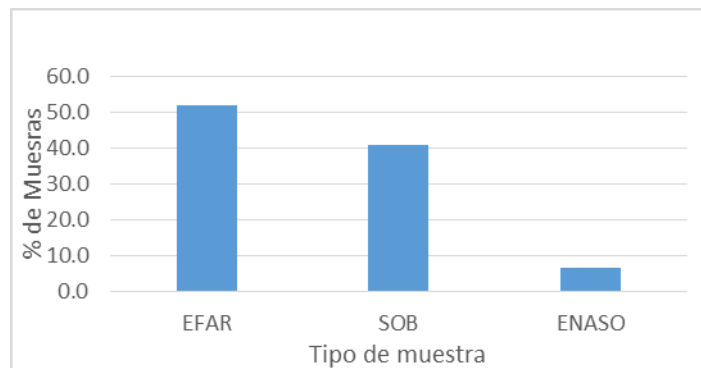


Figura 11. Amplificación de los gen L (447pb) de MPV. En donde se muestra Marcador de peso molecular, muestras: 9023,5524 y control positivo (N)

## 7.5.- Tipo de muestra

Para conocer el agente etiológico de una infección respiratoria se debe obtener una muestra de los fluidos del tracto respiratorio, en nuestro caso las muestras se obtuvieron por exudado faríngeo (EFAR, 52.1% n=38), exudado nasofaríngeo (ENASO 6.8% n=5) y sobrenadante, del cual no se tiene claro el origen de la obtención de la muestra (EFAR o ENASO 41.1% n=30). Como se muestra en la gráfica 2

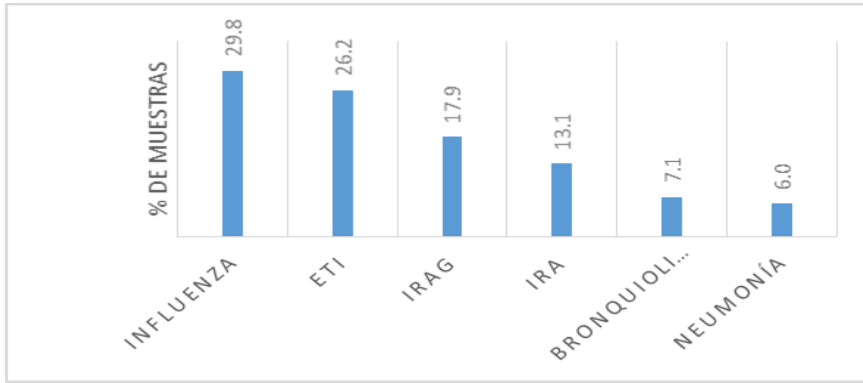


Gráfica 2.- Tipo de muestras para identificar IRA

## 7.6.- Diagnóstico clínico.

Como ya antes se mencionó, las IRA tienen diversos agentes etiológicos y pueden presentar numerosas patologías. En esta parte se expone el diagnóstico por el cual se les realizó la toma de muestra para determinar el agente etiológico.

Podemos observar que la causa más común es Influenza con un 29.8% n=25, posteriormente la Enfermedad Tipo Influenza (ETI) que presenta un 26.2% n=22, en tercer lugar se localiza la Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG) con un 17.9% n=15, posteriormente está la Infección Respiratoria Aguda (IRA) con un 13.1% n=11. Finalmente se encuentra Bronquiolitis y Neumonía con 7.1% n=6 y 6% n=5 respectivamente. Representada en la gráfica 3.



**Grafica 3.- Distribución del porcentaje de muestras de acuerdo al diagnóstico presentado para realizar la toma de muestra.**

## VIII.- DISCUSIÓN Y ANALISIS DE RESULTADOS.

La detección de las infecciones virales respiratorias se ha basado primeramente en la técnica del cultivo celular a partir de secreciones respiratorias y la infección viral se detecta mediante la aparición del efecto citopático en la monocapa celular. Este método es lento, necesita un mínimo de 7-10 días y su sensibilidad puede verse afectada por carga viral.

Como se ha mencionado con anterioridad no existe una cepa comercial de referencia para hMPV, el control positivo que se utilizó en este estudio se obtuvo a partir de muestras de pacientes.

La línea celular HEp-2, está reportada como permisiva para ambos virus, sin embargo en el caso de hMPV se ha observado que es altamente sensible a los tratamientos con tripsina, necesario para inducir actividad fusogénica, lo que favorece la formación de sincitios.

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

No se emplearon soluciones comerciales de tripsina porque contienen quimiotripsina, lo cual las hacen más agresivas con las células, sin embargo el inhibidor que contiene la TPCK, no afecta la actividad de la tripsina

En este estudio se analizaron y observaron 183 muestras de pacientes con cuadros infecciosos respiratorios agudo. A las cuales se les realizaron tres pases ciegos para enriquecer la carga viral al final del tercer pase se observó si se desarrollaba fusogenicidad o no. La fusogenicidad es importante, debido a que puede proporcionar un indicio de presencia viral. En algunos casos las muestras

presentaron fusogenicidad espontánea, indicio de infección por hRSV y hMPV, *invitro* los sincitios indican que el virus se encuentra presente y que tiene la capacidad de infectar otras células sin salir de la célula hospedera.

Para corroborar la infección viral, se realizaron ensayos presuntivos de inmunofluorescencia directa, lo que nos proporciona datos inmediatos sobre la infección pero no son confirmatorios ya que pueden existir falsos negativos y falsos positivos como se demostró en los ensayos realizados dentro del laboratorio, los cuales reconocen proteínas virales de superficie (F y G) en células infectadas.

En el caso de la amplificación de los genes las condiciones fueron previamente estandarizadas tomando en cuenta diversas características y condiciones para amplificar a los genes N y L en el caso de hMPV y F en el caso de hRSV y Subtipo de este mismo G<sub>A</sub> y G<sub>B</sub> las muestras fueron consideradas como positivas cuando hubo amplificación por lo menos en alguno de los genes.

Como se mostraron en las imágenes en donde amplificaron cada uno de los genes con sus respectivos controles de hMPV o hRSV y en la figura 11 se utilizó  $\beta$ - actina como control interno que se empleó para aprobar la integridad del RNA

En el caso de hMPV se observó una gran variación de las bandas obtenidas con un peso inferior o superior al esperado para ambos genes L y N; lo que da un indicio de variantes en los amplificados, lo que se debe de comprobar por secuenciación, de ninguna manera la observación de estas bandas adicionales nos explica tal variación.

En general la detección de mutaciones conocidas y nuevas es de gran importancia en el tratamiento, que permitirían identificar a los pacientes que desarrollan la resistencia, lo que podría ayudar a tener una intervención oportuna evitando el fracaso del tratamiento antiviral.

## **IX.- CONCLUSIONES.**

Se realizó el diagnóstico de hRSV y hMPV en 183 muestras mediante cultivo celular, ensayos de IFD y RT-PCR en los cuales se compararon los métodos diagnósticos, obteniendo una mayor sensibilidad y especificidad en RT-PCR.

