



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“INCIDENCIA DE COINFECCIONES VIRALES (HRSV, HMPV Y HPIV-2)
EN PACIENTES EN EDAD PEDIATRICA CON INFECCION
RESPIRATORIA AGUDA”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

NORVELL PEREZBUSTA LARA

TUTOR DE TESIS

Dra. ROCIO GABRIELA TIRADO MENDOZA



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Epidemiology is like a bikini:
What is revealed is interesting,
what is concealed is crucial”

Peter H. Duesberg.

AGRADECIMIENTOS

Hablamos de Dios, la Vida, la Naturaleza y el Destino como si fueran sinónimos, hoy quisiera agradecer a todos ellos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por aceptarme y por abrigarme todo este tiempo.

A la Honorable Facultad de Química, por enseñarme antes de ser Químico, la responsabilidad que caería sobre mí al serlo.

A mis Padres; Salvador Perez Gonzalez y Mayra Lara Martin por ser un ejemplo de valor, coraje, humildad, honestidad, esfuerzo y sobre todo de amor. Gracias por haber inculcado en mis valores y principios.

Gracias Papá, por compartir toda esa experiencia que acumulas a través del tiempo, gracias por estar siempre que te he necesitado, por ser un padre cariñoso y juguetón, por compartir conmigo ese sentido del humor que solo tú y yo entendemos.

Gracias Mamá, por preocuparte por mí "día a día", pero sobre todo gracias por sacar la casta cuando más te necesitamos, gracias por participar en mi vida activamente. Pero lo que más agradezco es que seas tú mi madre.

A mi Hermano Salvador Perezbusta Lara, por ser mi mejor amigo, confidente, por tus consejos, protección, risas y confianza. Gracias Jr por ser mi hermano. Aunque la hermandad es un título que se otorga al nacer, la haz defendido ferozmente. Gracias por presionarme a sacar lo mejor de mí. Espero nunca defraudarte hermano.

A Humberto Correa Álvarez †, por enseñarme "A vivir como si no hubiera un mañana, porque no sabremos si lo haya"

A Diana Belén H. Baltazar, por apoyarme, tratar de entenderme (que no es nada fácil), nunca juzgarme y confiar en mí. Gracias jamona por estar en mi vida, pero más aún por dejarme ser parte de la tuya.

A Luis Fernando Domínguez Villagrán por brindarme tu amistad desinteresada, gracias Fer por ayudarme a salir del hoyo pero en especial, gracias por estar ahí cuando estábamos en él.

A Viridiana Córdoba Hernández, por ser mi mejor amiga, por esas tardes interminables de café. Gracias por estar ahí para mí siempre, por oírme y brindar tus mejores consejos, pero sobre todo por regañarme.

A Ismael Alejandro Hernández González y Miguel Ángel Hernández González (es difícil pensar en uno sin que me venga a la mente el otro) por su compañerismo, fraternidad y por ser mis trillizos no biológicos.

A Rocío G. Tirado Mendoza, principalmente por creer en mí, gracias por regalarme tu amistad y consejo.

A mis compañeros de laboratorio, Karla, Laura, Sergio, Mauricio, Viry y Daniel por esas tardes de trabajo que parecían todo menos eso.

A la Dra. Patricia Margarita Tato Mendoza †, por aceptarme en su laboratorio, aún la recuerdo viéndome llegar con mis pantalones rotos diciéndome “Ay Norvell”

A mis compañeros de la facultad, muchos de ustedes se quedaron en el camino, espero que hayan encontrado el suyo.

A mis profesores de la Facultad, gracias por nunca haber sido egoístas con el conocimiento.

A mi Tía Carmen por brindarme tu apoyo, por darme una casa y por tus bendiciones de día y de noche.

A mi Tía Amparo Lara Martin, por tu particular modo de ver la vida, el cual pone en perspectiva el mío.

A mi Tío Rolando Lara Martin †, por tus anécdotas tan especiales y recordarte siempre con una sonrisa.

A mis Sinodales Eduardo Bonilla Espinosa y Ruth Edith Martin Fuentes por sus valiosos comentarios al presente trabajo.

A mi actual jefe de laboratorio Roberto Tovar por brindarme su amistad y todas las facilidades para realizar el trabajo presente.

Al personal Operativo de la Facultad de Química, que me ayudaron en mil ocasiones.

A todos y cada uno de mis trabajos, que han ayudado a discernir mi verdadera vocación.

A todas esas personas que directamente o indirectamente han estado en mi vida.

Gracias a todas las experiencias, buenas y malas, ya que sin ellas no sería quien soy ahora.

ÍNDICE

1. Antecedentes.....	6
1.1 Virus de RNA (-).....	6
1.1.2. Características de la Familia Paramixoviridae.....	6
1.1.2.1. Características de hRSV.....	8
1.1.2.2. Características del hMPV	9
1.1.2.3Características del hPIV-2.....	9
1.2.2 Proteínas Virales presentes en hRSV, hMPV y hPIV-2.....	11
1.2.3 Proteínas Virales semejantes entre hRSV, hMPV.....	14
1.2.2.1 Proteína V.....	16
1.2.2.2 Receptores Celulares.....	17
1.2.4 Ciclo Replicativo.....	17
1.2.4.1 Unión y Fusión.....	18
1.2.4.2 Transcripción.....	19
1.2.4.3 Replicación.....	20
1.1.3- Patogénesis de la infección por hRSV, hMPV y hPIV-2.....	20
1.1.3.1 Coinfecciones virales.....	21
1.1.4.1 Respuesta inmunológica innata.....	23
1.1.4.2 Respuesta inmune adaptativa.....	23
1.3 Diagnóstico.....	26
1.3.1 Tratamientos.....	27
1.3.2 Profilaxis.....	30
1.3.2.1 Anticuerpos cruzados.....	31
1.3.3 Vacunas.....	31
1.4 Infecciones Respiratorias Agudas.....	32
1.5 Incidencia.....	33

2.1 Justificación.....	34
2.2 Planteamiento del problema.....	35
2.3 Objetivos.....	36
2.3.1 Objetivo General.....	36
2.3.2 Objetivo particulares.....	36
3.1 Metodología.....	37
3.1.2 Muestras Clínicas.....	37
3.1.3 Propagación de Células HEP-2 y VERO.....	37
3.1.4 Propagación de Cepas Virales.....	37
3.1.5 Título viral.....	38
3.1.6 Aislamiento viral.....	38
3.1.6.1 Controles internos.....	39
3.2.1 Extracción de RNA.....	40
3.2.2 Cuantificación de RNA.....	40
3.2.3 Síntesis de DNA complementario.....	41
3.3.1 Diseño de oligonucleótidos.....	42
3.3.2 Amplificación por PCR.....	43
3.3.3 Revelado.....	43
3.3.4 Manejo de Datos.....	43
4.1 Resultados.....	41
4.1.1 Determinación del título viral.....	41
4.1.2 Aislamiento viral.....	41
4.1.3 Genotipificación de aislados virales.....	45
4.1.3.1 hRSV.....	45

4.1.3.2 hMPV.....	46
4.1.3.3 hPIV-2.....	47
4.1.3.4 Beta-actina.....	47
4.2 Muestras Clínicas.....	48
4.3 Diagnóstico clínico.....	49
4.4 Coinfecciones virales.....	50
4.4.1 Coinfección viral por virus.....	51
4.4.2 Coinfección viral hRSV A y B.....	52
4.4.3 Coinfecciones virales por mes.....	53
4.4.4 Coinfecciones virales por Región geográfica.....	54
4.4.5. Coinfecciones virales (hRSV A y B) por Estado geográfico.....	55
5.1 Discusión y Análisis de Resultados.....	56
5.1.1 Conclusiones.....	60
6.1 Perspectivas.....	60

Anexos

1. Historia Clínica.....	69
2. Relación de muestras con resultados de RT-PCR.....	74

Resumen.

Las enfermedades respiratorias según la OMS (Organización Mundial de la Salud) son la principal causa de muerte en pacientes pediátricos menores de 5 años de edad. Los virus respiratorios son considerados importantes agentes etiológicos de este tipo de enfermedades, dentro de los agentes virales se encuentran el Virus Sincitial Respiratorio Humano (hRSV) y el Metaneumovirus humano (hMPV) como primera y segunda causa de bronquiolitis respectivamente, así como, el virus de Parainfluenza humana tipo 2, este último es de gran importancia en pacientes inmunocomprometidos. A pesar de su importancia médica, en nuestro país no se cuenta con estudios epidemiológicos que aporten información sobre la prevalencia ni patrones de circulación de alguno de estos virus, además no se realiza el diagnóstico diferencial por pruebas moleculares. El diagnóstico diferencial se realiza mediante la guía práctica clínica IMSS-062-08, sumado a esto no existen vacunas ni tratamiento específico para cualquiera de estos virus, de ahí la importancia de la implementación de pruebas moleculares para la identificación del agente etiológico responsable y con ello proporcionar apoyo al personal médico para un tratamiento acertado, aportar información sobre la relación entre la gravedad de la enfermedad y el o los agentes etiológicos y su subtipo, así como proporcionar información y datos que fortalezcan las redes de vigilancia epidemiológica. En el presente trabajo se analizaron 200 muestras clínicas obtenidas por exudado faríngeo y nasofaríngeo a partir de pacientes pediátricos (0-5 años de edad) hospitalizados por infección respiratoria aguda (IRA) provenientes del Hospital Regional Adolfo López Mateos (HRAIM), el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). El estudio nos permitió establecer la relación entre las coinfecciones virales y la gravedad de la enfermedad, para lo cual se llevó a cabo inicialmente el aislamiento viral de hRSV, hMPV en la línea celular Hep-2 y hPIV-2 en la línea celular Vero. Cada muestra se cosechó después de tres pases ciegos luego de presentar efecto citopático (cambios morfológicos como sincitios o desprendimiento de la monocapa), estos pases correspondieron a los aislados virales. Cada aislado viral se genotipificó

mediante la técnica de RT-PCR (retro transcriptasa) de punto final con oligonucleótidos específicos para cada virus y el gen que codifica para ciertas proteínas; hRSV F (para distinguir tipo) y G (Subtipo A o B), hMPV N y L, y hPIV-2 HN.

Resultados. Se genotipificaron los aislados virales provenientes de 200 muestras clínicas, de las cuales un total de 182 muestras, presentan infección o coinfección por uno o varios de los tres virus estudiados.

La infección con mayor incidencia según los genes amplificados y subtipos, esta corresponde aquellas muestras en las cuales se identificó a hMPV con hRSV (B), representando 24 casos positivos respectivamente.

Si consideramos la coinfección por la presencia o ausencia del virus (hRSV, hMPV y/o hPIV-2), sin considerar el subtipo o el gen amplificado, se encuentra que la coinfección por hMPV y hRSV es la presenta mayor incidencia con 47 casos positivos en relación a la coinfección por hRSV con hPIV-2 y hMPV con hPIV-2, al presentar 2 casos positivos respectivamente, así como la coinfección por hRSV, hPIV-2 y hMPV con 5 casos positivos.

1- Antecedentes.

1.1- Virus de RNA(-)

Los virus de RNA de polaridad negativa pertenecen al orden de los Mononegavirales y al grupo 4 de acuerdo a la clasificación de Baltimore. Son virus envueltos con una cápside helicoidal, dentro de este orden se encuentran las familias Rhabdoviridae, Filoviridae y Paramixoviridae.

1.1.2- Características de la familia *Paramixoviridae*.

Los miembros de la familia Paramyxoviridae se divide en dos subfamilias, Paramyxovirinae y Pneumovirinae. La Familia Paramyxovirinae actualmente se ha subdividido en siete géneros; Aquaparamyxovirus, Avulavirus, Ferlavirus, Heniavirus, Morbillivirus, Respirivirus y Rubulavirus este último contiene al virus de parainfluenza humana (hPIV-2), por otro lado, la familia Pneumovirinae se encuentra conformada por los géneros Pneumovirus y Metaneumovirus. Los cuales albergan al virus sincitial respiratorio humano (hRSV) y metaneumovirus humano (hMPV) respectivamente

Tanto hRSV, hMPV y hPIV-2 son de gran importancia médica ya que representan las primeras causas de muerte en niños menores de 5 años de edad.

Estos tres virus llevan a cabo su replicación en el citoplasma y la liberación de las partículas virales es por gemación a partir de la membrana plasmática de la célula hospedera de la cual adquieren la envoltura viral. Las células blanco de estos virus son las células del epitelio del tracto respiratorio.

Resulta importante mencionar que cualquiera de estos virus pueden por si solos ser los agentes etiológicos de la enfermedad, sin embargo pueden estar presentes como coinfecciones virales.

Los miembros de la familia Paramyxoviridae presentan proteínas estructurales comunes entre estos virus (Imagen 1). Las proteínas estructurales son como su nombre lo dicen las que conforman al virión. Las proteínas transmembranales de unión, la glicoproteína G en el caso de hRSV y hMPV, y para el caso de hPIV-2 la proteína HN, y la proteína F (Fusión), ésta última induce la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula diana, también se encarga de la fusión entre células lo cual permite la propagación del virus de célula a célula, este mecanismo favorece la evasión de la respuesta inmune, a través de inducir la formación de sincitios (células gigantes multinucleadas).¹¹ La proteína SH también se encuentra distribuida en todo el perímetro de la partícula viral, aunque la actividad de esta proteína aún no está del todo clara se le relaciona fuertemente con la

inhibición de la apoptosis además de participar en la regulación de tipo I IFN a través de la focalización de STAT1 (Signal transducer and activator of transcription 1)^{III}. La proteína M o de matriz localizada en la cara interna de la envoltura interviene en la morfogénesis de la partícula viral. La nucleocápside helicoidal de aproximadamente 18 nm está conformada por 3 proteínas (N, P y L), sin embargo, cada virus presenta determinada característica según la proteína que lo conforma. Las proteínas no estructurales son aquellas que no forman parte de la estructura viral, son asociadas a factores de virulencia o mecanismos de regulación de la replicación viral. Las proteínas NS1 y NS2 son proteínas no estructurales (en el caso de hRSV) están implicadas en la disminución de la expresión de interferón tipo I, bloquean la activación del factor 3 regulador del IFN, lo cual favorece el equilibrio entre células Th2/Th1.^{IV}

En el caso de PIV-2 presenta una proteína no estructural V (Proteína accesoria no estructural). Aunque la proteína V no es esencial para la replicación del virus, influye en gran medida en la eficacia de la propagación viral. La proteína V de hPIV-2 degrada STAT2^V La mayoría de las proteínas del huésped que se encuentran disponibles para unirse a la proteína V están implicadas en la inducción y señalización de IFN. Una de las funciones principales de esta proteína parece ser la promover la replicación viral por contrarrestar la respuesta inmune innata del huésped.^{VI}

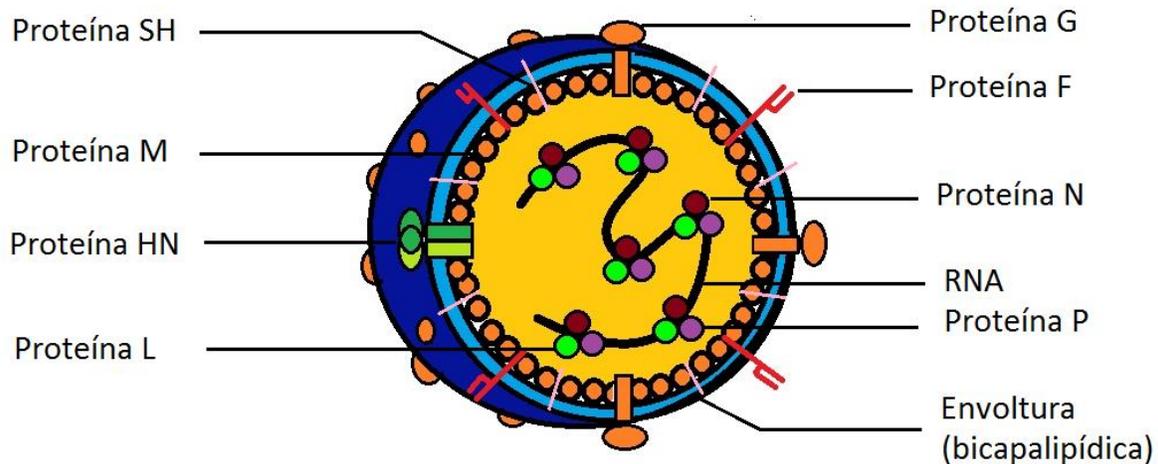


Imagen 1. Representación esquemática de la morfología general de los virus de la familia Paramixoviridae (hRSV, hMPV y hPIV-2)

1.1.2.1- Características del hRSV (por sus siglas en inglés human Respiratory Syncytial Virus)

El hRSV (Virus Sincitial Respiratorio humano) es un problema de salud importante en menores de 5 años y personas de edad avanzada.