La frecuencia epidemiológica de IRA's provocada por dos de los principales agentes etiológicos virales por PCR: hRSV 31.69%, para hMPV 50.81% y coinfecciones 20.21%.

Las técnicas moleculares son más sensibles, específicas y menos costosas vs inmunofluorescencia por lo que es una herramienta en el diagnóstico diferencial y de apoyo en el clínico.

.

## **X.- PERSPECTIVAS.**

Analizadas las muestras por los métodos ya mencionados se procederá a realizar la secuenciación y así confirmar la presencia de variantes virales; además realizar ensayos para hPIV (2 y 3) que es otro de los más importantes a nivel mundial por el índice de morbimortalidad.

## XI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. - Papenburg J., B.G., *The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus*. Reviews in Medical Virology, 2010. 20: p. 245-260.
2. Cowton V., M.D., Fearn R. , *Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis*. J Gen Virol, 2006. 87(7): p. 1805-1821.
3. Swapnil Subhash Bawage, PoojaMunnalal Tiwari, Shreekumar Pillai, Vida Dennis, and Shree Ram Singh Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus . *Review Advances in Virology*,2013
4. Collins PL, G.B., *Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis*. J.Virol, 2008. **82**: p. 2040–2055.
5. Fearn Rachel,Collins. Role of the M2-1 Transcription antitermination Protein of Respiratory Syncytial Virus in sequential Transcription. J Virol 1999 73(7):5852-2864
6. Bermingham A Collins PL. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. Proc Natl Acad Sci USA 199, 11259-11264
7. Spann KM, Tran KC, Collins PL. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 on human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-KappaB, and proinflammatory cytokines. J Virol 2005,79:5353-5362
8. O M., B.R., Holtzman M., *Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Proteins NS1 and NS2 Mediate Inhibition of Stat2 Expression and Alpha/Beta Interferon Responsiveness*. J. Virol, 2005. **79**(14): p. 9315–9319.
9. Midulla F., H.Y., Gilbert I., Cirino N., McFadden E., Panuska J., *Respiratory Syncytial Virus infection of human cord and adult blood monocytes and alveolar macrophages*. American review of respiratory disease, 1989. **140**: p. 771-777.
10. Li X., F.Z., Alvarez R., Henderson C., Tripp R, *Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infects Neuronal Cells and processes That Innervate the Lung by a Process Involving RSV G Protein*. J. Virol, 2006. **80**(1): p. 537-540.
11. Thammawat S, S.T., Hallsworth PG, Gordon DL., *Role of cellular glycosaminoglycans and charged regions of viral G protein in human metapneumovirus infection*. J Virol, 2008. **82**(23): p. 11767–11774.
12. Cseke G, M.M., Cox RG, Tollefson SJ, Podsiad AB, Wright DW, et al, *Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus*. Proc Natl Acad Sci USA, 2009. **106**(5): p. 1566-1571.
13. Sugrue, R. J., C. Brown, G. Brown, J. Aitken, and L. R. H. W. Mc. Furin cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is not a requirement for its transport to the surface of virus-infected cells. *J Gen Virol* 2001; 82:1375.
14. Crowe E J Human Metapneumovirus as a Major Cause of Human Respiratory Tract Disease; *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2004.23.S215–S221.
15. Gardner AE, D.R., *A conserved region in the F(2) subunit of paramyxovirus fusion proteins is involved in fusion regulation*. J Virol, 2007. **81**: p. 8303-8314.
16. Lamb, R.A., and T. S. Jardetzky, *Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus* F. Curr. Opin. Struct. Biol, 2007. **17**(4): p. 427–436.
17. Alvarez R, Harrod K S, Shieh W J, Zaki S and Tripp R A 2004 Human metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies; *J. Virol.*78.14003–14011.
18. van den Hoogen B G, Herfst S, Sprong L, Cane P A, Forleo-Neto E, de Swart R L, Osterhaus A D and Fouchier R A Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses; *Emerg. Infect. Dis* 2004.10.658–666.



19. Skiadopoulos M H, Biacchesi s, Buchholz U J, Riggs J M, Surman S R, Amaro-Carambot E, McAuliffe J M, Elkins W R, The two major human Metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness; *J. Virol.* 2004;78:6927–6937
20. Kuiken T, van den Hoogen B G, van Riel D A, Laman J D, van Amerongen G, Sprong L, Fouchier R A and Osterhaus A D Experimental human metapneumovirus infection of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract; *Am. J. Pathol.* 2004 **164** 1893–1900.
21. Hamelin M E and Boivin G Development and validation of an Enzyme-linked immunosorbent assay for human Metapneumovirus serology based on a recombinant viral protein; *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005 **12** 249–253.
22. Broor S, Bharaj P and Chahar H S 2008 Human metapneumovirus: a new respiratory pathogen; *J. Biosci.* **33** 483–493.
23. Fields, *Virology*.
24. Cowton V., M.D., Fearn R. , *Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis*. *J Gen Virol*, 2006. **87**(7): p. 1805-1821.
25. Sanjan H., G.M., Mohapatra S., *Biología molecular del Virus Sincitial Respiratorio y desarrollo de estrategias porfilácticas*. Salud Uninorte Barranquilla, 2006. **22**(2): p. 135-153.
26. Lundin,A.,et al.,Two novel inhibitors of human respiratory syncytial virus.*Antiviral Res*, 2010.88(3):p317-24
27. Aguilar,H.C., andB Lee, Emerging paramyxoviruses:molecular mechanisms and antiviral strategies.*Expert Rev Mol Med*, 2011,13 ,pe6
28. Feigin R, Cherry J. Textbook of pediatric infectious diseases. 5a edición. Philadelphia: WB Saunders, 2005;vol. 1:137-270.
29. Sigurs N. Epidemiologic and clinical evidence of a respiratory syncytial virus-reactive airway disease link, *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163: S2–S6.
30. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK., Edwards KM., Staat MA.,et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med*. 2009; 360: 588-98.
31. Cabello C, Manjarrez ME, Olvera R, Villalba J, Valle L, Paramo I. Frequency of viruses associated with acute respiratory infections in children younger than five years of age at a locality of Mexico city. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101:21-24.
32. Noyola DE, Rodriguez-Moreno G, Sanchez-Alvarado J, Martínez-Wagner
33. Ochoa-Zavala JR. Viral etiology of lower respiratory tract infections in hospitalized children in Mexico. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:118-123
34. Noyola DE, Arteaga-Domínguez G. Contribution of respiratory syncytial virus, influenza and parainfluenza viruses to acute respiratory infections in San Luis Potosí, Mexico. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:1049-1052.
35. Noyola DE, Zuviri-González A, Castro-García JA, Ochoa-Zavala JR. Impact of respiratory syncytial virus on hospital admissions in children younger than 3 years of age. *J Infect* 2007;54:180-184.
36. Ayora-Talavera G, Gongora-Bianchi RA, Lopez-Martinez I, Moguel-Rodríguez W, Pérez-Carrillo H, Vázquez-Zapata V, et al. Detection of human influenza virus in Yucatan, Mexico. *Rev Invest Clin* 2002;54:410-414.
37. Manjarrez ME, Rosete DP, Rincon M, Villalba J, Cravioto A, Cabrera R. Comparative viral frequency in Mexican children of 5 years of age with and without upper respiratory symptoms. *J Med Microbiol* 2003;52:579-583.

38. Noyola DE, Alpuche-Solis AG, Herrera-Diaz A, Soria-Guerra RE, Sánchez-Alvarado J, López-Revilla R. Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics. *J Med Microbiol* 2005;54:969-974.
39. Talavera GA, Mezquita NE. Human metapneumovirus in children with influenza-like illness in Yucatan, Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76:182-183.
40. Mascareñas-de los Santos C, Vera-García H, Mantilla-Figueroa Z, Calderon-Cruz E, Penagos M, Lopez I, et al. Agentes etiológicos de bronquiolitis en niños. *Revista de Enfermedades infecciosas en Pediatría* 2003;XVI:122-126.
41. Wong-Chew RM, Farfán-Quiroz R, Sánchez-Huerta JL, Nava-Frías M, Casasola-Flores J, Santos-Preciado JI. Frequency of respiratory viruses and clinical characteristics in children attending a care center in Mexico City. *Salud Publica Mex* 2010;52:528-532.
42. Oliveira B., e., *El itinerario terapéutico de las familias de los niños con enfermedades respiratorias en el sistema de salud pública*. Latino-Am. Enfermagem 2012. **20**(3): p. 453-461.
43. Van den Hoogen, B.G., et al., *Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients*. *J. Infect. Dis.*, 2003. **188**: p. 1571–1577.
44. Wyde PR, C.S., Jewell AM, Boivin G, Piedra PA., *Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro*. *Antiviral Res*, 2003. **60**(51-59).
45. Ison M., M.J., Openshaw P., Zambon M., Osterhaus A., Hayden F., *Current research on respiratory viral infections: Fourth International Symposium*. *Antiviral Res*, 2002. **55**: p. 227-278.
46. Defrasnes C, H.M., Prince GA, Boivin G, *Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008(52): p. 279-287.
47. Cianci C, M.N., Krystal M., *Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor*. *J Antimicrob Chemother*, 2005. **55**: p. 289–292
48. DeVincenzo J, C.J., Alvarez R, Elbashir S, Harborth J, Toudjarska I, et al., *Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV)*. *Antiviral Res*, 2008. **77**(225-231).
49. Teng, M. N., S. S. Whitehead, A. Bermingham, M. St Claire, W. R. Elkins, B. R. Murphy, and P. L. Collins. Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *J Virol* 2000; 74:9317
50. Schmidt, A. C., D. R. Wenzke, J. M. McAuliffe, M. St Claire, W. R. Elkins, B. R. Murphy, and P. L. Collins. Mucosal immunization of rhesus monkeys against respiratory syncytial virus subgroups A and B and human parainfluenza virus type 3 by using a live cDNA-derived vaccine based on a host range-attenuated bovine parainfluenza virus type 3 vector backbone. *Journal of Virology* 2002; 76:1089.
51. Teng, M. N., and P. L. Collins. Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein. *Journal of Virology* 1999; 73:466.
52. Haynes, L. M., L. P. Jones, A. Barskey, L. J. Anderson, and R. A. Tripp. Enhanced disease and pulmonary eosinophilia associated with formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccination are linked to G glycoprotein CX3C-CX3CR1 interaction and expression of substance P. *Journal of Virology* 2003; 77:9831.
53. Openshaw, P. J. M., F. J. Culley, and W. Olszewska. Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. *Vaccine* 2001; 20:S27.
54. Plotnicky, H., C. A. Siegrist, J. P. Aubry, J. Y. Bonnefroy, N. Corvaia, T. N. Nguyen, and U. F. Power. Enhanced pulmonary immunopathology following neonatal priming with formalin-

- inactivated respiratory syncytial virus but not with the BBG2NA vaccine candidate. *Vaccine* 2003; 21:2651.
55. Kalina, W. V., A. R. Wollums, R. D. Berghaus, and L. J. Gershwin. Formalin-inactivated bovine RSV vaccine enhances a Th2 mediated immune response in infected cattle. *Vaccine* 2004; 22:1465.
  56. Karron RA, W.P., Belshe RB, Thumar B, Casey R, Newman F, et al., *Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants* J Infect Dis, 2005. **191**: p. 1093-1104.
  57. Lo, M. S., R. M. Brazas, and M. J. Holtzman. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J Virol* 2005; 79:9315.
  58. Herfst, S., et al, *Immunization of Syrian golden hamsters with F subunit vaccine of human metapneumovirus induces protection against challenge with homologous or heterologous strains.* J. Gen. Virol, 2007. **88**: p. 2702-2709.
  59. Cseke, G., et al, *Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats.* J. Virol, 2007. **81**: p. 698-707.
  60. Kimpen, J. L. Prevention and treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis and postbronchiolitic wheezing. *Respir Res* 2002; 3:S40.
  61. Maggon, K., and S. Barik. New drugs and treatment for respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 2004; 14:149.
  62. Schmidt, A. C., T. R. Johnson, P. J. Openshaw, T. J. Braciale, A. R. Falsey, L. J. Anderson, G. W. Wertz, J. R. Grootuis, G. A. Prince, J. A. Melero, and B. S. Graham. Respiratory syncytial virus and other pneumoviruses: a review of the international symposium—RSV 2003. *Virus Res* 2004; 106:1.
  63. Kneyber, M. C., H. A. Moll, and R. de Groot. Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection. *Eur J Pediatr* 2000; 159:399.
  64. Torrence, P. F., and L. D. Powell. The quest for an efficacious antiviral for respiratory syncytial virus. *Antivir Chem Chemother* 2002; 13:325.
  65. Wu, H., D. S. Pfarr, Y. Tang, L. L. An, N. K. Patel, J. D. Watkins, W. D. Huse, P. A. Kiener, and J. F. Young. Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: Effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. *Journal of Molecular Biology* 2005; 350:126.
  66. Waugh, S. M. L., D. Pillay, D. Carrington, and W. F. Carman. Antiviral prophylaxis and treatment (excluding HIV therapy). *Journal of Clinical Virology* 2002; 25:241.
  67. Joshi, P., A. Shaw, A. Kakakios, and D. Isaacs. Interferon-gamma levels in nasopharyngeal secretions of infants with respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections. *Clinical and Experimental Immunology* 2003; 131:143.
  68. Ramaswamy, M., L. Shi, M. M. Monick, G. W. Hunninghake, and D. C. Look. Specific inhibition of type I interferon signal transduction by respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30:893.
  69. virus-induced RANTES production from human bronchial epithelial cells is dependent on nuclear factor-kappa B nuclear binding and is inhibited by adenovirus-mediated expression of inhibitor of kappa B alpha. *Journal of Immunology* 1998; 161:1007.
  70. Huntley, C. C., W. J. Weiss, A. Gazumyan, A. Buklan, B. Feld, W. Hu, T. R. Jones, T. Murphy, A. A. Nikitenko, B. O'Hara, G. Prince, S. Quartuccio, Y. E. Raifeld, P. Wyde, and J. F. O'Connell. RFI-641, a potent respiratory syncytial virus inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46:841.