El virus hRSV se encuentra clasificado en la subfamilia Pneumovirinae, género Pneumovirus, según la variabilidad de la secuencia que codifica para la proteína G se divide, en dos subgrupos A y B, dentro de los cuales, del subgrupo A se han descrito 7 genotipos, y para el subgrupo B 4 genotipos.

El hRSV presenta un genoma de aproximadamente 15 kb (Imagen.2) contiene secuencias cortas que actúan en “cis” y que señalan el inicio (secuencia GS) y fin (secuencia GE) de cada gen, que codifican para 11 proteínas, 8 de ellas son estructurales (G, F, N, P, L, M, M2-1 y la SH) y 2 no estructurales (NS1 y NS2).

El genoma viral de hRSV codifica mRNA´s monocistronicos (contienen información para una sola cadena polipeptídica) seguido de una adición de cap (5´) con cola de poliadeninas (3´). Contiene un marco de lectura abierto para cada gen expresado, sin embargo M2 contiene un traslape con M2-1 y M2-2. Una característica de hRSV es la superposición de 68 nucleótidos en los genes M2 y L, de modo que la señal del gen M2 (GE) se encuentra corriente abajo de la señal de inicio del gen L (GS).^{vii} Las proteínas no estructurales NS1 y NS2, tienen múltiples funciones en la supresión de la respuesta inmune innata y la modulación de la diferenciación de células T helper^{viii}. Funcionan como antagonistas a la acción del IFN tipo I que interfiere con la actividad del factor de transcripción IRF-3, ya que los IRFs constituyen una familia de factores de transcripción que incluye nueve miembros (IRF-1 de la IRF-9). Cada miembro comparte cierta homología en el dominio de unión a DNA, que se caracteriza por cinco elementos de repetición de triptófano situadas dentro de los primeros 150 aminoácidos de la proteína.^{ix}

hRSV ha evolucionado de tal forma que las proteínas NS1 y NS2 reducen la activación de INF tipo I, inhibiendo el factor de transcripción IRF-3. El IFN-β juega un papel fundamental en la defensa del huésped contra la infección por hRSV, juega un papel importante, controlando la eliminación del virus de las vías respiratorias. Las células infectadas con hRSV utilizan diversos mecanismos incluyendo la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), para activar la liberación de IFN-β durante la infección.^x

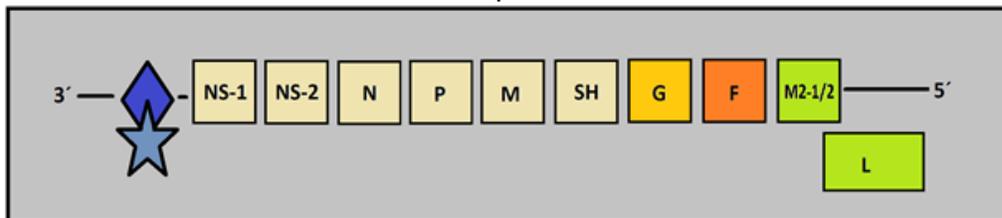


Imagen 2, Representación esquemática del genoma de hRSV, en amarillo, naranja y verde se resaltan los genes que codifican para las proteínas G, F y L respectivamente.

1.1.2.2- Características del hMPV (por sus siglas en inglés human metapneumovirus)

Metapneumovirus humano (hMPV) es considerado un paramixovirus de reciente identificación causante de infecciones agudas del tracto respiratorio superior e inferior. El hMPV (Metapneumo Virus Humano, se clasifica en dos grupos principales A y B, cada uno de ellos dividido en 2 subgrupos según la variabilidad de la secuencia que codifica para la proteína F y G respectivamente. El análisis filogenético de los genes hMPV define dos subgrupos genéticos principales de hMPV, designados A y B, cada uno con dos subgrupos. Presenta un genoma de aproximadamente 13.3 kb que codifica para 8 proteínas estructurales (N, P, M, F, M2-1/2, SH, G, y L), no contiene genes codificantes de proteínas NS1 y NS2 al igual que hRSV tienen múltiples funciones en la supresión de la respuesta inmune innata y la modulación de la diferenciación de células T helper, cada gen con un marco de lectura abierto. (Imagen 3).

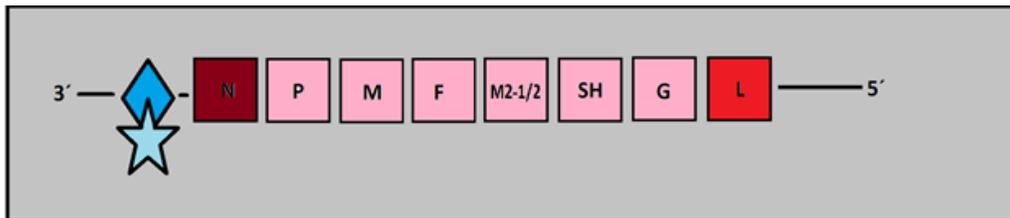


Imagen 3, Representación esquemática del genoma de hMPV, en rojo se resaltan los genes que codifican para las proteínas N y L.

1.1.2.3- Características del hPIV-2 (por sus siglas en inglés human Parainfluenza Virus 2)

Los virus parainfluenza humanos (hPIV), se clasifica genéticamente en cinco tipos, en la literatura científica, constituyendo los serotipos 1, 2 y 3 los más importantes desde el punto de vista médico ^{XI}. En conjunto, los virus hPIVs representan hasta el 18% de las hospitalizaciones pediátricas por enfermedad aguda del tracto respiratorio y causan un espectro de enfermedades que van desde la enfermedad leve del tracto respiratorio superior hasta la enfermedad grave del tracto respiratorio inferior, incluyendo crup, bronquiolitis y neumonía, En los adultos, la infección tiende a permanecer en el tracto respiratorio superior; por otro lado la morbilidad en niños menores de cinco años puede ser grave, Los cuatro tipos de parainfluenza difieren en los cuadros clínicos, hPIV-1 y 2 se han asociado con croup (inflamación de la laringe y tráquea en niños, asociada con infección viral, causando dificultades respiratorias). Muchos de los virus responsables de croup también causan el resfriado común. La mayoría de los activos en los meses de otoño e invierno, croup por lo general los objetivos de los niños menores de 5 años en niños (laringotraqueobronquitis aguda), mientras que hPIV-3 se ha descrito en la bronquiolitis y la neumonía, es por ello que 1, 2 y 3 desde un punto de vista médico representan mayor interés ^{XII} hPIV-2 es una causa importante de enfermedades del

tracto respiratorio, así como de enfermedad febril indiferenciada en niños. En pacientes transplantados y otros pacientes inmunocomprometidos de cualquier edad, el hPIV-2 puede causar enfermedades graves con altas tasas de mortalidad.^{xiii} El hPIV-2 posee un genoma aproximadamente 15 kb (Imagen 4) el cual codifica para 7 proteínas estructurales (N, P, M, F, SH, HN, L) y una proteína no estructural (V) .

El gen P/V de hPIV-2 codifica la subunidad de la fosfoproteína P de la polimerasa viral y la proteína V accesoria. La transcripción del gen P/V produce un RNAm que codifica la proteína V. Alternativamente, la inserción co-transcripcional de dos nucleótidos de guanina generan un RNAm con un desplazamiento de marco de lectura que codifica la proteína P. Por lo tanto, las proteínas P y V comparten los primeros 164 aminoácidos N-terminales, pero tienen C-terminales distintos. La edición de RNA para insertar nucleótidos pseudotemplados es un mecanismo viral conservado que ocurre en casi todos los miembros de los cinco géneros de la subfamilia Paramyxovirinae.

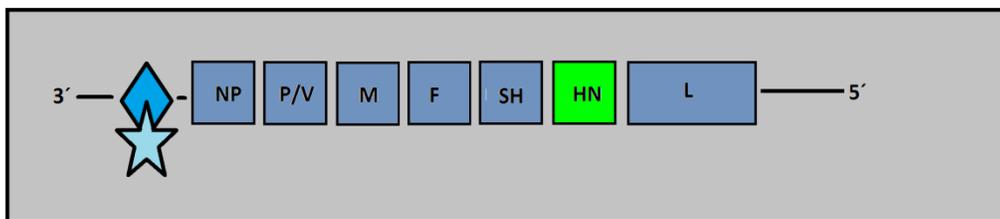


Imagen 4, Representación esquemática del genoma de hPIV-2, en verde se resalta el gen que codifica para la proteína HN.

1.2.2- Proteínas Virales presentes en hRSV, hMPV y hPIV-2.

Proteína Fusión F.

La proteína de fusión, participa en la penetración viral, mediante la fusión entre la envoltura viral y membrana plasmática de la célula huésped, a pH neutro para todos los miembros de la familia, excepto algunas cepas de hMPV, donde el pH bajo (ácido) parece tener algún papel en la activación de la fusión. Gracias a la fusión es posible la internalización de la nucleocápside al citoplasma de la célula huésped, en consecuencia la proteína **F** expresada en la membrana plasmática de las célula infectada produce la fusión con células vecinas para la formación de sincitios (células gigantes multinucleadas), se ensambla en trímeros en la superficie de la membrana y se modifica mediante la adición de carbohidratos unidos a N. La proteína de fusión juega un papel importante en la unión viral, interactúa con el receptor de hRSV: recién descubierto llamado nucleolina^{XIV} (proteína que en humanos está codificada por el gen NCL), teniendo co-receptores como al factor intercelular-1 (ICAM-1)^{XV} así como de RhoA^{XVI} (interacción proteína-proteína entre F y RhoA) y TRL4 (Toll-like Receptor 4)^{XVII}. El efecto citopático puede ocasionar la necrosis del tejido in vivo. La proteína F es un homotrímero (La proteína F, es una proteína integral de membrana tipo I.) la cual se sintetiza como precursor inactivo (Fo), para adquirir actividad biológica debe escindirse por la acción de proteasas de la célula huésped en el compartimiento trans-golgi produciendo dos subunidades F1 (extremo carboxilo) y F2 (extremo amino) las cuales se encuentran aún unidas mediante puentes disulfuro (Imagen 5).

El papel exacto de la proteína H, G o HN para estimular el cambio conformacional de la proteína F sigue sin entenderse del todo, sin embargo, el panorama general indica un mecanismo biológico de regulación complejo.

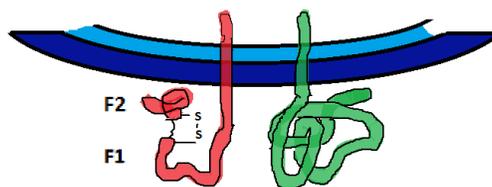


Imagen 5, Representación esquemática la proteína F con sus dos sub unidades F1 y F2.

Proteína de Unión

Proteína G

La proteína G, es una glicoproteína transmembranal tipo II, es la responsable de la unión del virus con el receptor de la célula diana y es sintetizada en dos formas, como la tipo transmembranal tipo II (hidrofóbica) y la forma soluble.^{xviii}.

La proteína **G** se une principalmente a través de heparan sulfato (proteoglicanos) en la superficie apical de las células epiteliales, también tiene un motivo CX3C similar a quimioquinas de fractalquina, situado en el aminoácido 182 al 186, este puede unirse al receptor de fractalquina CX3CR1, el cual está presente en la membrana de la célula diana, CX3CR1 se expresa en diferentes tipos celulares, incluyendo células del epitelio, músculo liso y diferentes células del sistema inmune (monocitos, células dendríticas, NK y células T)^{xix}.

Para los respirovirus y rubulavirus, la proteína de unión (H o HN) reconoce receptores que contienen ácido siálico, y estas pueden ser glicoproteínas o glicolípidos.

Para el caso de los Pneumovirus el receptor celular aún no está definido, sin embargo existen interacciones con glicosaminoglicano ubicado en parte de la matriz extracelular heparin -sulfato (HS).^{xx}

Proteína HN

Para el caso del virus de hPIV-2 (Rubulavirus) la proteína de unión es la proteína HN (hemaglutinina-neuraminidasa) la cual tiene actividad de Hemaglutinina y de Neuroaminidasa,

La proteína HN tiene dos funciones, la primera de ellas realiza la función de unión a los receptores y la segunda actúa como neuroaminidasa (rompe la unión entre la hemaglutinina y el ácido siálico, ambas funciones controladas por el mismo sitio de unión catalítica). En la fase temprana de la infección, la proteína HN se une a receptores que contienen ácido siálico en la superficie de la célula diana. La proteína HN interactúa con la glucoproteína F la cual experimenta una serie de cambios conformacionales que causan la fusión de las membranas. En la fase tardía de la infección, la proteína HN se asocia a las partículas víricas para prevenir la autoagregación del virus y, por lo tanto, promueve su propagación.^{xxi}

El mecanismo mediante el cual HN interactúa y regula el cambio conformacional de la proteína F aún no está claro, sin embargo no es un requisito para la fusión. El papel exacto de la interacción de la proteína HN con la proteína F es hacer la fusión más eficiente.^{xxii}

Proteína Pequeña SH.

Algunos rubulaviruses y todos los pneumovirus codifican una tercera proteína integral de membrana SH^{XXIII}. Esta se encuentra implicada en la unión del virus a las células diana. Es la tercera proteína de la envoltura viral, si bien es cierto que aún se desconoce el papel principal de esta proteína, se le ha asociado fuertemente a la regulación de la apoptosis celular y como un inmunomodulador^{XXIV}, además de que la proteína SH inhibe el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)^{XXV}.

Proteína de Nucleocápside N

La proteína N llamada la proteína de la Nucleocápside, forma parte del complejo ribonucleico, (el cual es una asociación de proteínas y ácido ribonucleico).

Una nucleoproteína es una proteína que está estructuralmente asociada junto con P y L con el RNA genómico del virus, formando el complejo de la polimerasa, esta asociación le confiere al RNA protección ante la acción de RNAsas celulares durante el ciclo replicativo del virus.

Fosfoproteína P

Asociada también al complejo de la polimerasa se encuentra la proteína P la cual es una Fosfoproteína ya que se encuentra altamente fosforilada, e interviene en la síntesis del RNA viral, forma complejos proteicos con las proteínas N y L. La proteína P es un componente esencial de la RNA polimerasa viral con múltiples funciones en la transcripción de RNAm y replicación del genoma.

Proteína L

Proteína L es una RNA polimerasa dependiente de RNA que transcribe y replica el genoma viral. La subunidad grande de la polimerasa L tiene múltiples actividades enzimáticas, la cual tiene la capacidad de sintetizar RNA añadir y metilar el cap en cada uno de los mRNAs virales. Las polimerasas conocidas sintetizan ácido nucleico en la dirección 5' \rightarrow 3'. Usan dos mecanismos de iniciación; mecanismo dependiente del cebador o mecanismo de novo.

Iniciación dependiente de cebador. Los cebadores pueden ser un oligonucleótido, una hebra del ARNm del huésped, una proteína terminal o el extremo 3' de la hebra de plantilla plegada. Las polimerasas también pueden iniciar la síntesis de ácidos nucleicos sin la necesidad de un cebador. La iniciación de novo requiere dos NTP, es decir, el NTP de iniciación en el sitio de inicio y el NTP entrante en el sitio de inicio + 1. La iniciación NTP proporciona un grupo 3'-hidroxilo para la adición del siguiente nucleótido y por lo tanto funciona de forma similar al 3'-hidroxilo de un término de cebador en un mecanismo dependiente de cebador.

Elongación

Una vez que se forma un complejo estable de polimerasa-ácido nucleico, la polimerasa agrega consecutivamente muchos nucleótidos sin disociación de la plantilla. La alta procesividad requiere una asociación estable de plantilla y cebador en la polimerasa que evita la disociación pero que también debe ser inespecífica y lo suficientemente débil como para facilitar el movimiento sobre cada etapa de reacción de transferencia de nucleótidos.

Terminación

Se entiende poco cómo las polimerasas virales terminan la síntesis de ácido nucleico, las secuencias de terminación están aún poco caracterizadas, pero se ha visto que provocan dos efectos; Detención o pausa en el avance de la polimerasa al pasar por ellas y desestabilización del híbrido.^{xxvi}

Proteína de Matriz M

La proteína M interviene directamente en la morfogénesis de las partículas virales, es la proteína más abundante del virión, posee de 341 a 375 aa. Es una proteína básica e hidrofóbica. La asociación entre ellas y su contacto con la nucleocápside ayuda en la formación de la partícula viral. esta se encuentra localizada en la cara interna de la envoltura viral, donde se une a sitios específicos subyacentes de las células infectadas, induciendo los componentes virales tales como las glicoproteínas y los complejos ribonucleicos virales (vRNPs) para colocarse en ellos y brotar de la célula infectada. La proteína M interactúa con la producción de partículas virales infecciosas^{xxvii}.

1.2.3- Proteínas Virales semejantes entre hRSV, hMPV

Proteína M2

El Gen que codifica para M2 contiene dos marcos de lectura que codifican para dos proteínas diferentes; M2-1 y M2-2. Los primeros 9 genes en el caso de hRSV se encuentran separados uno del otro mediante secuencias no conservadas; sin embargo, los genes M2 y L se sobreponen por 68 nucleótidos, lo cual coloca la secuencia GS (gen start) del gen L dentro del gen M2. Por último, una secuencia señal adicional que actúa en cis localizada en el extremo 3' del genoma cumple funciones importantes para los eventos de transcripción y de replicación viral.

Proteína M2-1

La proteína viral M2-1 es un factor de antiterminación de la transcripción, la cual logra un punto importante en la aptitud de las partículas virales, promueve la transcripción y en consecuencia induce la progresión de lectura de la polimerasa a lo largo del genoma accediendo a genes distantes del promotor. M2-1 es un factor de procesamiento de la transcripción tetramérica, el cual se une de manera competitiva al RNA y a la proteína P mediante de su dominio central. M2-1 entonces adquiere la función de un anti-terminador de la transcripción, la cual puede deberse a una terminación prematura de la transcripción intragenéticamente e intergenéticamente. M2-1 por lo tanto se une preferentemente a las secuencias GE (gen end) del extremo del gen viral y a su vez a poli-A positivas, los mecanismos exactos por los cuales M2-1 mejora la eficiencia de la transcripción no se entienden completamente.^{xxviii}

Al igual que todos los pneumovirus, hMPV codifica la proteína M2-1, que desempeña importantes funciones reguladoras en la síntesis de RNA^{xxix}

Proteína M2-2

La proteína M2-2 se encuentra en estrecha relación con la proteína M2-1, ya que interviene modificando la función operacional del complejo de transcripción a un modo de replicación, ayudando a mantener un balance entre la transcripción (RNA+) y la replicación (RNA-).

1.2.2.1.- Proteína V

El virus hPIV-2 presenta una proteína adicional no estructural V, (Tabla 1) esta proteína parece tener varias funciones. Una de ellas se presenta cuando se une con la proteína N donde juega un papel en la regulación de la replicación viral. Sin embargo, la distribución de la proteína V (en núcleo y citoplasma) parece no ser igual a la que tiene la proteína N o P (en gránulos citoplásmicos) en las células infectadas por el virus. Trabajos recientes sugieren que la desaceleración del ciclo celular podría ser una manera en que la proteína V favorece la replicación viral.^{XXX}

Tabla 1, Relación de genes y proteínas codificadas según su presencia en hRSV, hMPV o hPIV-2.

Gen/Proteína	Presencia de Gen / Proteína en el virus.			Función
	hRSV	hMPV	hPIV-2	
NS-1	*			Participan como antagonistas en la inhibición de interferón (INF- α/β)
NS-2	*			
N	*	*	*	Proteína de la Nucleocápside, se une al RNA (genómico y anti genómico) provee protección ante la actividad de RNAsas.
P	*	*	*	Fosfoproteína, altamente fosforilada, se une con la proteína L para formar el complejo de polimerasa, interviene en la síntesis de RNA
L	*	*	*	Proteína de mayor presencia en el complejo de polimerasa, siendo dependiente de RNA
M	*	*	*	Proteína de Matriz, se encuentra en la cara interna de la envoltura del virión con gran importancia en la morfogénesis del mismo.
SH	*	*	*	Proteína pequeña hidrofóbica, glicoproteína transmembranal, participa en la inhibición de la apoptosis.
G	*	*		Proteína de unión, glicoproteína transmembranal tipo II, reconocimiento y anclaje a la célula diana.
F	*	*	*	Proteína de Fusión, glicoproteína transmembranal tipo I, regula la fusión en la penetración a la célula diana
M2-1	*	*		Proteína asociada a la nucleocápside, promueve la progresión de la transcripción viral.
M2-2	*	*		Factor regulador de la transcripción y replicación del RNA
V			*	Proteína accesoria no estructural, La proteína V de hPIV-2 presenta acción antagonista de interferón de tipo I mediante la desestabilización de la señal de la transcripción y activación de transcripción 2.
HN			*	Proteína de Unión, integral de tipo II, con acción de Hemaglutinina y Neuraminidasa, responsable de la absorción del virus y liberación del virus a la célula, presente en la familia de los <i>Robulavirus</i> . ^{XXXI}

1.2.2.2 Receptores Celulares.

Los receptores celulares constituyen un grupo de proteínas o glicoproteínas de superficie que permiten la interacción de la célula con el medio ambiente. Están presentes en la membrana plasmática, en membranas de organelos, citosol o núcleo celular. La unión de las proteínas virales con sus receptores específicos (Tabla 2) desencadena una serie de reacciones en el interior de la célula, lo que se traduce en cambios conformacionales del receptor, cuyo resultado final depende no sólo del estímulo efectuado, sino de muchos otros factores, como estadio celular, patógenos, estado metabólico, etc.

Tabla 2, Relación entre las proteínas virales y su receptor celular

Receptores celulares		
Virus	Proteína	Receptor
hRSV	F	Nucleolina (correceptores ICAM-1 y RhoA)
hMPV		$\alpha\beta 1$ integrina
hRSV	G	glicosaminoglicanos
hMPV		$\alpha\beta 1$ integrina,
hPIV-2	HN	Ácido Sialico

1.2.4- Ciclo Replicativo.

A continuación, se describen 5 puntos que conforman el ciclo de replicación de estos virus; Unión, Fusión, Transcripción, Replicación y Salida. (Imagen 6).

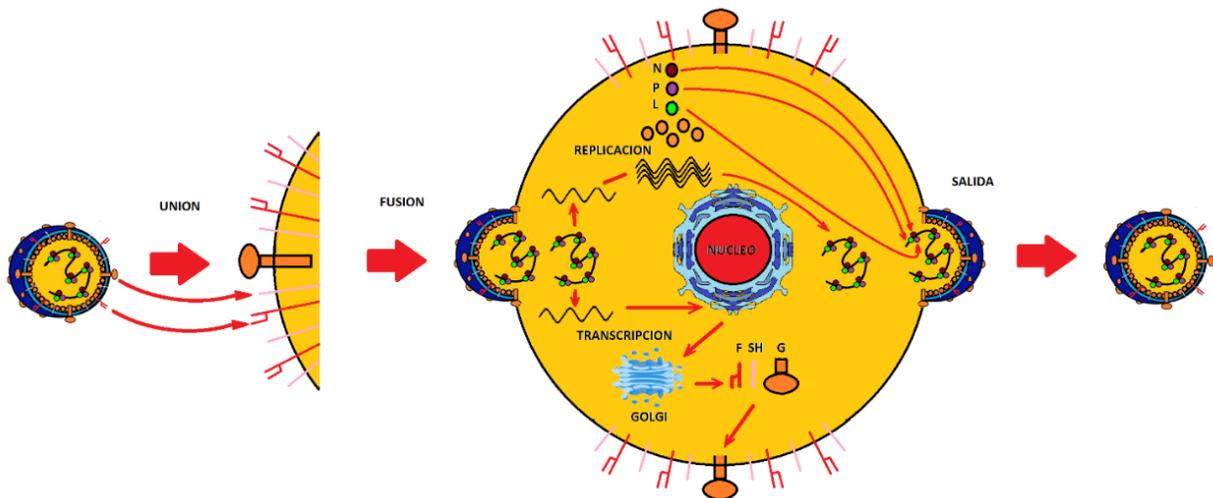


Imagen 6, Ciclo general de replicación de la familia paramixoviridae.

1.2.4.1- Unión y Fusión.

Para infectar a la célula diana o blanco (células del epitelio de las vías respiratorias) estos virus requieren estar en estrecho contacto con ella, es mediante este íntimo contacto donde las proteínas de superficie de los virus reconocen y detectan los receptores de la célula diana para unirse y dar paso a la fusión de las membranas mediada por correceptores de superficie.

Las proteínas de superficie **F** y **G**, son la clave para el mecanismo de infección de estos virus ya que se encuentran implicados en la unión del virus y entrada a la célula. Ambas proteínas se unen a la superficie de la célula mediante dominios de unión a heparina que interactúan con glicosaminoglicanos (GAGs), en particular los proteoglicanos de heparina sulfato (HSPGs) La proteína **F** inicia la fusión virus-célula ya que para hRSV la proteína **G** facilita la infección, y su presencia aumenta la infectividad del virus. La unión a la superficie celular parece ser más eficiente a través de la proteína **G**, posiblemente debido a que la proteína **G** tiene mayor afinidad por GAGs. Aunque la falta de la proteína **G** disminuye la infectividad del virus (se denomina infectividad en epidemiología a la capacidad de un agente patógeno para invadir un organismo y provocar infección), se ha observado que esta proteína no es fundamental para que la partícula viral pueda internalizarse por medio de la proteína **F**.

En el caso de Metapneumovirus humano (hMPV) la entrada de hMPV es inusual entre los paramixovirus, ya que la fusión se lleva a cabo exclusivamente mediante la proteína de fusión **F** sin la participación de la glicoproteína de unión **G**. Se ha sugerido que la proteína **F** de hMPV utiliza $\alpha\beta 1$ integrina como un receptor celular. La proteína **F** de hMPV posee un motivo de unión a integrina. El papel de este motivo en la entrada viral, infectividad, y la patogenia es poco conocida. Se ha demostrado que $\alpha\beta 1$ y αv integrinas son esenciales para la fusión célula-célula y la infección por hMPV^{xxxii}

En el caso de hPIV-2 la proteína de unión es la proteína **HN** la cual tiene función equivalente a la proteína **G**. La primera etapa en la infección por hPIV-2, es la interacción del virus con la superficie celular (células epiteliales respiratorias) a través de la relación entre las moléculas de unión a receptores virales y los receptores que contienen ácido siálico.^{xxxiii}

La proteína **F** es una glicoproteína transmembranal tipo I, responsable de la formación de sincitios, logrando fusionar la membrana viral con la de la célula diana, un factor crítico en la infección y patogenia de esta familia de virus, por medio de este mecanismo el virus puede diseminarse de célula a célula, evadiendo la respuesta inmune. En el caso de hMPV se sabe que la fusión célula-célula está mediada por la proteína **C** activada, la cual es la causa de la formación de sincitios, sin embargo la razón exacta por la que algunas cepas de hMPV inducen sincitios y

otras no, aún no está del todo claro. Algunas cepas hMPV dependen pH ácido para la fusión de la membrana in vitro. Varios estudios han tratado de dilucidar el tipo de aminoácidos que podrían ser responsables de esta dependencia de pH^{xxxiv}.

Para el caso de hPIV-2 es importante para la internalización del virus a la célula mediante la interacción de la proteína F como de la proteína HN.^{xxxv}

La internalización del virus a la célula diana, está relacionada con los cambios conformacionales que sufre la proteína F y la adhesión de la proteína G para que el virus pueda fusionar la envoltura viral con la membrana de la célula diana, y así poder introducir el material genético del virus para dar comienzo a la transcripción y la replicación.

1.2.4.2- Transcripción

Una vez que el material genético del virus se encuentra en el citoplasma de la célula infectada, el RNA genómico del virus (RNA_v) es empaquetado por la nucleoproteína viral N en todo momento, formando un complejo N-RNA, denominado nucleocápside. El inicio y regulación de la transcripción de la familia de los paramixovirus, da comienzo con un homotetrámero de la proteína P y una sola proteína L (RNAP dependiente de RNA viral) el cual transcribe el genoma N-encapsidado de RNA (N-RNA) a mRNA en dirección 5´- 3´ con CAP (nucleótido modificado de guanina) en el extremo 5´ y una cola de poli-A (secuencia larga de poliadenilato) en el extremo 3´. Este complejo ribonucleoproteico se utiliza como templado para la transcripción de RNAm y la replicación del RNA genómico o antígenómico por la RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRp), la cual se encuentra conformada por 2 proteínas virales principales. Una de estas proteínas es la fosfoproteína P y otra es la polimerasa L. Junto con la proteína N, estas tres proteínas forman el complejo ribonucleico, donde la fosfoproteína funge como un cofactor esencial para la polimerasa L, al unirse a L y N y dirigir a la polimerasa L. Se requieren dos cofactores esenciales para que el RdRp produzca RNA de manera eficiente durante todo el ciclo viral, estos factores son M2-1 y M2-2. Después de la traducción de las glicoproteínas de la envoltura (F, G y SH) estas sufren modificaciones posttraduccionales en el aparato de Golgi, para después dirigirse a la membrana citoplasmática de la célula hospedera.

1.2.4.3- Replicación y salida.

La fusión de las membranas da cabida a la internalización de la nucleocápside 3 proteínas virales; **N**, **P** y **L** (en el caso de hRSV y hMPV también se encuentra asociada la proteína **M2-1**), estas forman el complejo de la polimerasa necesario para la replicación y transcripción viral, además de conferir protección al RNA viral ante la acción de RNAsas.

En el caso de los virus con RNA de polaridad negativa, el RNA no actúa como mRNA si no que el virus al ser internalizado en la célula hospedera sintetiza RNA de polaridad positiva que sirve de templado para la síntesis de RNA de polaridad negativa, el cual constituye el RNA genómico del virus, además el RNA de polaridad positiva actúa como mRNA para la síntesis de las proteínas virales.

El complejo de polimerasa comienza la síntesis de RNA desde el extremo 3' del genoma y transcribe los genes en RNAs en secuencia mediante el término y reinicio en cada una de las uniones de los genes.^{XXXVI}

Dado que la proteína M se encuentra localizada en la cara interna de la membrana celular, es en este punto donde se lleva a cabo el proceso final de ensamblaje, cuando la proteína M interactúa con las proteínas de la nucleocápside, y posteriormente da origen a la gemación de la partícula viral. Es importante señalar que durante este proceso se están produciendo nuevas proteínas N, P y L durante todo el proceso de la transcripción, estas proteínas se incorporan a las partículas virales de novo en el procedimiento de la salida del virus.

1.1.3- Patogénesis de la infección por hRSV, hMPV y hPIV-2.

En los primeros años de vida, los pacientes pediátricos presentan por lo menos alguna vez una infección o coinfección por alguno de estos tres virus (hRSV, hMPV y hPIV-2) Las infecciones de las vías respiratorias inferiores por hRSV se deben, en parte, a las señales producidas por las células del epitelio de las vías respiratorias inferiores que modifican la respuesta inmune y provocan el rediseño de las vías respiratorias.^{XXXVII} La investigación sobre la patogénesis de la infección provocada por hMPV está restringida a modelos animales, la información sobre la replicación del hMPV y las respuestas inflamatorias e inmunes en la enfermedad humana es limitada, sin embargo la infección por hMPV está implicada en las exacerbaciones de asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)^{XXXVIII}

Sin embargo, no todas las infecciones o coinfecciones conllevan a complicaciones como la bronquiolitis^{XXXIX}, el estado inmunológico así como ciertos padecimientos como cardiopatías complican el curso de la enfermedad.

1.1.3.1.- Coinfecciones Virales.