71. Razinkov, V., A. Gazumyan, A. Nikitenko, G. Ellestad, and G. Krishnamurthy. RFI-641 inhibits entry of respiratory syncytial virus via interactions with fusion protein. *Chem Biol* 2001; 8:645.
72. Weiss, W. J., T. Murphy, M. E. Lynch, J. Frye, A. Buklan, B. Gray, E. Lenoy, S. Mitelman, J. O'Connell, S. Quartuccio, and C. Huntley. Inhalation efficacy of RFI-641 in an African green monkey model of RSV infection. *Journal of Medical Primatology* 2003; 32:82.
73. H. Nair, E. A. F. Simões, I. Rudan et al., "Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis," *The Lancet*, vol. 381, pp. 1380–1390, 2013.
74. L. R. Krilov, "Respiratory syncytial virus disease: update on treatment and prevention," *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 9, no. 1, pp. 27–32, 2011.
75. Bourgeois, C., J. B. Bour, K. Lidholt, C. Gauthray, and P. Pothier. Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in its infectivity in vitro. *J Virol* 1998; 72:7221.
76. Dupuy, L. C., S. Dobson, V. Bitko, and S. Barik. Casein kinase 2-mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase; phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser(215) and is without effect. *J Virol* 1999; 73:8384.
77. Committee on Infectious Diseases, "Modified recommendations for use of Palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infections," *Pediatrics*, vol. 124, no. 6, pp. 1694–1701, 2009.
78. J. Z. Wu, C. C. Lin, and Z. Hong, "Ribavirin, viramidine and adenosine-deaminase-catalysed drug activation: implication for nucleoside prodrug design," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 52, no. 4, pp. 543–546, 2003.
79. R. G. Gish, "Treating HCV with ribavirin analogues and ribavirin-like molecules," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 57, no. 1, pp. 8–13, 2006.
80. B. Langhans, H. D. Nischalke, S. Arndt et al., "Ribavirin exerts differential effects on functions of CD4+Th1, Th2, and regulatory T cell clones in hepatitis C," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 7, Article ID e42094, 2012.
81. W. Markland, T. J. Mcquaid, J. Jain, and A. D. Kwong, "Broad-spectrum antiviral activity of the IMP dehydrogenase inhibitor VX-497: a comparison with ribavirin and demonstration of antiviral additivity with alpha interferon," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 44, no. 4, pp. 859–866, 2000.
82. J. Chapman, E. Abbott, D. G. Alber et al., "RSV604, a novel inhibitor of respiratory syncytial virus replication," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 51, no. 9, pp. 3346–3353, 2007.
83. L. Ni, L. Zhao, Y. Qian et al., "Design and characterization of human respiratory syncytial virus entry inhibitors," *Antiviral Therapy*, vol. 10, no. 7, pp. 833–840, 2005.
84. M. K. Pастey, T. L. Gower, P.W. Spearman, J. E. Crowe Jr., and B. S. Graham, "A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and Parainfluenza virus type 3," *Nature Medicine*, vol. 6, no. 1, pp. 35–40, 2000.
85. X. A. Wang, C.W. Cianci, K. L. Yu et al., "Respiratory syncytial virus fusion inhibitors. Part 5: optimization of benzimidazole substitution patterns towards derivatives with improved activity," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 17, no. 16, pp. 4592–4598, 2007.
86. A. A. Nikitenko, Y. E. Raifeld, and T. Z. Wang, "The discovery of RFI-641 as a potent and selective inhibitor of the respiratory syncytial virus," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 11, no. 8, pp. 1041–1044, 2001.
87. L. Sun, A. K. Singh, K. Vig, S. R. Pillai, and S. R. Singh, "Silver nanoparticles inhibit replication of respiratory syncytial virus," *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 4, no. 2, pp. 149–158, 2008.

88. S. R. Singh, P. M. Tiwari, and V. A. Dennis, "Anti-respiratory syncytial virus peptide functionalized gold nanoparticles," US Patent Office, 2012.
89. R. Alvarez, S. Elbashir, T. Borland et al., "RNA interference-mediated silencing of the respiratory syncytial virus nucleocapsid defines a potent antiviral strategy," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 53, no. 9, pp. 3952–3962, 2009.
90. J. DeVincenzo, J. E. Cehelsky, R. Alvarez et al., "Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV)," *Antiviral Research*, vol. 77, no. 3, pp. 225–231, 2008.
91. J. DeVincenzo, R. Lambkin-Williams, T. Wilkinson et al., "A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 19, pp. 8800–8805, 2010.
92. M. R. Zamora, M. Budev, M. Rolfe et al., "RNA interference therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 183, no. 4, pp. 531–538, 2011.
93. J. Summerton and D. Weller, "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties," *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, vol. 7, no. 3, pp. 187–195, 1997.
94. K. C. Wang, J. S. Chang, L. C. Chiang, and C.-C. Lin, "Sheng-Ma-Ge-Gen-Tang (Shomakakkon-to) inhibited cytopathic effect of human respiratory syncytial virus in cell lines of human respiratory tract," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 135, no. 2, pp. 538–544, 2011.
95. K.C.Wang, J. S. Chang, L. C. Chiang, and C. C. Lin, "*Cimicifuga foetida* L. inhibited human respiratory syncytial virus in HEp-2 and A549 cell lines," *The American Journal of Chinese Medicine*, vol. 40, no. 1, pp. 151–162, 2012.
96. J. S. Chang, C. F. Yeh, K. C. Wang, D. E. Shieh, M.H. Yen, and L. C. Chiang, "Xiao-Qing-Long-Tang (Sho-seiryu-to) inhibited cytopathic effect of human respiratory syncytial virus in cell lines of human respiratory tract," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 147, no. 2, pp. 481–487, 2013.
97. J. S. Chang, K. C.Wang, C. F.Yeh, D.E. Shieh, and L. C. Chiang, "Fresh ginger (*Zingiber officinale*) has anti-viral activity against human respiratory syncytial virus in human respiratory tract cell lines," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 145, no. 1, pp. 146–151, 2013.
98. J. S. Chang, K. C.Wang, D. E. Shieh, F. F.Hsu, and L. C. Chiang, "Ge-Gen-Tang has anti-viral activity against human respiratory syncytial virus in human respiratory tract cell lines," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 139, no. 1, pp. 305–310, 2012.
99. C. F. Yeh, J. S. Chang, K. C. Wang, D. E. Shieh, and L. C. Chiang, "Water extract of *Cinnamomum cassia* Blume inhibited human respiratory syncytial virus by preventing viral attachment, internalization, and syncytium formation," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 147, no. 2, pp. 321–326, 2013.
100. L. Li, C. H. Yu, H. Z. Ying, and J. M. Yu, "Antiviral effects of modified Dingchuan decoction against respiratory syncytial virus infection in vitro and in an immunosuppressive mouse model," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 147, no. 1, pp. 238–244, 2013.
101. R. Geller, R. Andino, and J. Frydman, "Hsp90 inhibitors exhibit resistance-free antiviral activity against respiratory syncytial virus," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 2, Article ID e56762, 2013.
102. A. Nikitenko, Y. Raifeld, B. Mitsner, and H. Newman, "Pyrimidine containing RSV fusion inhibitors," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 15, no. 2, pp. 427–430, 2005.
103. Dupuy, L. C., S. Dobson, V. Bitko, and S. Barik. Casein kinase 2-mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation

- activity of the viral polymerase; phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser(215) and is without effect. *J Virol* 1999; 73:8384.
104. Fearn, R., and P. L. Collins. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* 1999; 73:5852 Hansbro N., H.J., Wark P., Hansbro P., *Understanding the mechanisms of viral induced asthma: New therapeutic directions*. Pharmacology & Therapeutics, 2008.
  105. Schlender, J., G. Zimmer, G. Herrler, and K. K. Conzelmann. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J Virol* 2003; 77:4609.
  106. Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, Musiyenko A, Ramaswamy M, Look DC, *et al*. Nonstructural Proteins of Respiratory Syncytial Virus Suppress Premature Apoptosis by an NF- B-Dependent, Interferon-Independent Mechanism and Facilitate Virus Growth. *J Virol* 2007; 81: 1786-95.
  107. Collins PL, Mottet G. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1993; 74: 1445-50.
  108. Techaarpornkul S, Barretto N, Peebles ME. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol* 2001; 75: 6825- 34.
  109. Perez M, Garcia-Barreno B, Melero JA, Carrasco L, Guinea R. Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of human respiratory syncytial virus. *Virology* 1997; 235: 342-51.
  110. Fuentes S, Tran KC, Luthra P, Teng MN, He B. Function of the Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein. *J Virol* 2007; 81: 8361-6.
  111. Hoffman SJ, Laham FR, FP Polack. Mechanisms of illness during respiratory syncytial virus infection: the lungs, the virus and the immune response. *Microbes Infect* 2004; 6:767-72.
  112. Openshaw PJM Tregoning JS. 2005. Immune Responses and Disease Enhancement during Respiratory Syncytial Virus Infection . *Clin Microbiol Rev*; 18: 541-55.
  113. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalances in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 633-9.
  114. Hull J, Rowlands K, Lockhart E, Moore C, Sharland M, Kwiatkowski D. Variants of the chemokine receptor CCR5 are associated with severe bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 2003; 188: 904-7.
  115. Kim C, Ahmed JA, Eidex RB, Nyoka R., Waiboci LW., Erdman D., *et al*. Comparison of Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swabs for the Diagnosis of Eight Respiratory Viruses by Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays. *PLoS ONE* 2011; 6. Disponible en:
  116. Leland DS., Ginocchio C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20:49–78.
  117. Ginocchio C. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. *Journal of Clinical Virology*. 2007; 40: S11–S14.
  118. Popow-Kraupp T., Aberle J. Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus Infection. *The Open Microbiology Journal*. 2011; 5: 128-34.
  119. Ahluwalia G., Embree J., Mcnicol P., Law B, Hammond GW. Comparison of Nasopharyngeal Aspirate and Nasopharyngeal Swab Specimens for Respiratory Syncytial Virus Diagnosis by Cell Culture, Indirect Immunofluorescence Assay, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Microbiol*. 1987; 25: 763-767.
  120. Sander Herfst,1 Miranda de Graaf, Eefje J. A. Schrauwen, Nancy D. Ulbrandt, Arnita S. Barnes, Kannaki Senthil, Albert D. M. E. Osterhaus, Ron A. M. Fouchier and Bernadette G.

van den Hoogen Immunization of Syrian golden hamsters with F subunit vaccine of human metapneumovirus induces protection against challenge with homologous or heterologous strains *Journal of General Virology* (2007), 88, 2702–2709.

121. Sharon J. Tollefson, Kelli L. Boyd and John V. Williams Jennifer C. Becker, Monika Johnson, Ryan E. Craven, Reagan G. Cox, John J. Erickson, Andrew K. Hastings *J. Virol.* 2014, 88(11):6368. DOI: 10.1128/JVI.00332-14. Sharon J. Tollefson, Kelli L. Boyd and John V. Williams Jennifer C. Becker, Monika Johnson, Ryan E. Craven, Reagan G. Cox, John J. Erickson, Andrew K. Hastings, Human Metapneumovirus Virus-Like Particles Induce Protective B and T Cell Responses in a Mouse Model. *J. Virol.* 2007, 81(2):698. DOI: 10.1128/JVI.00844-06. Published Ahead of Print 18 October 2006.
122. Gabriella Cseke, David W. Wright, y John V. Williams, Human Metapneumovirus Fusion Protein Vaccines That Are Immunogenic and Protective in Cotton Rats.

I.- [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/ari/en/index3.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index3.html). 2009.

II.-UniProtKB. <http://www.uniprot.org>. 2012.

III.- viruses, R.s.v.a.p. [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/ari/en/index3.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index3.html). 2009.

IV.- CENAVECE.2010; Available from: <http://www.cenavece.salud.gob.mx/>

V.- <http://www.sinais.salud.gob.mx/>.

VI.- <http://epidemiologiamolecular.com/paramixovirus/>

VII.- <http://www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/Reuniones/PediatricaSBA/Marzo2004/2355>