Las infecciones respiratorias son la principal causa de mortalidad en el mundo^{XL}, se ha descubierto en un hospedero múltiples infecciones por virus respiratorios como el hRSV, hMPV y hPIV-2 además, del virus de la influenza (VVI), el virus de la gripe (IBV), el coronavirus (CoV), adenovirus (AdV), y Bocavirus humano (hBoV). A pesar de que la infección vírica simultánea produce un fenómeno denominado interferencia viral en el que un virus bloquea el crecimiento de otros virus, la observación de infecciones respiratorias simultáneas en pacientes es algo sorprendente y necesita explicación. Los niños preescolares son las víctimas frecuentemente afectadas por las infecciones simultáneas por virus. Varias investigaciones concluyeron que las coinfecciones víricas no son mayores que las infecciones por virus únicos ni menos graves, por el contrario, algunos estudios tienen evidencia de que una enfermedad grave es resultado de Coinfecciones virales.^{XLI}

La coinfección por hRSV con cualquier virus respiratorio no se asocia con una enfermedad más severa en comparación con una infección por hRSV solo.^{XLII}

Estudios han demostrado que la infección simultánea del tracto respiratorio con al menos dos virus es común en pacientes hospitalizados, aunque no está claro si estas infecciones son más o menos graves que las infecciones por un solo virus. Durante las coinfecciones, un virus puede bloquear a otro simplemente por ser el primero o único para infectar las células del huésped disponibles.^{XLIII}

Los datos clínicos disponibles sobre las coinfecciones son contradictorios en cuanto al número de virus involucrados y la gravedad de la enfermedad, así como al número de coinfecciones virales, de las coinfecciones mencionadas se relacionaron con el virus de la influenza A (H3N2) asociado con los siguientes virus respiratorios únicos o combinados: influenza B en un caso, hCoV229 en dos casos, hCoV229, hRSV A y hPIV-2 en un caso, Y hPIV-1, hPIV-2, hRSV A, hRSV B y adenovirus en un caso^{XLIV}, lo que indica de una gran variedad de combinaciones en tanto a las coinfecciones virales.

hRSV

Los niños de 0-5 años, así como los individuos inmunocomprometidos son grupos de riesgo ante la infección por hRSV la cual puede conducir a complicaciones más severas que lleve al individuo a la muerte, los síntomas se desarrollan principalmente como resultado de la respuesta inmune del huésped ante la infección por hRSV, debido a que la infección por hRSV resulta en una incapacidad para establecer una inmunidad adaptativa perdurable, esto limita el desarrollo de una vacuna eficaz ante la infección. Una vez adherido al epitelio de las células de la vía respiratoria, hRSV comienza a interactuar con diversos componentes del sistema inmune innato del huésped, los cuales son cruciales para determinar el resultado de la enfermedad, si la infección procede hasta células epiteliales alveolares, puede

provocar en consecuencia una cascada de señalización repercutiendo en el reclutamiento y activación de leucocitos. La depuración del hRSV es mediada por los leucocitos innatos, macrófagos, células asesinas naturales, eosinófilos, células dendríticas y neutrófilos todo esto se encuentra liderado por citoquinas, quimiocinas entre otros mediadores inmunológicos. A pesar de que el sistema inmune innato contribuye en la eliminación de la infección producida por hRSV, esta participa en la progresión de la enfermedad ocasionando trastornos como la bronquiolitis y el asma.^{XLV}

La respuesta inmunitaria que produce la infección por hRSV es uno de los principales factores que contribuye la patogénesis de la enfermedad, particularmente el equilibrio entre dos subconjuntos de la respuesta inmune celular, T helper 17 (Th17) y T reguladora (Treg), estos pueden desempeñar un papel significativo en la patogénesis viral. Las vías de desarrollo de las células Th17 y Treg están íntimamente relacionadas. Durante la infección por hRSV, las funciones de ambos subconjuntos se oponen entre sí con respecto a la eliminación viral. Th17 y Treg ofrecen una nueva visión prometedora sobre la patogénesis de una infección por hRSV.^{XLVI}

hMPV

El metapneumovirus humano es una de las principales causas de infección aguda de las vías respiratorias inferiores, en infantes, ancianos y personas inmunocomprometidas las cuales presentan el mayor riesgo de complicaciones graves por la infección viral. No existen por ahora terapias o vacunas con licencia para combatir o prevenir la infección por hMPV. Las reinfecciones constantes que ocurren a lo largo de la vida, son en gran medida consecuencia de los mecanismos mediante los cuales el virus logra evadir la respuesta inmune del huésped, sin embargo gran parte de estos mecanismos aún son desconocidos. Se sabe que la proteína M2-2 del hMPV, provoca la evasión del sistema inmune, mediante la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS), sin embargo los mecanismos moleculares en dicha inhibición aún se desconocen, la fosfoproteína de hMPV-B ha demostrado ser un antagonista de IFN^{XLVII}

hPIV-2

En conjunto los virus del género de parainfluenza 1-3 representan el 18% de las hospitalizaciones pediátricas por enfermedad aguda del tracto respiratorio causando un espectro de enfermedades que van desde la enfermedad leve del tracto respiratorio superior, complicándose como enfermedad grave del tracto respiratorio inferior (crup, bronquiolitis y neumonía). En pacientes transplantados y otros pacientes inmunocomprometidos de cualquier edad, el hPIV-2 puede causar altas tasas de mortalidad. Actualmente, no existen terapias antivirales o vacunas eficaces para prevenir la enfermedad por hPIV-2, aunque varias vacunas de

investigación están en desarrollo. Además de que puede estar implicada en la inhibición de la respuesta del interferón mediante la inducción de la degradación de STAT1 y / o STAT2.^{XLVIII}

1.1.4.1- Respuesta inmunológica innata

El sistema inmune innato consta de una respuesta inespecífica e inmediata contra agentes infecciosos, esto quiere decir que actúa de manera general frente a ellos, se encuentran asociados factores solubles como las lisozimas y el complemento, mediado por células como los polimorfonucleares, macrófagos y células NK (Natural Killer), así como receptores tipo Toll (o Toll-like receptor TLRs). El RNA viral presente dentro de las células infectadas es reconocido como extraño por diversos receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). La activación de cualquiera de los tipos de PRRs señala tanto la síntesis de IFN- α / β como la posterior señalización de IFN- α / β a través de su receptor. Los IFN son secretados por la mayoría de las células y actúan de una manera autocrina o parácrina, capaces de interferir en la replicación de los virus en las células hospedadoras.

En una infección viral, se estimula la inducción de interferón de tipo I (INF), es por ello importante para los virus que en su ciclo replicativo utilicen la evasión de IFN.^{XLIX}

Los receptores de reconocimiento de patrones más comunes activados por infecciones virales son los receptores de tipo Toll (Toll-like receptor TLRs) y las helicasas, las cuales inician una cascada de señalización desencadenando la expresión de citocinas pro-inflamatorias.

Existen tres RLRs (Receptor Like RIG-I, abreviados, son un tipo de receptores de reconocimiento de patrones intracelulares involucrados en el reconocimiento de virus por medio del sistema inmune innato) principales que actúan como sensores de la replicación viral dentro del citoplasma de las células humanas, estos son; RIG-I, MDA5 y LGP2. Los RLRs detectan la replicación de los virus producidos por la formación de su genoma. RIG-I y MDA-5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5), poseen la capacidad de inducir la respuesta celular a través de los dominios CARD (Caspase recruitment domains, or Caspase activation and recruitment domains), en el reconocimiento de RNA viral.^L

La proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS), una molécula de señalización antiviral, la cual une a RIG-I y MDA-5 para la activación de IRF3 y NF κ -B, las cuales conducen a la activación y la producción de IFN de tipo I.^{LI}

1.1.4.2- Respuesta inmune adaptativa

El sistema inmune adaptativo consta de una respuesta específica contra agentes infecciosos, actuando de manera selectiva frente a ellos, existiendo una mejora en la detección y eliminación del agente etiológico a través de las diferentes reinfecciones, así como una memoria celular, asociado a esta respuesta se

encuentran factores solubles que son los anticuerpos (respuesta humoral), el cual se encuentra mediado por células como la familia de los linfocitos Th (respuesta celular).

A) Respuesta Humoral

Se le llama respuesta humoral a los mecanismos de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus diferentes proteínas, en la cual los componentes del sistema inmune atacan a los diversos antígenos de superficie de los patógenos con el fin de disminuir su cantidad e inhabilitándolos, son macromoléculas, como anticuerpos y proteínas secretadas por células plasmáticas.

A mayor edad los individuos se encuentran en mayor contacto con diferentes patógenos, teniendo como primera defensa contra las infecciones virales las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM, las cuales en primera instancia son proporcionadas por la leche materna, sin embargo estos diversos contactos, enriquecen de manera substancial el sistema inmune del paciente joven, aumentando la abundancia de anticuerpos y células plasmáticas siendo importantes ante las infecciones provocadas por estos virus, sin embargo es necesario un estrecho equilibrio entre estas respuestas para brindar una protección eficaz y duradera. Ya que ante la primo-infección viral la respuesta de anticuerpos es ineficiente y dirigida principalmente contra las proteínas de superficie F, G y HN.

B) Respuesta Celular

Asociado a la acción de los anticuerpos sobre los antígenos, existe otro proceso de defensa, conocido como inmunidad celular o inmunidad mediada por células, la cual no produce anticuerpos. Este proceso resulta muy eficaz con gran relevancia en combatir células infectadas por virus siendo la respuesta celular esencial en la lucha contra las infecciones virales.

La producción de IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, proteína inflamatoria de macrófagos-1 α y RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted), produce una infiltración de células inflamatorias, predominantemente en neutrófilos macrófagos, linfocitos, basófilos y eosinófilos.^{LII}

En la fase precoz de la infección (primo-infección), la actividad lítica de las células NK reincide en la capacidad de lisar células infectadas por virus directamente o mediante el mecanismo ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) así como la activación del complemento, donde los virus, estimulan las respuestas de linfocitos T y B.

Los linfocitos T cooperadores (T helper cells), también llamaos Th, son un subgrupo de linfocitos que juegan un papel importante en la activación y diferenciación de otras células inmunitarias, los linfocitos Th maduros expresan en la superficie una proteína llamada CD4 y son llamados linfocitos T CD4+ (reconocen péptidos virales mediante el complejo mayor de histocompatibilidad MHC clase II en células presentadoras de antígeno donde ejercen su función cooperadora con ayuda de la

respuesta de linfocitos B y T CD8+). La liberación de diversas proteínas que actúan como hormonas denominadas citocinas y según el tipo de esta, el linfocito T cooperador se clasifica en TH1 y TH2.

- TH1 secretan Interleucina 2 (IL-2) e interferón- γ (IFN γ) las cuales activan principalmente a los macrófagos y células T citolíticas (NK).
- TH2 secretan IL-4, IL-5 e IL-10 las cuales activan a linfocitos B, inducen la síntesis de anticuerpos y activan eosinófilos.

Los Linfocitos T citotóxicos (CTL, Cytolytic T Lymphocyte) neutralizan células infectadas por virus o microorganismos intracelulares, inyectando enzimas tóxicas que provocan la muerte de la célula infectada. Se les llama CD8+, por la presencia del receptor de membrana CD8. La respuesta celular citotóxica es más efectiva ya que los linfocitos T CD8+ activados, al reconocer péptidos antigénicos de origen viral mediante el complejo mayor de histocompatibilidad MHC clase I en células infectadas por virus.^{LIII}

El hRSV, al igual que otros miembros de la familia Paramyxoviridae, como el virus hMPV y hPIV-2, pueden perturbar la respuesta inmune innata mediante la modulación de la vía de señalización del interferón tipo I (IFN). Se cree que la señalización de IFN de tipo I, que se inicia a través de la activación del receptor IFN- α (IFNAR), que es parte integral de la respuesta inmune temprana mediante la inducción de moléculas antivirales^{LIV}.

hMPV

La gran mayoría de los individuos han sido expuestos a hMPV a la edad de 5 años y la infección con este virus da en consecuencia la producción de un anticuerpo neutralizante en la mayor cantidad de individuos sanos, sin embargo, los títulos del anticuerpo presente en personas previamente infectadas no son suficientes para prevenir la reinfección.^{LV} Esto indica que la inmunidad humoral por sí sola no es suficiente para la protección frente a la infección con hMPV. El mecanismo por el cual hMPV evade el sistema inmune adaptativo todavía es aún desconocido, sin embargo existe evidencia reciente que sugiere el deterioro de la respuesta de células pulmonares TCD8 + posterior a la infección por hMPV resultado la señalización a través del receptor inhibidor programado de muerte 1 (PD-1). Se ha demostrado que PD-1, junto con otros receptores inhibidores, está altamente regulada tanto en infecciones virales agudas como crónicas.^{LVI}

Se ha identificado a la proteína M2-2 de hMPV como un importante supresor inmune en las células epiteliales de las vías respiratorias humanas. M2-2 no sólo interactúa directamente con los factores de señalización antiviral innata, sino también indirectamente suprime las respuestas anti-hMPV por la inhibición de la expresión de otros factores de virulencia de hMPV.^{LVII}

hPIV-2

La defensa del huésped contra el hPIV-2 está mediada por la inmunidad humoral y celular. Los anticuerpos contra las dos glicoproteínas superficiales, F y HN, son neutralizantes y los anticuerpos contra cualquiera de las proteínas confieren protección contra el desafío del virus. La inmunoglobulina IgA se desarrolla después de una infección natural y se ha demostrado que neutraliza el virus y mejora el estado del paciente, contribuyendo a la mejora del cuadro clínico.^{LVIII}

La proteína V se expresa a partir del gen P/V mRNA, tiene dos funciones fundamentales, la primera es para inhibir la producción de interferón de tipo I y la segunda es para bloquear la señalización de IFN por la orientación STAT2 para la degradación proteasomal.^{LIX}

La proteína V, contrarresta la respuesta de IFN en dos etapas, en primer lugar limita la inducción de la biosíntesis de IFN por RNA viral a través de una interacción con la RNA helicasa MDA5 y segundo, bloqueando la señalización de IFN, acoplado las proteínas STAT1 y STAT2. Por lo tanto, la hipótesis de que la mutación de la proteína V del virus hPIV-2 podría ser utilizado para generar una vacuna con virus atenuado.

La función esencial de la proteína V parece ser la inhibición de la respuesta antiviral innata, aunque también se cree que V desempeña un papel en la prevención de la apoptosis y la regulación de la síntesis de RNA viral. Esta última función puede estar mediada a través de la unión de la proteína V con las proteínas N y L del virus, así como al RNA.

1.3- Diagnóstico

En nuestro país el diagnóstico se realiza de acuerdo a la guía práctica Clínica “Diagnóstico y Tratamiento de Bronquiolitis Aguda en niñas/niños en el Primer Nivel de Atención” la cual forma parte de las guías que integrarán el Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica, en la cual se instrumenta a través del Programa de Acción Específico, de acuerdo con las estrategias y líneas de acción que considera el Programa Nacional de Salud 2013-2018. En la cual el diagnóstico no considera pruebas para determinar el agente etiológico sino que considera:

1. Factores de riesgo no patológicos (lactancia materna o características de la alimentación, tabaquismo materno o en su entorno, asistencia a guardería) que predisponen a la bronquiolitis.
2. Factores de riesgo (bajo peso al nacimiento, prematuros, cardiopatías congénitas, enfermedad pulmonar crónica del prematuro, hipertensión pulmonar, e inmunodeficiencia) que predisponen a la bronquiolitis.
3. Investiga los datos clínicos de la bronquiolitis (Rinorrea, tos, sibilancias, estertores finos, hiperinsuflación y datos de dificultad respiratoria).

4. Identifica el grado de severidad de la bronquiolitis utilizando la escala recomendada en GPC (Leve, Moderada y Severa).
5. Solicita estudios radiográficos en forma orientada (cuando el diagnóstico no sea claro y se considere otro).

El tratamiento consiste en;

1. Recomendar el uso de oxígeno como parte del tratamiento cuando la saturación de oxígeno por oximetría de pulso es menor al 90%.
2. Prescribe adrenalina o salbutamol como tratamiento Farmacológico evaluando la existencia de atopia (refiere al tipo de mecanismo inmunitario).
3. Prescribir paracetamol en caso de fiebre como parte del manejo ambulatorio.
4. La Ribavirina, no está recomendada en el tratamiento ambulatorio de la bronquiolitis aguda en niños por sus efectos teratogénicos (malformaciones de cráneo, paladar, ojos, maxilar inferior, miembros, esqueleto y tracto GI)

En pacientes de alto riesgo se considera el uso de ribavirina o pacientes en el segundo nivel de atención.^{LX}

1.3.1 Tratamientos

El impacto clínico de las infecciones provocadas por virus respiratorios pertenecientes a la familia Paramyxoviridae es de gran importancia debido a su alta tasa de morbimortalidad y coinfecciones virales, por tal motivo el desarrollo de terapias antivirales con actividad de amplio espectro, para tratar de eliminar no solo a un agente viral sino también las posibles coinfecciones virales.

Actualmente no hay antivirales para el tratamiento de hMPV ni para el caso de hPIV, los que se han descrito son experimentales.

Palivizumab

Para hRSV se dispone de Palivizumab un antiviral para uso profiláctico, sin embargo su alto costo limita el acceso del tratamiento al grueso de la población, además el Palivizumab es utilizado para prevenir infecciones en pacientes pediátricos de alto riesgo (neumonía, bronquiolitis, niños menores de 24 meses de edad con displasia broncopulmonar, antecedentes de nacimiento prematuro o cardiopatías congénitas).

Ribavirina

Como opción antiviral disponible. La ribavirina (Imagen 7) es un análogo de nucleósido sintético que tiene amplias actividades antivirales contra muchos virus de ADN y ARN.

Actualmente, la ribavirina está autorizada para el tratamiento de la infección por hRSV^{LXI} y otros virus de RNA, puesto que es un fármaco que actúa como un análogo de nucleósido^{LXII}, son compuestos con una estructura análoga a la de los ácidos nucleicos del RNA y DNA, actúan interfiriendo con la síntesis de ácidos nucleicos causando mutaciones que hacen virus ineficientes. La Ribavirina (1-beta-D-

ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) es un análogo de guanosina sintético con actividad antiviral. Se utiliza como un agente principal solo para tratar infecciones de virus sincitial respiratorio, sin embargo, no se recomienda para el tratamiento rutinario de la enfermedad, ya que presenta efectos teratógenos^{LXIII}

Para la infección por hPIV-2, se encontró la Ribavirina presenta un efecto inhibidor. La ribavirina inhibe la replicación de hPIV-2, mediante la inhibición de la síntesis de ARN del genoma viral y la inhibición de la transcripción, resultando en la inhibición de la síntesis de proteínas virales^{LXIV}, lo cual ayuda al tratamiento de la infección por hPIV-2, disminuyendo liberación de las partículas virales y contra virus resistentes a la amantadina^{LXV, LXVI}

En el tratamiento de las infecciones con neumonía por hMPV se emplea ribavirina oral e inmunoglobulina IgIV en niños inmunodeficientes.^{LXVII}

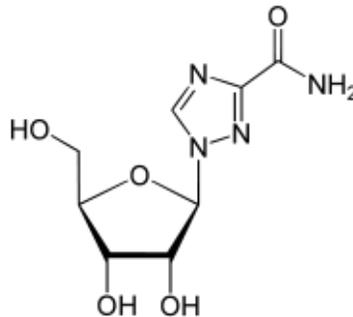


Imagen 7, Molécula de Ribavirina.

Favipiravir

El Favipiravir, también llamado y conocido como T-705 (Imagen 8), es un antiviral experimental contra virus de RNA, derivado de la pirizinaamida el cual ha mostrado acción frente a infecciones provocadas por virus de RNA. Se encuentra actualmente en evaluación clínica. El tratamiento con Favipiravir ha demostrado inhibir la replicación de todos los paramixovirus in vitro, con valores de 8 a 40 M 90% de concentración efectiva (EC90). La observación del tratamiento T-705 tuvo un efecto significativo en los títulos virales infecciosos, con un efecto limitado sobre los títulos de genoma viral, se encuentra de acuerdo con su modo de acción propuesto de mutagénesis viral. Sin embargo se observa una hiper-mutación en los virus estudiados. Los ensayos de actividad de la polimerasa revelaron un efecto específico de T-705 en la actividad de la polimerasa de hMPV. T-705 muestra una amplia actividad antiviral contra una extensa gama de familias de virus RNA, esta pequeña molécula es un candidato a fármaco antiviral de amplio espectro prometedor para limitar o mantener al margen la carga viral de los paramixovirus y para la evaluación del tratamiento de las infecciones virales emergentes.^{LXVIII}

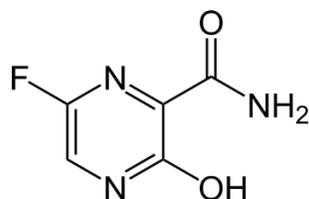


Imagen 8 Molécula de Favipiravir

ALS-8176

ALS-8176 (Imagen 9) es el primero en su clase, siendo un nucleósido profármaco inhibidor de la replicación del hRSV actualmente bajo evaluación clínica. El ALS-8176 es un inhibidor de la polimerasa de hRSV de nucleósido de primera clase para el tratamiento de la infección por el virus sincicial respiratorio humano.^{LXIX}

El ALS-8176 es un inhibidor de la polimerasa de hRSV de nucleósidos de primera clase que El cual ha demostrado una excelente eficacia y seguridad contra el hRSV en un estudio clínico de fase 2. ALS-8176 inhibe la replicación de hRSV in vitro e in vivo.^{LXX LXXI}

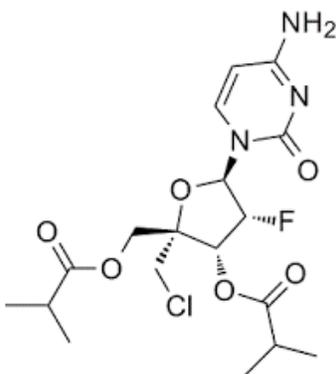


Imagen 9, Molécula de ALS-8176^{LXXII}

1.3.2.- Profilaxis

Medidas Higiénicas.

Considerando que tanto hRSV, hMPV y hPIV-2 son excretados en secreciones respiratorias durante la infección, sobre todo al inicio de ella y que son capaces de mantenerse activos durante 7 horas en superficies y alrededor de 1 a 2 horas en tejidos, el contagio principal es en el ambiente familiar, es importante insistir en el lavado de manos, especialmente durante los periodos en que los contactos de los niños de riesgo alto presentan infecciones respiratorias, temporadas de frío y/o lluvia o cuando los niños tienen hermanos que asisten a la guardería o a la escuela. Es necesario evitar la exposición a personas resfriadas, evitando exposiciones frente a virus o posibles coinfecciones virales. Las medidas preventivas también incluyen evitar exponer al niño al humo del tabaco y a entornos contagiosos (guarderías, aglomeraciones, fiestas infantiles, habitación compartida con un hermano mayor).^{LXXIII}

Palivizumab

El palivizumab es una inmunoglobulina IgG1 kappa que contiene una región de entramado humana que rodean las regiones murinas responsables de la unión al hRSV. Este tipo de anticuerpo monoclonal humanizado tiende a tener poca inmunogenicidad. El Palivizumab, es un anticuerpo monoclonal (anticuerpo idéntico producido por un solo tipo de célula del sistema inmune, IgG monoclonal humanizado que inhibe específicamente el epitope antigénico A de la glicoproteína F, muy estable frente a los diversos serotipos de hRSV^{LXXIV}, es recomendado para pacientes de alto riesgo ya que presenta un costo elevado además de que la dosis recomendada de palivizumab es de 15 mg/kg de peso corporal por mes como medida preventiva. La prevención de la infección por hRSV se fundamenta en medidas higiénicas y en la utilización de palivizumab. El palivizumab reduce las hospitalizaciones por hRSV en pacientes de riesgo. Sin embargo, no ha demostrado reducir la incidencia de la enfermedad, ni la duración de la hospitalización, de la oxigenoterapia o de la ventilación mecánica, ni reducir la mortalidad, tampoco ha demostrado eficacia como tratamiento de la infección por hRSV ya establecida. Se considera la profilaxis con palivizumab en:

- Pacientes menores de 2 años con displasia broncopulmonar, con cardiopatía congénita con alteración hemodinámica significativa, en tratamiento por insuficiencia cardíaca, hipertensión pulmonar moderada o grave o cardiopatías cianógenas. Pacientes nacidos a las 28.6 semanas de gestación o menos o que tengan 12 meses de edad o menos.

En los casos donde se considera adecuada la profilaxis con palivizumab, se administra en dosis única mensual intramuscular a 15 mg/kg. El palivizumab no evita la infección en todos los casos, y no previene contra el resto de infecciones virales relacionadas con la bronquiolitis aguda, por lo que es importante enfatizar en las medidas higiénicas^{LXXV}.

1.3.2.1.- Anticuerpos Cruzados

Un modelo epidemiológico reciente sugiere que la inmunidad cruzada entre el RSV, el HMPV y los parainfluenzavirus humanos puede contribuir a sus brotes periódicos, así como contar con un tratamiento de amplio espectro capaz de atacar diferentes tipos de virus causantes de ciertos padecimientos y coinfecciones virales, y sobre todo las complicaciones que puedan desarrollarse por coinfecciones virales, lo que sugiere que una comprensión más profunda de la inmunidad del huésped a estos virus puede conducir a estrategias mejoradas para su control.^{LXXVI}

1.3.3.- Vacunas.

La comprensión de los mecanismos por los cuales los genes virales y proteínas modulan la respuesta del huésped a la infección es crítica para la identificación de nuevas estrategias de intervención (Tabla 3). Las vacunas vivas atenuadas presentan desafíos de seguridad, y las vacunas de subunidades proteicas inducen principalmente respuestas de anticuerpos. Existen diversas vacunas en desarrollo, pero hasta ahora ninguna posee la seguridad y eficacia necesaria para la distribución de una vacuna. De modo que las opciones para el tratamiento contra el hRSV, hMPV y hPIV-2 son escasas demostrando la necesidad de encontrar nuevos fármacos o tratamientos para combatir las infecciones o coinfecciones .

Tabla 3 Relación de la estrategia en profilaxis y su mecanismo de acción.

Profilaxis	Mecanismo	Ejemplo
Anticuerpos Monoclonales	Anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida, producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral.	Profilaxis enfermedad virus sincitial respiratorio en niños.
Vacuna Recombinante	Las vacunas recombinantes son productos que consisten de un vector, el cual expresa antígenos externos. ^{LXXVII}	una sola dosis de la vacuna GMP rBCG-N-hRSV conserva su capacidad para proteger a ratones frente a un desafío de 1×10^7 unidades formadoras de placa (PFU) de la cepa clínica hRSV A2 13018-8..
Partículas Semejantes a Virus (VLPs)	Estas partículas se asemejan al virus del que derivan pero carecen del ácido nucleico viral, lo que significa que no son infecciosas. Pueden expresar proteínas diferentes a la del virus de origen	Dos dosis de VLPs confieren protección completa de la replicación de hMPV en los pulmones de ratones y sin estar asociados a una respuesta Th2-sesgada (respuesta de las citoquinas). Estos resultados sugieren que las VLP no replicantes son una prometedora vacuna candidata para hMPV. ^{LXXVIII}
Antioxidantes ^{LXXIX}	Diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos.	Bombax malabaricum, muestra actividad antioxidante y antiviral contra hRSV, exhibe potentes efectos anti-RSV, comparables con la ribavirina. ^{LXXX}
Farmacos contra células diana	células diana en donde se lleva a cabo la replicación del virus de modo proporcionar los posibles objetivos farmacológicos para el tratamiento contra estos virus	No probadas aun ^{LXXXI}

1.4- Infecciones Respiratorias Agudas.

Las infecciones respiratorias son la principal causa de enfermedad a nivel mundial en los niños prescolares (Tabla 4), siendo responsables de una cuarta parte de las hospitalizaciones y hasta el 60% de las visitas al médico general. En la mayoría de los casos, las infecciones respiratorias virales son autolimitadas y confinadas a las vías respiratorias superiores, donde producen síntomas leves, por lo general son enfermedades que tienden a autolimitarse, y por ello no se requiere de un

tratamiento específico, suelen durar menos de 15 días. Sin embargo, en individuos susceptibles, como menores de 2 años y mayores de 64 años, así como las mujeres embarazadas y enfermos con padecimientos crónicos o inmunocomprometidos, en los cuales las infecciones por enfermedades respiratorias agudas pueden complicarse llevando al paciente a la hospitalización o incluso la muerte, los síntomas pueden afectar las vías respiratorias inferiores, lo que resulta en sibilancias, dificultad para respirar, bronquiolitis o neumonía.^{LXXXII}

Tabla 4 Cosificación de Edades según la OMS.

Clasificación	Rango de Edad
Infantes	Menores de 1 año
Prescolares	Menores de 5 años.
Escolares	De 5 a 11 años cumplidos.
Adolescentes	12 a 18 años cumplidos.

Los virus que se asocian fuertemente con las IRAs son entre otros; Influenza A y B (Flu) ^{LXXXIII}, adenovirus (AdV) ^{LXXXIV}, virus sincitial respiratorio humano (hRSV), metaneumovirus humano (hMPV), parainfluenza humano hPIV-2, coronavirus humano (hCoV), rinovirus (RV), enterovirus (EV).

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRAs) son en general son un conjunto enfermedades y padecimientos que afectan principalmente la nariz y garganta comprometiendo hasta los pulmones, muestran gran variedad de signos y síntomas, lo que dificulta un diagnóstico oportuno y eficaz frente al agente causal, en su mayoría tienen como agente causal a los virus (aunque pueden ser ocasionadas por bacterias o parásitos) es por ello que el mecanismo por el cual se transmiten, es de persona a persona mediante las gotas de la saliva que son expulsadas al toser o estornudar por las personas infectadas o por el contacto con superficies contaminadas (fómites). ^{LXXXV}

En México las IRAs constituyen un problema importante en cuestión de salud pública, ya que representan la morbimortalidad más alta del país así como mortalidad, no obstante siendo un gran problema de salud pública, en México el diagnóstico de estas enfermedades se realiza mediante la guía de referencia rápida Diagnóstico y Manejo de la infección aguda de vías aéreas superiores en pacientes mayores de 3 meses hasta 18 años de edad, en donde se mencionan los criterios clínicos que deben de considerarse para poder dar un diagnóstico adecuado. La Faringitis de etiología viral se caracteriza por presentar los datos de mayor relevancia médica donde la Tos, Disfonía, congestión nasal, dolor faríngeo que dura más de 5 días y las vesículas en la orofaringe, sin embargo, no existen en el sector salud pruebas de diagnóstico para este tipo de padecimientos ocasionados por virus, lo que dificulta en gran medida el pronóstico de la evolución del paciente. Sumado a esto no existe un tratamiento específico para las IRAs de origen viral. En pacientes menores de 1 año las Infecciones respiratorias agudas son el 7 lugar de

mortalidad con un 33 %, para pacientes de 1 a 4 años de edad las IRAs ocupan el 12 lugar en defunciones según el INEGI en 2015.^{LXXXVI}

1.5- Incidencia

La incidencia es un parámetro que refleja el número de casos nuevos de algún padecimiento en un periodo de tiempo. La incidencia va a contabilizar el número de casos nuevos, de la enfermedad en estudio, que aparecen en cierto período de tiempo previamente determinado;

$$I = \frac{\# \text{ de Eventos Nuevos}}{\text{Total de casos}}, \text{ en cierto periodo de tiempo.}$$

2.1- Justificación

Las enfermedades respiratorias agudas representan una de las principales causas de morbi-mortalidad en pacientes pediátricos, estas pueden ser atendidas desde su etapa inicial actuando en la etapa de profilaxis evitando la incidencia así como la complicaciones de las mismas, ahorrado recursos y esfuerzos del sector salud y social los cuales representan un alto costo. 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, de igual forma, considera que la infección por hRSV, hMPV hPIV-2 de gran importancia médica a nivel mundial por ser considerados dentro de los primeros agentes etiológicos de infecciones respiratorias (se estima que hRSV, es responsable de 64 millones de infecciones y 160,000 muertes al año, de las cuales el 25% son por neumonía y aproximadamente 70% por bronquiolitis, para el caso de hMPV, se estiman 3.2 admisiones hospitalarias por cada 1,000 niños a causa de este virus. Sin embargo estos datos no contemplan las coinfecciones virales). Según la infección o coinfección entre algunos de estos virus, será el grado de gravedad de la enfermedad, sumado a la edad del paciente y del estado del sistema inmune, hacen que una infección por uno, dos o tres de estos virus curse como leve o severa causando cuadros respiratorios desde leves hasta enfermedades respiratorias severas, como bronquiolitis, bronquitis y neumonía. Sin embargo en México no se cuenta con un método de diagnóstico específico ni eficaz que brinde información sobre la infección viral o coinfección,

2.2- Planteamiento del problema

En México, las infecciones respiratorias representan un problema importante de salud pública, ocupan el octavo lugar como causa de muerte en la población en general y el primer lugar en morbilidad en niños de 0 a 5 años de edad, constituyen la segunda causa de mortalidad infantil en niños entre 1 y 4 años de edad y tercera causa en menores de un año. Es importante mencionar que consideramos indispensable fortalecer las redes de vigilancia epidemiológica que contribuyan y permitan establecer la presencia y prevalencia de estos virus así como brindar información sobre los patrones de circulación e impacto de las infecciones respiratorias provocadas por estos tres virus y sus variantes virales.