## ANEXO I . HISTORIA CLINICA.

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



17	INdRE	1326	5	M	ENASO	/	04/01/2010	08/01/2010	ETI	HOSPITALIZADO
p18	INdRE	1333	3	M	EFAR	/	13/01/2010	18/01/2010	IRAG	HOSPITALIZADO
19	INdRE	1335	24	F	SOB	TABASCO	25/01/2011	27/01/2011	ETI	CASO GRAVE
20	INdRE	1335	36	M	EFAR	/	17/01/2010	18/01/2010	IRAG	HOSPITALIZADO
21	UASLP	1344	5	M	/	SLP	/	11/12/2004	NEUMONIA	HOSPITALIZADO
22	UASLP	1348	5	M	/	SLP	/	14/12/2004	NEUMONIA	HOSPITALIZADO
23	INdRE	1375	24	M	EFAR	MICHACÁN	02/02/2011	04/02/2011	DX PANEL	/
24	INdRE	1377	2	M	EFAR	MICHACÁN	02/02/2011	08/02/2011	DX PANEL	/
25	INdRE	1378	5	M	EFAR	MICHACÁN	08/02/2011	11/02/2011	DX PANEL	/
26*	INdRE	1418	696	M	SOB	NUEVO LEÓN	04/02/2011	06/02/2011	ETI	CASO GRAVE
27*	INdRE	1426	888	M	EFAR	QUERETARO	07/02/2011	10/02/2011	ETI	CASO GRAVE
28	INdRE	1432	10	F	EFAR	/	01/02/2010	02/02/2010	ETI	HOSPITALIZADO
29	INdRE	1440	8	M	SOB	JALISCO	07/02/2011	07/02/2011	IRAG	CASO GRAVE
30	INdRE	1452	11	F	SOB	JALISCO	12/02/2011	15/02/2011	ETI	CASO GRAVE
31*	INdRE	1537	264	M	EFAR	EDO. MEX	22/02/2011	23/02/2011	Influenza	CASO NO GRAVE
32	INdRE	1586	0	M	SOB	GUERRERO	21/02/2011	24/02/2011	DX PANEL	BROTE
33	INdRE	1589	1	F	EFAR	/	20/02/2010	22/02/2010	ETI	HOSPITALIZADO
34	INdRE	1661	10	F	EFAR	/	07/02/2010	10/02/2010	ETI	HOSPITALIZADO
35	INdRE	1690	17	M	EFAR	GUERRERO	21/02/2011	03/03/2011	DX PANEL	BROTE
36	INdRE	1693	3	M	EFAR	GUERRERO	25/02/2011	04/03/2011	DX PANEL	BROTE
37	INdRE	1773	24	F	SOB	GUERRERO	22/02/2011	24/02/2011	DX PANEL	BROTE
38	INdRE	1874	2	F	SOB	GUERRERO	01/03/2011	10/03/2011	DX PANEL	BROTE

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

39*	INdRE	1883	288	F	EFAR	DF	17/03/2011	22/03/2011	Influenza	CASO NO GRAVE
40	INdRE	1894	12	F	SOB	GUERRERO	15/02/2011	15/03/2011	IRAG	CASO GRAVE
41*	INdRE	1905	132	F	ENASO	/	16/02/2010	19/02/2010	ETI	CASO NO GRAVE
42*	INdRE	1917	984	F	SOB	QUERETARO	10/03/2011	13/03/2011	Influenza	CASO GRAVE
43*	INdRE	1918	744	F	SOB	QUERETARO	05/03/2011	11/03/2011	Influenza	CASO GRAVE
44	INdRE	1930	24	M	SOB	GUERRERO	13/03/2011	14/03/2011	DX PANEL	BROTE
45	INdRE	2017	24	M	SOB	GUERRERO	16/03/2011	17/03/2011	ETI	CASO NO GRAVE
46	INdRE	2023	36	M	SOB	GUERRERO	21/03/2011	24/03/2011	IRAG	CASO NO GRAVE
47*	INdRE	2129	720	F	SOB	GUERRERO	20/03/2011	24/03/2011	ETI	CASO NO GRAVE
48	INdRE	2168	3	M	SOB	CHIHUAHUA	28/03/2011	31/03/2011	IRAG	BROTE
49	INdRE	2187	12	F	EFAR	/	23/02/2010	26/02/2010	ETI	HOSPITALIZADO
50*	INdRE	2191	192	F	SOB	CHIHUAHUA	28/03/2011	01/04/2011	ETI	BROTE
51	INdRE	2225	12	M	SOB	GUERRERO	29/03/2011	31/03/2011	DX PANEL	/
52	INdRE	2242	12	M	EFAR	DF	03/04/2011	04/04/2011	ETI	CASO GRAVE
53	INdRE	2270	12	M	ENASO	DF	05/04/2011	07/04/2011	IRAG	CASO NO GRAVE
54	INdRE	2340	12	M	SOB	CHIHUAHUA	31/03/2011	01/04/2011	Influenza	HOSPITALIZADO
55	INdRE	2348	8	M	SOB	CHIHUAHUA	30/03/2011	02/04/2011	IRAG	CASO NO GRAVE
56	INdRE	2371	12	M	SOB	CHIHUAHUA	31/03/2011	04/04/2011	INFLUENZA	HOSPITALIZADO
57	INdRE	2431	12	M	EFAR	/	07/03/2010	14/03/2010	ETI	CASO GRAVE
58	INdRE	2436	48	F	EFAR	DF	12/04/2011	12/04/2011	Influenza	CASO NO GRAVE
59*	INdRE	2453	288	F	SOB	DF	05/04/2011	07/04/2011	ETI	CASO GRAVE

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

60	INdRE	2508	48	F	SOB	CHIHUAHUA	09/04/2011	11/04/2011	Influenza	En tratamiento
61*	INdRE	2522	996	M	SOB	CHIHUAHUA	09/04/2011	13/04/2011	ETI	DEFUNCIÓN
62	INdRE	2523	11	M	SOB	CHIHUAHUA	10/04/2011	13/04/2011	Influenza	HOSPITALIZADO
63	INdRE	2524	36	F	SOB	CHIHUAHUA	09/04/2011	14/04/2011	Influenza	HOSPITALIZADO
64	INdRE	2652	1	M	EFAR	/	23/03/2010	26/03/2010	IRAG	CASO NO GRAVE
65	INdRE	2719	8	M	SOB	CHIHUAHUA	15/04/2011	18/04/2011	Influenza	A H1 PDM CHIHUAHUA
66	UASLP	3101	/	M	/	SLP	/	12/11/2006	BRONQUIOLITIS	/
67	UASLP	3102	/	M	/	SLP	/	11/11/2006	BRONQUIOLITIS	/
68	UASLP	3112	/	M	/	SLP	/	13/11/2006	BRONQUIOLITIS	/
69	UASLP	3114	/	F	/	SLP	/	14/11/2006	BRONQUIOLITIS	/
70	UASLP	3115	/	F	/	SLP	/	14/11/2006	BRONQUIOLITIS	/
71	UASLP	3152	/	M	/	SLP	/	21/11/2006	BRONQUIOLITIS	/
72	UASLP	3491	/	/	/	SLP	/	/	/	/
73	UASLP	3496	/	/	/	SLP	/	/	/	/
74	UASLP	3497	/	/	/	SLP	/	/	/	/
75	UASLP	3503	/	/	/	SLP	/	/	/	/
76	UASLP	3510	/	/	/	SLP	/	/	/	/
77	UASLP	3511	/	/	/	SLP	/	/	/	/
78	UASLP	3611	/	/	/	SLP	/	/	/	/
79	UASLP	3612	/	/	/	SLP	/	/	/	/
80	UASLP	3614	/	/	/	SLP	/	/	/	/
81	UASLP	3618	/	/	/	SLP	/	/	/	/
82	UASLP	3619	/	/	/	SLP	/	/	/	/