En México no existen patrones de referencia de circulación de los diferentes subgrupos virales ni por estaciones, aunado a esto, hay que considerar que el diagnóstico no se realiza por pruebas moleculares apropiadas para la detección oportuna de la infección, sino que el diagnóstico diferencial se realiza mediante la guía práctica clínica IMSS-062-08, por consiguiente estos pacientes no reciben un tratamiento eficaz. Es por ello de gran importancia implementar técnicas moleculares para identificación y tipificación del o los agentes virales, para brindar un diagnóstico oportuno y acertado de las infecciones y coinfecciones causadas por estos virus, contribuyendo a visualizar el panorama “real” de la circulación de los diferentes agentes etiológicos y asimismo reforzar las brigadas del sector salud. La caracterización de los patrones de circulación de estos virus y sus variantes virales permite dirigir la aplicación de medidas preventivas específicas, las cuales repercutan directamente en la incidencia, prevalencia y frecuencia de las infecciones respiratorias provocadas por estos virus. En este estudio se implementó una metodología de diagnóstico molecular, con alta especificidad y sensibilidad, la cual permitió el diagnóstico de las infecciones y coinfecciones virales provocadas por hRSV, hMPV y hPIV-2 presentes en cada muestra, las cuales pasan desapercibidas por falta de diagnóstico molecular. La información obtenida servirá a los programas nacionales de vigilancia epidemiológica sobre los virus circulantes estacionalmente en nuestro país y evaluar la aparición de variantes virales que pudieran tener relevancia clínica.

2.3- Objetivos.

2.3.1- Objetivo General.

- Establecer la incidencia de las coinfecciones virales por hRSV, hMPV y hPIV-2 en muestras de pacientes pediátricos con infección respiratoria aguda genotipificados mediante la técnica de RT-PCR punto final.

2.3.2- Objetivos Particulares

- Genotipificar 200 aislados virales provenientes de muestras clínicas de pacientes pediátricos que cursaban con infección respiratoria aguda.
- Determinar la infección o las coinfecciones virales provocadas por hRSV, hMPV y hPIV-2.
- Contribuir al planteamiento de un esquema de patrones de circulación de los diferentes virus así como las coinfecciones virales provocadas por hRSV, hMPV y hPIV-2.

3.1- Metodología.

3.1.1- Selección de pacientes.

El presente estudio se realizó con muestras obtenidas por exudado faríngeo y exudado nasofaríngeo de pacientes pediátricos con infección respiratoria aguda y bajo carta de consentimiento informado, en colaboración con el Hospital Regional Adolfo Lopez Mateos (HRALM), la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de medicina (UASLP) y el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), con las cuales se formó un compendio de 200 muestras clínicas de pacientes pediátricos durante el periodo del 30 de agosto del 2004 al 13 de febrero del 2014 (edades del rango de 28 días de nacidos a 14 años de edad).

3.1.2- Muestras clínicas

Debido a la diversidad de criterios médicos, las muestras clínicas son de diferente naturaleza, quedando agrupadas en 3 conjuntos; Exudado Naso Faringeo (ENASO), Exudado Faringeo (EFAR) y Sobrenadante de la muestra (SOB).

3.1.3.- Propagación de células HEp-2 y VERO

Se utilizó células HEp-2 (ATCC CCL-23) para la propagación de los virus hRSV y hMPV así como células VERO para la propagación del virus hPIV-2. La propagación de las líneas celulares se realizó al alcanzar una confluencia del 80-90% de la superficie de la caja Petri, y se retiró el medio con 3 lavados con 3 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) cada uno, posteriormente se adicionó 750 µL de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) más 150 µL de tripsina durante 10 minutos, luego se agregó 3 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) al 5% v/v de SFB.

3.1.4.- Propagación de cepas virales.

La propagación de las cepas virales de referencia hRSV Long (ATCC® VR-26™) subtipo A, subtipo B (18535), hPIV-2 cepa (ATCC® VR-92™) así como un aislado viral de hMPV, se realizó infectando células confluentes HEp-2 (ATCC® CCL-23™) (células transformadas de epitelio humano, provenientes de un cáncer de laringe, neoplásicas), para los virus hRSV y hMPV, para el caso de hPIV-2 se utilizó células confluentes VERO (ATCC® CCL-81™) aisladas a partir de las células epiteliales del riñón de un mono verde africano (*Chlorocebus sp*). Éstas se propagaron en medio mínimo esencial modificado por Dulbeco (DMEM) el cual se suplemento con 5% v/v de suero fetal bovino (SFB) más glutamina a una concentración final de 2 mM, a la cosecha viral adicionando MgSO₄ a una concentración final de 0.1 M para mantener la infectividad de los virus y se almacenan a una temperatura de -80°C.

3.1.5.- Título viral.

La titulación de la infectividad de los diversos virus se realizó bajo la técnica TCDI₅₀ (por sus siglas en inglés Tissue Culture infectious dose affecting 50% of the cultures).

La técnica de TCDI₅₀ se realizó utilizando células HEp-2 (hRSV y hMPV) y VERO (hPIV-2) confluentes, en placas de 96 pozos, la cosecha viral se diluyó en una relación 1:3 con DMEM sin SFB, se infectaron las células confluentes con las diluciones virales, las diluciones se realizaron en una placa de 96 pozos. En el primer carril se colocó 100 µL del virus y en el resto de la placa se colocó 70 µL de medio MEM sin SFB. Se tomó una alícuota de 35 µL del primer carril y se pasó al segundo carril y así sucesivamente en diluciones seriadas 1:3 hasta el carril 11, dejando el carril 12 como control negativo de células, estas se incubaron a 37°C, 1 ATM y 5% de CO₂, y se observaron diariamente hasta determinar la presencia del efecto citopático en la monocapa de células confluentes (cambios, morfológicos y de viabilidad celular, visibles a microscopía óptica, causados por la infección), posteriormente se fijó la preparación de células con metanol y se incubó durante 10 minutos en agitación, se retiró el metanol y posteriormente se adicionó 100 µL de cristal violeta durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se retiró el cristal violeta y se procedió a observar al microscopio el número de pozos con efecto citopático para calcular el título viral y el porcentaje de infectividad, el Título viral se calcula con ayuda de la fórmula de Kärber.

$$TCDI_{50} = \Delta + [\partial \left(S - \frac{1}{2} \right)]$$

Donde Δ es igual a la última concentración en la cual es posible detectar efecto citopático, S representa los porcentajes de las diluciones en las cuales se detecta efecto citopático (100% a 0%) y ∂ es igual al Log₁₀ del factor de dilución.

El título viral queda expresado como TCDI₅₀/mL.

3.1.6.- Aislamiento viral

Para el aislamiento viral se preparó una caja de 24 pozos con células hasta alcanzar confluencia, se retiró el medio al 5% v/v de SFB, y se lavó cada pozo con 500 µL de PBS tres veces cada uno y se completó con 200µL de medio para infectar (medio DMEM sin SFB), posteriormente se adicionó 150 µL de muestra clínica en el pozo correspondiente, al término de 2 horas se retiró el medio y se adicionó 1.5 mL de medio DMEM sin SFB, se incubó a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂ y se monitoreó día a día hasta observar efecto citopático. Se realizaron tres pases ciegos de las muestras, esto se hace para aumentar la carga viral de las muestras clínicas. Las muestras que presenten contaminación por hongos o bacterias son desechadas.

3.1.6.1.- Controles internos.

Control positivo de hRSV F.

La cepa Long subtipo A humana de hRSV se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC® VR-26™), se diseñó oligonucleótidos específicos para el gen que codifica la proteína F de la región que comprende de 1127-1320 nucleótidos del genoma del virus.

Control positivo de hRSV G (subgrupo A).

De la cepa Long de hRSV (ATCC® VR-26™), se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen que codifica la proteína G de la región que comprende de 275-824 nucleótidos del virus.

Control positivo de hRSV ML (subgrupo B)

Se utilizó la cepa CH-18537, se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen que codifica la proteína ML de la región que comprende de 1127-1320 nucleótidos del virus

Control positivo de hMPV Gen N y L

Para el caso del control positivo de hMPV se consideró un aislado de muestra clínica, a partir de una secuencia consenso se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen que codifica la proteína N en la región que comprende de 148 a 747 nucleótidos del virus. De igual forma se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen que codifica la proteína L de la región que comprende de 8920 a 9367 nucleótidos del virus.

Control positivo de hPIV-2 HN

En el caso del control positivo de hPIV-2, se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC VR-92), de la cual se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen que codifica la proteína HN de la región que comprende 525-826 nucleótidos del genoma del virus.

Control positivo de β - actina.

El control de RT-PCR fue β - actina, la amplificación del gen generó un producto de 205pb, el ARNm para la beta-actina se utilizó como un control interno de la amplificación por RT-PCR, (Tabla 5).

Tabla 5, Relación entre virus y gen amplificado, tamaño del fragmento, región en el genoma y la temperatura de alineamiento.

Genes amplificados y temperatura de alineamiento				
Virus	Gen	Tamaño de Fragmento (pb)	Región	Temperatura de Alineamiento (°C)
hRSV	F	193	1127-1320	56
	G (A)	549	275-824	55
	ML (B)	106	102-204	56
hMPV	L	447	8920-9367	66
	N	599	148-747	60
hPIV-2	HN	279	525-826	68.8
Control	β - actina.	205	1548-1753	60

3.2.1.-Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó mediante la centrifugación de las células infectadas del tercer pase a 2000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se adicionó 1 mL de TRizol (Invitrogen), y se resuspendieron vigorosamente favoreciendo la lisis celular, y se colocaron en un tubo Eppendorf estéril de 1mL, después se adicionó 200 μ L de cloroformo. Posteriormente se agitó en el Vortex (Maxi Mix Plus) para favorecer la extracción y se centrifugó a 10,000 rpm en la centrifugadora 5415-C durante 10 minutos. En seguida de centrifugar, la mezcla se separó en una 3 fases; fase inferior, interfase y fase superior. La fase inferior corresponde a la fase de fenol cloroformo, en la interfase se encuentran las proteínas, DNA y lípidos. En la fase superior incolora, la cual contiene exclusivamente el RNA, ésta corresponde a la fase inorgánica, a la cual se le añadió 500 μ L de isopropanol frío grado molecular y mantuvo a -70°C durante 24 horas.

Al termino de las 24 horas se incubó a 4°C durante 5 minutos y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, luego se descartó el sobrenadante y se lavó el botón formado con etanol al 75% v/v y de nuevo se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos, se dejó secar el botón formado y se añadió 20 μ L de agua DEPC (dietilpirocarbonato) para resuspender el RNA en el agua DEPC.

3.2.2.-Cuantificación de RNA

Para cuantificar el RNA se realizó una dilución 1:200 (5 μ L de RNA suspendido en 995 μ L de agua DEPC) y se leyó en espectro fotómetro (JENGAY 7305 Spectrophotometer) a una longitud de onda de 260 nm, se utilizó la siguiente ecuación para determinar la cantidad de RNA presente en la muestra.

Ejemplo de cálculo:

La Absorbancia de la muestra 501 es de 0.151

$$0.151 \times 200 \times 40 \times 0.02 = 24.16 \mu\text{g}$$

Donde 200 es la dilución que se hace del RNA, 0.02 corresponde al valor de la dilución inicial del botón de RNA en mililitros (20 μL equivale a 0.02 mL). Y donde 40 es la densidad óptica, según el Maniatis, una solución de RNA cuyo valor de densidad óptica (DO) es igual a 1 tiene aproximadamente una concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La producción de RNA citoplasmático de 30 μg a 50 μg de RNA por 107 células, dependiendo de su tamaño y estado de diferenciación celular. La cantidad de RNA obtenida por caja es aún más variable si se encuentra influenciada por la densidad celular en el momento de la cosecha.

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

Si 24.16 μg de RNA se encuentran en 20 μL , la relación existente en 3 μg de RNA es de 2.484 μL en la suspensión de agua DEPC.

$$(3 \mu\text{g} \times 20 \mu\text{L}) / (24.16 \mu\text{g}) = 2.84 \mu\text{L}$$

3.2.3.- Síntesis de DNA complementario.

El RNA suspendido en agua DEPC, se adicionó en tubo Eppendorf estéril de 0.25 μL , 4 μL de amortiguador 5 X (Invitrogen), 2 μL de DTT (Invitrogen) 0.1 M, 1 μL de dNTP's (Invitrogen), 0.5 μL de inhibidor de RNasa (Invitrogen) y 3 μg de RNA (según volumen calculado), luego se adicionó agua DEPC suficiente para un volumen final de 20 μL y se colocó en el termociclador (iCycler Bio Rad) para la amplificación del cDNA (DNA complementario) bajo los parámetros que se indican en la Imagen 10.

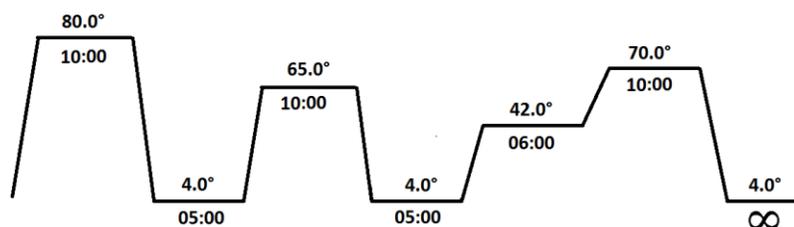


Imagen 10, Representación esquemática de los parámetros para la síntesis de cDNA.

Al descender la temperatura por primera vez a 4°C se adicionó el oligonucleotido de tiamina, la segunda vez que la temperatura desciende a 4°C se agregó la retrotranscriptasa (RT) para la síntesis del DNA complementario (cDNA).

3.3.1.- Diseño y síntesis de los oligonucleótidos específicos para hRSV (genes F y G) hMPV (genes N y L) y hPIV-2 (gen HN).

La determinación del grupo y subgrupo viral, se realizó mediante el uso específico de oligonucleótidos diseñados con ayuda del GenBank y posteriormente transformados a formato FASTA para posteriormente emplear el IDT (www.idtna.com) para el diseño de los oligonucleótidos (Tabla 6).

Para hRSV F se utilizaron 3 genes, el gen que codifica para la proteína F de la cepa Long que solo detecta la presencia del virus sin subgrupos, el gen que codifica para la proteína G de la cepa de referencia Long para detectar el subgrupo A y el gen que codifica para las proteínas ML de la cepa CH-18537 para detectar el subgrupo B.

Para el caso de hMPV se utilizaron los genes que codifican para las proteínas N y L, ya que aún no se cuentan con cepas de referencia comerciales, se estableció un control interno de hMPV el cual proviene de un aislado viral a partir de muestra clínica, se consideraron estos dos genes para poder abarcar mayor cantidad de cepas silvestres y no obtener un sesgo en la identificación por las variantes genéticas.

Para el caso de hPIV-2 se utilizó el gen que codifica para la proteína HN.

Tabla 6; Relación de oligonucleótidos y secuencias de los genes de F, G y ML de hRSV, N y L de hMPV y HN de hPIV-2.(F; Forward, R; Reverse)

Gen /sentido	Secuencia	Gen	Tamaño de fragmento (pb)	Región del gen	Temperatura de alineamiento (°C)
Oligonucleótidos para hRSV					
Ff	5'ATGAACAGTTTAAACATTACCAAGTGA3'	F	193	1127-1320	56
Fr	5'CCACGATTTTTATTGGATGCTG3'				
Gf	5'CCCAACATACCTCACT3'	G (A)	549	275-524	55
Gr	5'GAGGAGTTGAGTGGAAG3'				
MLf	5'CATGCCAAACACAAGAATCAAC3'	ML (B)	106	102-204	58
MLr	5'ATTCATCATCTCTGCCAATCAC3'				
Oligonucleótidos para hMPV					
Nf	5'-CAACAGCAGTGACACCCTC-3'	N	599	148-747	60
Nr	3'-ACTCATACCGTTTCGTAA-5'.				
Lf	5'-GCCATAGCCCAAACCATA- 3'	L	447	8920-9367	66
Lr	3'-CCCTGTAACGACTAGACT-5'				
Oligonucleótidos para hPIV-2					
HNf	5'-GACGCCTAAATATGGACCTCTC-3'	HN	279	525-826	68.8
HNr	5'-CACGTCTGGTCTTCCATCTTT-3'				

3.3.2.- Amplificación por RT-PCR punto final.

Se colocó en un tubo eppendorf estéril de 0.2 mL, 5 µL de cDNA con 5 µL de Buffer 10x (Invitrogen), más 1 µL de dNTP's 10 mM (Invitrogen) 0.2 µL de My Taq DNA polymerasa (BIO 21105), se agregó 5 µL del cebador en una concentración 10 µM y agua DEPC suficiente para un volumen final de 50 µL.

Para la amplificación del gen que codifica para cada proteína viral de interés, se programó el termociclador (iCycler BIO-RAD) con los siguientes parámetros donde X representa la temperatura de alineamiento específica de cada oligonucleótido (Imagen 11), la fase 2 y 3 se repiten en 35 ciclos.

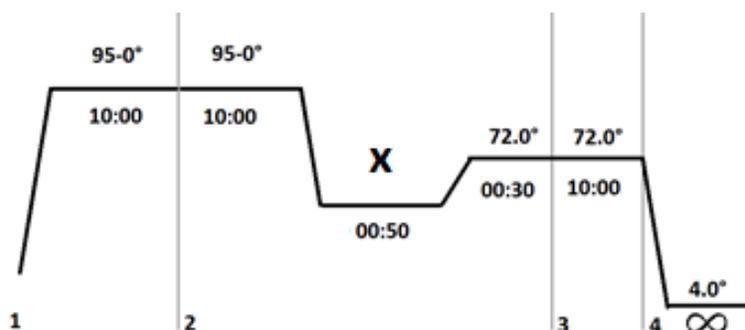


Imagen 11, Representación esquemática de los parámetros de amplificación por PCR, donde X representa la temperatura de alineamiento para cada oligonucleótido.

3.3.3.- Revelado.

Los productos amplificados por PCR se observaron en gel de agarosa al 1%, se tiñó con bromuro de etidio (BrEt) y adicionó un marcador de peso molecular de 100 pb, los cuales se revelaron con luz UV en el transluminador y analizados 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).

3.3.4.- Manejo de Datos

Los datos se analizaron con el programa IBM® SPSS® Statistics versión 19, el tratamiento de los datos contempla los campos como válidos a aquellos con los se cuenta información, ya se cuadro clínico, historia clínica, diagnostico, estado de procedencia de la muestra, fecha de la toma de muestra, infección o coinfeccion viral, etc. Las muestras clínicas que no contienen alguno de estos datos los toma como elementos "Perdidos".

4.1.- Resultados

4.1.1.-Determinación del título viral

El título viral se determinó por ensayo de TCDI₅₀ en la línea celular HEp-2 para los virus hRSV (ATCC® VR-26™), y hMPV (aislado de muestra clínica), cuyos títulos virales fueron de 5.6×10^6 y 1×10^5 respectivamente. Para el caso del virus hPIV-2 (ATCC VR-92), se determinó el título viral en células VERO el cual fue de 1.2×10^5 (Imagen 12). La selección de la línea celular depende del virus estudiado, ya que según los receptores que presente cada línea celular serán más permisibles a la infección por el virus.

Es necesario conocer la cantidad de virus con el que se trabaja, (el "título" de la suspensión viral). Este dato nos indica la capacidad que tiene el virus de infectar la célula.

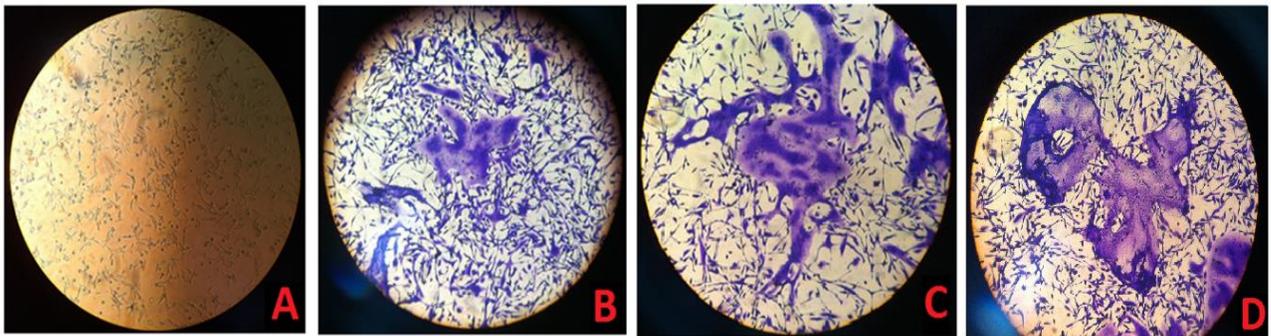


Imagen 12 Controles de referencia; A, Células HEp-2 sin infectar; B hMPV , C hRSV y D hPIV-2.

4.1.2.- Aislamiento viral

Se logró el aislamiento viral de 186 de un total de 200 muestras clínicas, a pesar de que los tres virus son capaces de producir sincitios estos no se presentaron en el total de las muestras, sin embargo se pudo observar efecto citopático el cual nos habla de la presencia del virus.

Se observaron diferencias entre la morfología de los sincitios, los sincitios producidos por hRSV son más abundantes en comparación con los producidos por hMPV y hPIV-2. En el caso de hMPV algunas de las muestras no muestran formación de sincitios, solo se observa el efecto citopático, similar al caso de hPIV-2 en donde los sincitios eran menos abundantes y pequeños.

4.1.3.- Genotipificación de aislados virales provenientes de muestras clínicas.

4.1.3.1.- hRSV

La genotipificación de los aislados virales se realizó por PCR retrotranscriptasa de punto final (RT-PCR) con oligonucleótidos específicos según el virus estudiado, para el caso de hRSV. Se amplificó el gen F de 193 pb (Imagen 13).

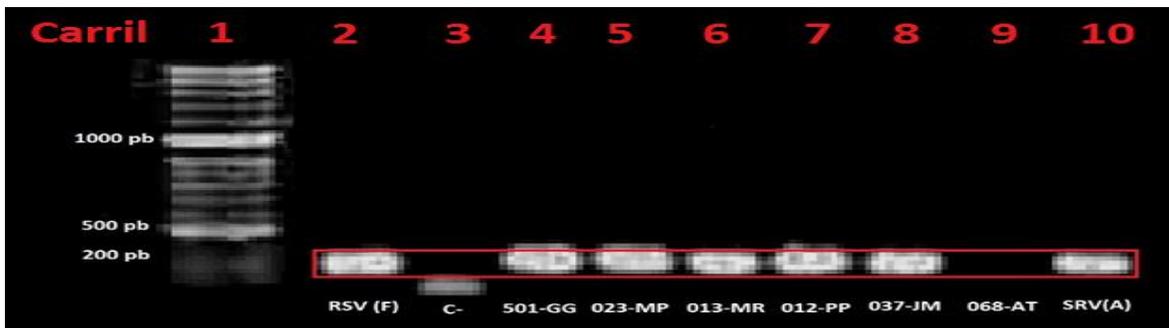


Imagen 13, Revelado de la amplificación del gen F de hRSV; Primer carril Marcador de peso molecular, Segundo carril Control positivo hRSV(F), tercer carril Control negativo, cuarto carril Muestra 501-GG positiva para hRSV (F), Quinto carril muestra 023-MP positiva para hRSV (F), Sexto carril muestra 013-MR positiva para hRSV (F), Séptimo carril muestra 012-PP positiva para hRSV (F), Octavo carril muestra 037-JM positiva para hRSV (F), Noveno carril muestra 068-AP negativa para hRSV (F), Decimo carril control positivo hSRV subtipo A positiva para hRSV (F)

La determinación del subgrupo de hRSV se logró mediante la amplificación del gen G y ML con oligonucleótidos específicos para cada subgrupo, G (549 pb) para el subtipo A (Imagen 14), y ML (106 pb) para el subtipo B (Imagen 15).

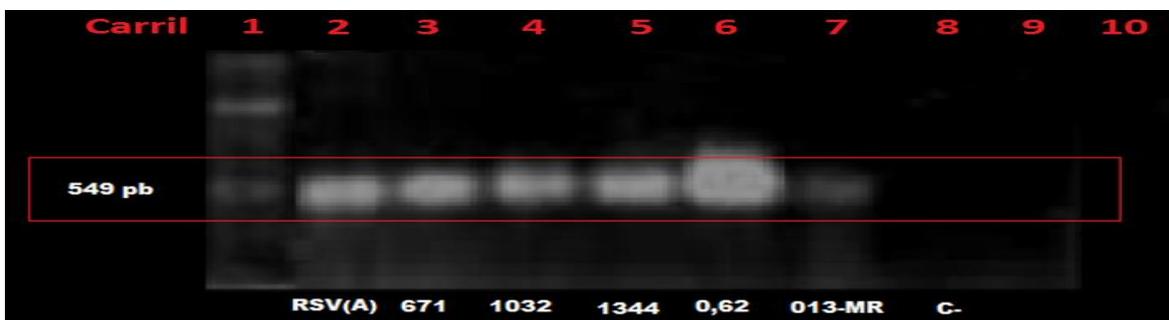


Imagen 14, Revelado de la amplificación del gen G de hRSV (A); Primer carril Marcador de peso molecular, Segundo carril Control positivo hRSV (A), Tercer carril muestra 671 positiva para hRSV (A), Cuarto carril muestra 1032 positiva para hRSV (A), Quinto carril muestra 1344 positiva para hRSV (A), Sexto carril muestra 0,62 positiva para hRSV (A), Séptimo carril muestra 013-MR positiva para hRSV (A), Octavo carril Control negativo (C-).

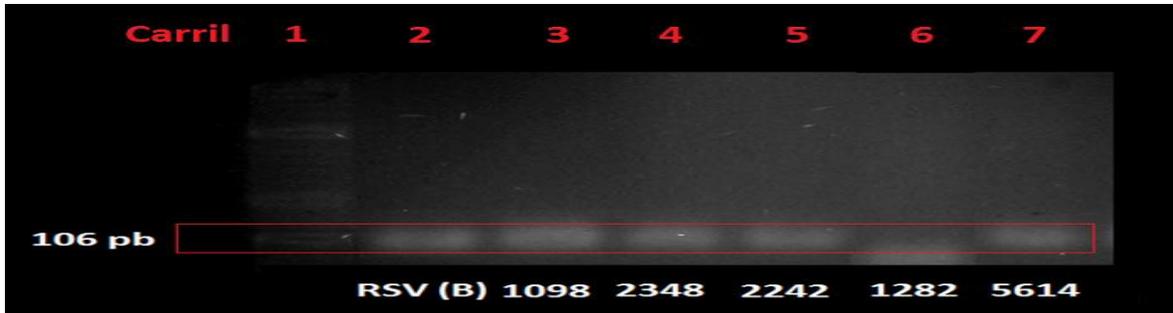


Imagen 15, Revelado de la amplificación del gen ML de hRSV (B); Primer carril Marcador de peso molecular, Segundo carril Control positivo hRSV(B), Tercer carril Muestra 1098 positiva para hRSV (B), Cuarto carril muestra 2348 positiva para hRSV (B), Quinto carril muestra 2242 positiva para hRSV (B), Sexto carril muestra 1282 negativa para hRSV (B), Séptimo carril muestra 5614 positiva para hRSV (B.)

4.1.3.2.- hMPV

Para la genotificación de hMPV se amplificó tanto el gen N de 599 pb (Imagen 16) como el gen L de 447pb (Imagen 17).

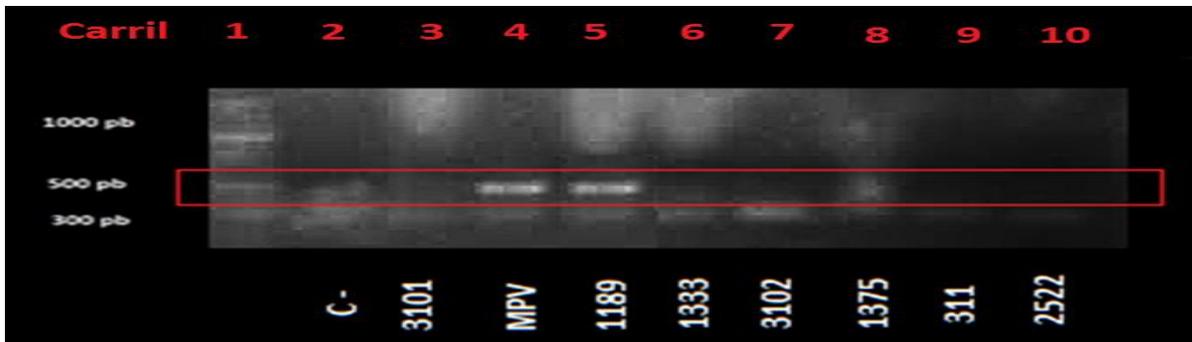


Imagen 16, Revelado de la amplificación del gen N, se muestra en el primer carril el marcador de peso molecular, Segundo carril Control negativo, Cuarto carril Control positivo de hMPV (N) , Quinto Carril Muestra 1189 positiva para hMPV (N), carriles 6, 7, 8, 9 y 10 negativos para hMPV (N).

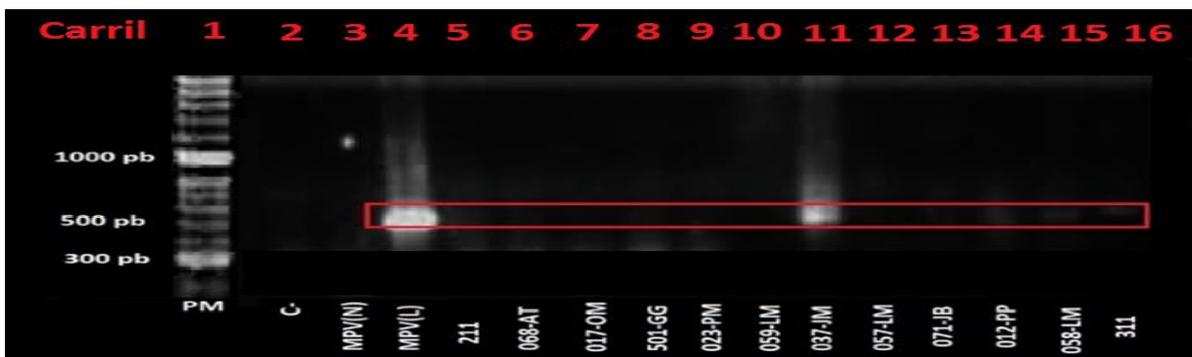


Imagen 17, Revelado de la amplificación del gen L, Primer carril Control de peso molecular, Segundo carril Control negativo, Tercer carril Control de hMPV(N), Cuarto carril control positivo de hMPV(L), Carril once muestra 037-JM Positiva para hMPV(L), carriles 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 y 16 negativos para hMPV (L).

4.1.3.3.- hPIV-2

En el caso de hPIV-2 se amplificó el gen HN de 279 pb (Imagen 18).

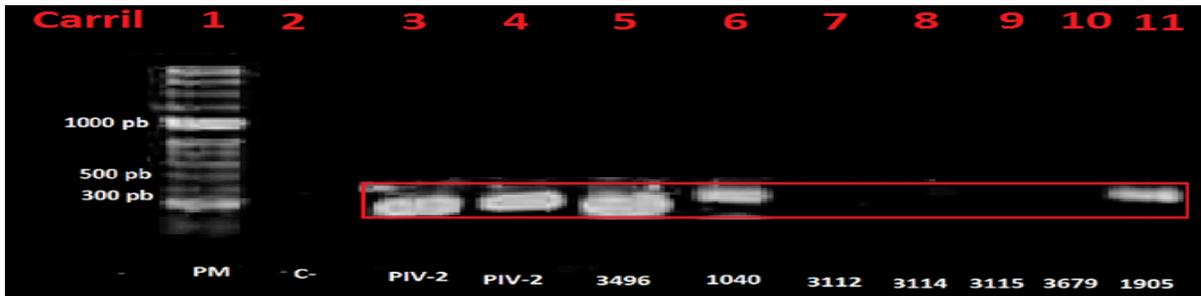


Imagen 18, Revelado de la amplificación del gen HN, Primer carril Control de peso molecular, Segundo carril Control negativo, Tercer carril Control de hPIV-2 (HN), Cuarto carril control positivo de hPIV-2 (HN), Quinto carril muestra 3496 positiva para hPIV-2 (HN), Sexto carril muestra 1040 positiva para hPIV-2 (HN), carriles 7, 8, 9, 10 y 11 negativos para hPIV-2 (HN).

4.1.3.4.- Control de Beta actina

Se utilizó como un control interno de la amplificación por RT-PCR, este control es gen de Beta actina de 205 pb (Imagen 19).