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

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

105	INdRE	4468	24	M	EFAR	/	18/10/2008	20/10/2008	INFLUENZA	/
106	INdRE	4510	36	M	EFAR	/	22/10/2008	24/10/2008	INFLUENZA	/
107	INdRE	4514	24	F	EFAR	/	26/10/2008	28/10/2008	INFLUENZA	/
108	INdRE	4520	36	F	EFAR	/	18/10/2008	22/10/2008	INFLUENZA	/
109	INdRE	4593	1	F	EFAR	/	26/10/2008	29/10/2008	INFLUENZA	/
110	UASLP	4969	/	/	/	SLP	/	/	/	/
111	UASLP	5084	/	/	/	SLP	/	/	/	/
112	UASLP	5153	/	/	/	SLP	/	/	/	/
113	UASLP	5162	/	/	/	SLP	/	/	/	/
114	UASLP	5243	/	/	/	SLP	/	/	/	/
115	UASLP	5281	/	/	/	SLP	/	/	/	/
116	UASLP	5524	/	/	/	SLP	/	/	/	/
117	UASLP	5614	/	/	/	SLP	/	/	/	/
118	UASLP	5615	/	/	/	SLP	/	/	/	/
119	UASLP	5622	/	/	/	SLP	/	/	/	/
120	UASLP	5630	/	/	/	SLP	/	/	/	/
121	UASLP	5637	/	/	/	SLP	/	/	/	/
122	UASLP	5643	/	/	/	SLP	/	/	/	/
124	UASLP	5651	/	/	/	SLP	/	/	/	/
125	HRALM	UP-044	2 AÑOS	M	/	/	28/04/2013	/	EVACUACIONES CON MOCO Y SIN SANGRE ADEMAS DE INFECCION DE VIAS RESPIRATORIAS	
126	HRALM	UP-051	1AÑO	F	/	/	28/04/2013	/	FIEBRE NO CUANTIFICADA CON RINORREA HIALINA	

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

127	HRALM	UP-061	8 AÑOS	F	/	/	3/05/20013	/	ODINOFAGIA, CON SENSACION DE CUERPO EXTRAÑO AL DEGLUTIR, OROFARINGE HIPEREMICA
128	HRALM	UP-012	1 AÑO	M	/	/	6/05/13	/	DIFICULTAD RESPIRATORIA, ESTRIDOR, FIEBRE, FARINGE HIPEREMICA, DESCARGA HIALINA, SIBILANCIAS EN HEMITORAX IZQUIERDO,
129	HRALM	UP-1305	1 AÑO	M	/	/	17/05/2013	/	FIBRE, RINORREA HIALINA, SIN TOS, FARINGE HIPEREMICA CON DESCARGA HIALINA
130	HRALM	UP-027	5 AÑOS	F	/	/	19/05/2013	/	SECRECIÓN HIALINA, FARINGE HIPEREMICA, CON DESCARGA POSTERIOR HIALINA,
131	HRALM	UP-023	1 AÑO	F	/	/	20/05/2013	/	RINORREA HIALINA, SECRECIÓN HIALINA CON FARINGE HIPEREMICA
132	HRALM	UP-022	1 AÑO	M	/	/	21/05/2013	/	DERMATOSIS EN LA ESPALDA DESPUES EL CUELLO Y CARA POSTERIORMENTE GENERALIZADO.
133	HRALM	UP-024	1 AÑO	M	/	/	22/05/2013	/	NARINAS PERMEABLES, CON SECRECIÓN HIALINA A CAVIDAD ORAL, FARINGE HIPEREMICA

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

									CONGESTIVA CON DESCARGA POSTERIOR HIALINA
134	HRALM	UP-071	3 AÑOS	M	/	/	22/05/2013	/	SECRESION HIALINA EN CAVIDAD ORAL, AMIGDALAS HIPEREMICAS GRADO II CON DESCARGA HIALINA SIN EXUDADOS, LENGUA HIPEREMICA EN LA PUNTA
135	HRALM	UP-062	3 AÑOS	F	/	/	23/05/2013	/	AFEBRIL CON RINORREA HIALINA, FARINGE HIPEREMICA GRANULOSA SIN EXUDADOS NI DESCARGA, HIPERTROFIA AMIGDALINA GRADO I, PUENTES HIALINOS, CUELLO CON ADENOMATIAS
136	HRALM	UP-311			/	/	31/05/2013	/	
137	HRALM	UP-312			/	/	31/05/2013	/	
138	HRALM	UP-030	3 AÑOS	F	/	/	03/06/2013	/	RINORRE HIALINA, TOS, FIEBRE, FARINGE HIPEREMICA CONGESTIVA
139*	HRALM	UP-007	10 AÑOS	F	/	/	03/06/2013	/	FIEBRE, ODINOFAGIA, RINORREA, OROFARINGE HIPEREMICA, CONGESTIVO, CUELLO CON

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

									ADENOPATIAS SUBMANDIBULARES, DOLOROSAS A LA PALPACION	
140*	HRALM	UP-025	6 AÑOS	M	/	/	03/06/2013	/	RINORREA HIALINA ABUNDANTE, ODINOFAGIA, TOS, ASTENIA Y ADINAMIA, OROFARINGE HIPEREMICA	
141	HRALM	UP-011	2 AÑOS	M	/	/	04/06/2013	/	RINORREA HIALINA SIN FIEBRE, OROFARINGE HIPEREMICA CONGESTIVA	
142	HRALM	UP-018	1 AÑOS	F	/	/	04/06/2013	/	ESTORNUDOS, RINORREA CON TOS . FARINGE HIPEREMICA SIN EXUDADOS Y CONGESTIVA	
143	HRALM	UP-SL1306	6 AÑOS	M	/	/	05/06/2013	/	ASTENIA, ADINAMIA, CON TOS EN ACCESOS, FIEBRE DE 40, RINORREA HIALINA, FARINGE HIPEREMICA, HIPERTROFICA GRADO II	
144*	HRALM	UP- RMED0617	14 AÑOS	F	/	/	17/06/2013	/	RINORREA HIALINA, AASTENIA, ADINAMIA, CEFALEA, ODINOFAGIA, OROFARINGE HIPEREMICA,	
145	INdRE	<b>0,003</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
146	INdRE	<b>0,005</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.



147	INdRE	<b>928</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
148	INdRE	<b>1686</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
149	INdRE	<b>2225</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
150	INdRE	<b>0,70</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
151	INdRE	<b>0,90</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
152	INdRE	<b>0,92</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
153	INdRE	<b>145</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
154	INdRE	<b>1115</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
155	INdRE	<b>1137</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
156	INdRE	<b>1576</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
157	INdRE	<b>1635</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
158	INdRE	<b>1724</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
159	INdRE	<b>1772</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
160	INdRE	<b>1798</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
161	INdRE	<b>1904</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
162	INdRE	<b>1937</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
163	INdRE	<b>1961</b>	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	/
164	HRALM	<b>611</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
165	HRALM	<b>1044</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
166	HRALM	<b>1232</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
167	HRALM	<b>1904</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
168	HRALM	<b>2632</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
169	HRALM	<b>3109</b>	/	/	/	/	/	/	/	/

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

170	HRALM	<b>3122</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
171	HRALM	<b>4108</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
172	HRALM	<b>4516</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
173*	HRALM	<b>617</b>	14AÑOS	F	/	/	/	/	/	/
174	HRALM	<b>208</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
175	HRALM	<b>308</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
176	HRALM	<b>408</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
177	HRALM	<b>508</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
178	HRALM	<b>806</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
179	HRALM	<b>807</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
180	HRALM	<b>808</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
181	HRALM	<b>908</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
182	HRALM	<b>1008</b>	/	/	/	/	/	/	/	/
183	HRALM	<b>109</b>	/	/	/	/	/	/	/	/

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

## ANEXO II. Ensayos de IF y PCR-RT.

No. De Muestra	Resultado en IFD		Resultados RT-PCR				
	hRSV	hMPV	hRSV (F 193pb)	hMPV (L 447pb)	hMPV (N 599pb)	hRSV- A (GA549pb)	hRSV-B 18537(Gb 106pb)
671	+	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1032	-	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1040	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
1062	-	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
1098	+	-	negativo	negativo	positivo	negativo	Positivo
1099	+	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1162	+	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1189	+	-	Positivo	negativo	positivo	negativo	Positivo
1202	+	-	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1207	-	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1222	+	+	negativo	Positivo	Positivo	positivo	Negativo
1255	-	-	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
1282	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
1293	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
1298	-	-	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
1325	+	-	Positivo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
1326	+	-	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1333	+	-	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
1335	+	-	Positivo	negativo	Positivo	positivo	Negativo

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

1344	+	+	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1348	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
1375	+	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	Positivo
1377	+	-	negativo	negativo	Positivo	negativo	Positivo
1378	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
1418	+	-	negativo	negativo	positivo	negativo	Positivo
1426	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
1432	+	-	Positivo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
1440	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo
1452	+	-	Positivo	negativo	positivo	positivo	Positivo
1537	-	-	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
1586	-	-	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
1589	+	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1661	+	-	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1690	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
1693	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
1773	-	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
1874	+	-	positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo
1883	-	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
1894	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
1905	+	-	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1917	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
1918	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
1930	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
2017	+	+	negativo	Positivo	negativo	negativo	Negativo

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

2023	+	+	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo
2129	+	+	negativo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
2168	+	+	negativo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
2187	+	-	negativo	negativo	negativo	negativo	Positivo
2191	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
2225	+	+	negativo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
2242	+	-	Positivo	negativo	Positivo	negativo	Positivo
2270	+	+	negativo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
2340	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
2348	+	-	negativo	negativo	Positivo	negativo	Positivo
2371	-	-	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
2431	+	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
2436	-	+	negativo	Positivo	positivo	negativo	Negativo
2453	-	+	negativo	Positivo	positivo	negativo	Negativo
2508	-	-	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
2522	-	-	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
2523	-	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
2524	-	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
2652	-	-	Positivo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
2719	-	+	negativo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
3101	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3102	+	-	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
3112	+	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
3114	+	-	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
3115	+	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

3152	+	-	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
3491	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo
3496	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo
3497	+	-	Positivo	negativo	Positivo	negativo	Positivo
3503	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo
3510	-	+	negativo	Positivo	positivo	negativo	Negativo
3511	+	-	Positivo	negativo	positivo	negativo	Negativo
3611	-	-	positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3612	+	-	Positivo	negativo	positivo	negativo	Positivo
3614	-	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3618	+	-	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3619	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3629	+	-	Positivo	negativo	positivo	negativo	Positivo
3637	+	-	positivo	negativo	Positivo	negativo	Positivo
3651	+	+	negativo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
3652	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
3699/3659	+	+	Positivo	negativo	Positivo	positivo	Negativo
3670	-	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
3671	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo
3674	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
3679	-	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
3696	+	-	negativo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
3705	+	-	Positivo	negativo	Positivo	negativo	Positivo
3721	+	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
3734	-	-	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

3749	+	-	Positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo
3763	-	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
3973	-	+	Positivo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
4102	-	+	Positivo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
4112	+	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
4130	+	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
4208	+	+	Positivo	Positivo	Positivo	negativo	Negativo
4310	-	-	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
4355	+	-	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
4406	-	-	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
4468	-	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
4510	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
4514	+	-	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
4520	-	-	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
4593	+	-	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
4969	-	-	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
5084	-	+	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo
5153	-	-	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
5162	-	-	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
5243	-	+	negativo	Positivo	positivo	negativo	negativo
5281	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
5524	-	+	negativo	Positivo	positivo	negativo	negativo
5614	+	-	Positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo
5615	-	-	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
5622	+	-	Positivo	negativo	positivo	negativo	positivo

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

5630	+	+	negativo	Positivo	positivo	negativo	negativo
5637	+	-	Positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
5643	+	-	Positivo	negativo	positivo	negativo	positivo
5651/5661	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
0,11	-	+	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo
0,12	+	+	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo
0,18	-	+	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
0,25	+	-	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
0,30	+	-	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
0,44	-	+	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo
0,51	+	-	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo
0,61	-	-	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo
0,62	+	+	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
0,71	+	-	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
0,25	+	-	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
312	+	-	positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo
1305	+	-	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
9023	-	+	negativo	positivo	Positivo	negativo	negativo
9027	+	+	positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo
617	-	-	Positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
208	-	+	negativo	positivo	Positivo	negativo	negativo
308	+	+	positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo
408	-	-	Positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo
508	-	+	Positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.



806	+	+	Positivo	negativo	positivo	positivo	negativo
807	+	+	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
808	+	+	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
908	+	-	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
1008	-	+	Positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
109	+	+	Positivo	negativo	positivo	negativo	positivo
209	-	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
309	-	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
409	+	-	Positivo	negativo	negativo	positivo	positivo
509	-	+	Positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
609	+	-	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
0,003	-	-	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo
0,005	-	+	negativo	Positivo	negativo	negativo	positivo
928	-	+	negativo	Positivo	negativo	negativo	positivo
1686	+	+	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo
2225	-	+	negativo	Positivo	negativo	negativo	positivo
0,70	+	-	negativo	Positivo	negativo	negativo	positivo
0,90	+	-	negativo	Positivo	positivo	negativo	positivo
0,92	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
145	+	+	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo
1115	-	+	negativo	Positivo	negativo	positivo	negativo
1137	-	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
1576	-	+	Positivo	negativo	Positivo	positivo	negativo
1635	-	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
1724	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA´s PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.

<b>1772</b>	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
<b>1798</b>	-	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
<b>1904</b>	-	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
<b>1937</b>	-	+	Positivo	Positivo	Positivo	negativo	positivo
<b>1961</b>	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
<b>611</b>	+	-	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
<b>1044</b>	+	-	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo
<b>1232</b>	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo
<b>1904</b>	+	-	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo
<b>2632</b>	+	-	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo
<b>3109</b>	+	-	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
<b>3122</b>	+	-	postivo	negativo	negativo	positivo	negativo
<b>4108</b>	+	-	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo
<b>4516</b>	+	-	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo

MUESTRAS con \* SE ENCUENTRAN POR ARRIBA DE LA EDAD QUE SE TIENE REPORTADO PARA LAS IRA's PERO QUE SON PROPORCIONASAS INDISTINTAMENTE POR EL HOSPITAL O INSTITUTO.