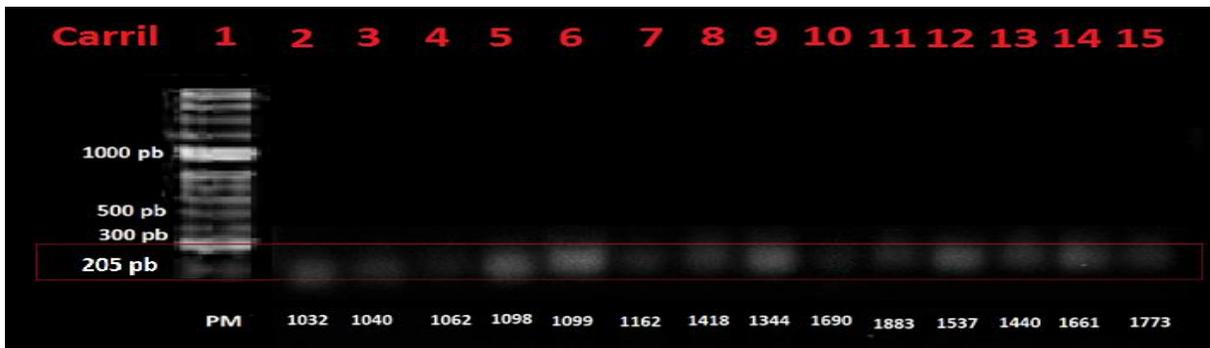


Imagen 19, Revelado de la amplificación del gen β -Actina, Primer carril Control de peso molecular, Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 positivos para β -Actina.

4.2.- Muestras clínicas

Del total de las 200 muestras clínicas recopiladas, 95 muestras contienen historia clínica y en la cual se menciona el tipo de muestra de la cual provienen. Es importante conocer el tipo de la muestra clínica. En nuestro caso se encontró que el 5.3% (n= 5) provienen de ENASO¹, 63.2% (n=60) a EFAR y con 31.6% (n=30) a muestras de SOB como se muestra en la tabla 7.

		TIPO DE MUESTRA			
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	ENASO	5	2,5	5,3	5,3
	EFAR	60	30,0	63,2	68,4
	SOB	30	15,0	31,6	100,0
	Total	95	47,5	100,0	
Perdidos	Sin Historia Clínica	105	52,5		
Total		200	100,0		

Tabla 7, Relación entre el tipo de muestra, frecuencia y porcentaje del total de 200 muestras.

Los datos se analizaron con el programa IBM® SPSS® Statistics versión 19, el tratamiento de los datos contempla las muestras clínicas que no contienen historia clínica y los toma como elementos “Perdidos”. (Gráfica 1)



Gráfica. 1, Relación del tipo de muestra clínica en forma porcentual.

¹ Exudado Naso Faringeo (ENASO), Exudado Faringeo (EFAR), Sobrenadante de la muestra (SOB) y Exudado (EXU)

4.3.- Diagnóstico Clínico.

El diagnóstico clínico se vuelve complejo cuando diversos agentes etiológicos son capaces de producir cuadros similares entre ellos, en este caso para 102 muestras que contaban con información acerca del diagnóstico clínico (Tabla 8), Influenza se perfila como el diagnóstico con mayor frecuencia con 23.7% (n=24) diagnósticos presuntivos, seguido de las Enfermedades Tipo Influenza (ETI) con 19.6% (n=20), las Infecciones Respiratorias Agudas Graves (IRAG) con 15.7% (n=16) diagnósticos, la Rinofaringitis a su vez presenta una frecuencia de 14.7% (n=15), el diagnóstico de panel (DX-PANEL) con 9.8% (n=10), Neumonía y Bronquiolitis presentan 5.9 % cada uno (n=6), y muy por debajo de las demás con una frecuencia de 1.9% (n=2) cada una Padecimiento viral PV y Faringitis. La Laringotraqueitis se encontró con una frecuencia de 0.9% lo que corresponde a solo un diagnóstico presuntivo por este padecimiento (Gráfica 2).

DIAGNOSTICO PRESUNTIVO		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	IRAG	15	7,5	14,4	14,4
	LARINGOTRAQUEITIS	1	,5	1,0	15,4
	PV	1	,5	1,0	16,3
	ETI	22	11,0	21,2	37,5
	NEUMONIA	5	2,5	4,8	42,3
	INFLUENZA	25	12,5	24,0	66,3
	DX PANEL	10	5,0	9,6	76,0
	BRONQUIOLITIS	6	3,0	5,8	81,7
	RINOFARINGITIS	17	8,5	16,3	98,1
	FARINGITIS	2	1,0	1,9	100,0
	Total	104	52,0	100,0	
Perdidos	Sin Historia Clínica	96	48,0		
Total		200	100,0		

Tabla 8, Relación entre el diagnostico presuntivo, frecuencia y porcentaje del total de 200 muestras.

Gráfica. 2, Relación de la proporción porcentual de los diferentes diagnósticos clínicos.

4.4.- Coinfecciones virales.

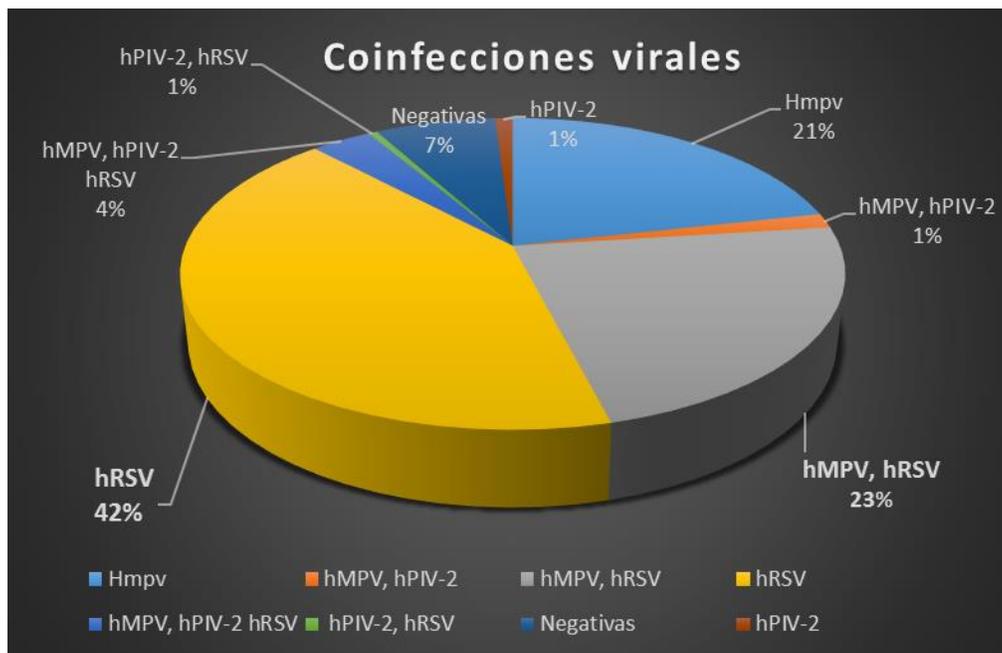
Se encontró gran variedad de coinfecciones virales, durante 10 años, 6 meses 14 días (Tabla 9).

Coinfección viral	Incidencia	Incidencia Acumulada	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	1	,5	,5	,5
hMPV (N,L)	30	15,0	15,0	15,5
hRSV (A)	11	5,5	5,5	21,0
hRSV (F)	16	8,0	8,0	29,0
hRSV (F), hMPV (N,L)	8	4,0	4,0	33,0
hRSV (F), (B)	32	16,0	16,0	49,0
hMPV (L)	13	6,5	6,5	55,5
hMPV (N,L), hRSV (B)	1	,5	,5	56,0
hPIV-2	2	1,0	1,0	57,0
hRSV (B)	3	1,5	1,5	58,5
hRSV (F), (B), hMPV (N,L)	1	,5	,5	59,0
hPIV-2, hRSV(F), (B), hMPV (N)	3	1,5	1,5	60,5
hMPV (N,L), hPIV-2	3	1,5	1,5	62,0
hRSV (F), (B), hPIV-2	2	1,0	1,0	63,0
hPIV-2, hRSV (F), (A), hMPV (N)	1	,5	,5	63,5
hPIV-2, hRSV(A)	1	,5	,5	64,0
hPIV-2, hRSV (F), hMPV (N)	1	,5	,5	64,5
hRSV (F), hMPV (L)	4	2,0	2,0	66,5
hMPV (L), hRSV(B)	4	2,0	2,0	68,5
hMPV (L), hRSV(A)	1	,5	,5	69,0
Negativa	14	7,0	7,0	76,0
hMPV (N), hRSV (B), hRSV(F)	19	9,5	9,5	85,5
hMPV (N,L), hRSV(A)	1	,5	,5	86,0
hRSV(F), (A,B)	3	1,5	1,5	87,5
hRSV (F)(A), hMPV (N)	6	3,0	3,0	90,5
hRSV(F), (A,B), hMPV (N)	1	,5	,5	91,0
hRSV (F), (A)	18	9,0	9,0	100,0
Total	200	100,0	100,0	

Tabla 9, Relación entre el tipo de Coinfección viral, incidencia, incidencia acumulada y porcentaje del total de 200 muestras.

4.4.1.- Coinfección viral por virus

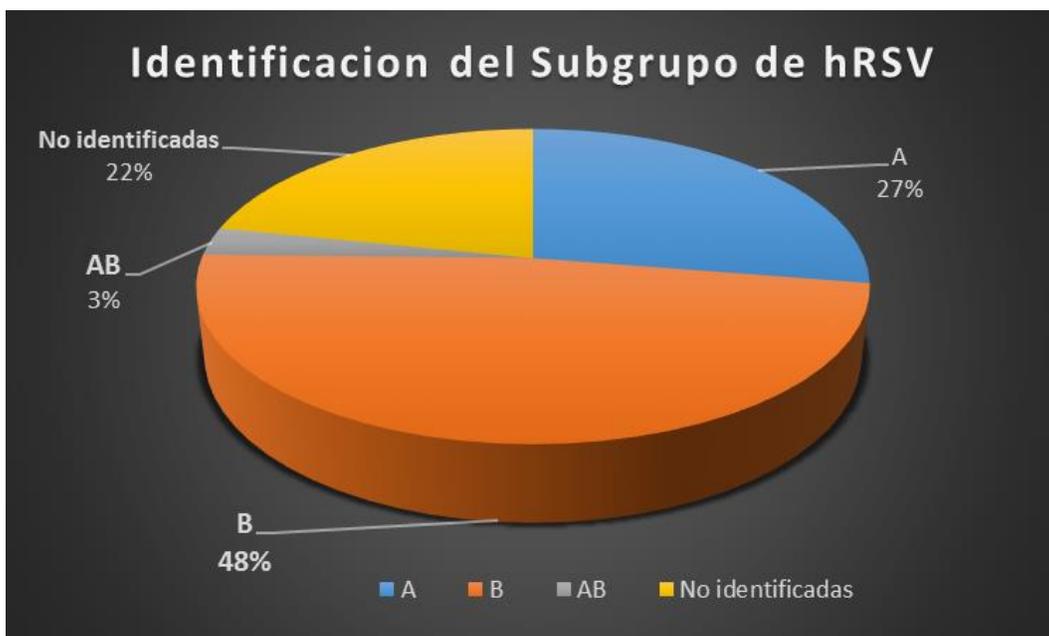
Al considerar la presencia del virus sin importar el gen amplificado, observamos que hRSV ocupa el primer lugar, en frecuencia con 84 muestras positivas para este virus solo. En segundo lugar se encuentra la coinfección entre hMPV y hRSV con 46 muestras positivas para estos dos virus, muy por debajo se encuentra en tercer lugar la infección provocada por hMPV con 43 muestras positivas para este virus solo. En cuarto lugar se encontró la coinfección provocada por los tres virus hMPV, hPIV-2 y hRSV con 7 muestras positivas. Existieron coinfecciones donde se observa la presencia de hMPV y hPIV-2 de las cuales 3 muestras fueron positivas para estos dos virus, así como la coinfección entre hRSV y hPIV-2 encontrándose en 1 muestra del total de 200 muestras. Es importante mencionar que hPIV-2 también se encontró en 2 muestras sin mostrar coinfecciones, Gráfica 4.



Gráfica 3, Relación de coinfecciones virales, muestras positivas, (hMPV 43, hMPV y hPIV-2 3, hMPV y hRSV 46, hRSV 84, hMPV, hPIV-2 y hRSV 7, hPIV-2 y hRSV 1, hPIV-2 2 y Negativas 14)

4.4.2.-Coinfeccion de subgrupos A y B de hRSV.

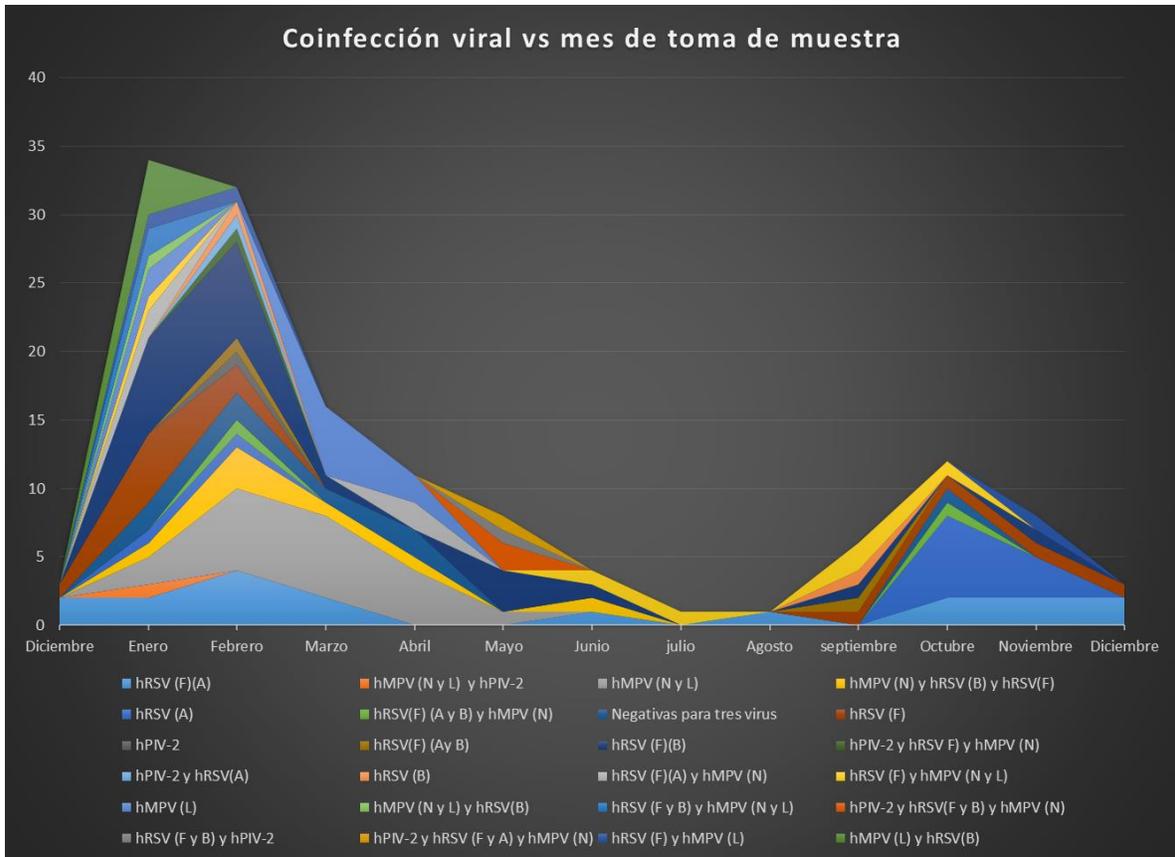
Del total de muestras positivas para hRSV, el subgrupo B se perfila en primer lugar en donde 66 muestras son positivas para este virus, dejando al Subgrupo A en segundo lugar con 38 muestras que fueron positivas para este virus. Se observó coinfección del subgrupo A y B en 4 muestras. Es importante mencionar que existieron 40 muestras que dieron positivo para la presencia del virus hRSV mediante la amplificación del gen que codifica para la proteína F, sin embargo no fue posible identificar el subgrupo del agente causal Gráfica 4.



Gráfica 4, Relación de incidencia de coinfecciones de subgrupos A y B de hRSV, muestras positivas (A 38, B 66, AB 4, No identificadas 40)

4.4.3.- Coinfección por mes.

Del total de 200 muestras solo 136 muestras contenían en la historia clínica el mes en el cual se tomó la muestra, se observa un aumento en la Incidencia de enfermedades de origen viral en los meses de Enero, Febrero, Marzo, Abril y Mayo, logrando un repunte en los meses de Septiembre, Octubre, Noviembre y Diciembre (Gráfica 5).



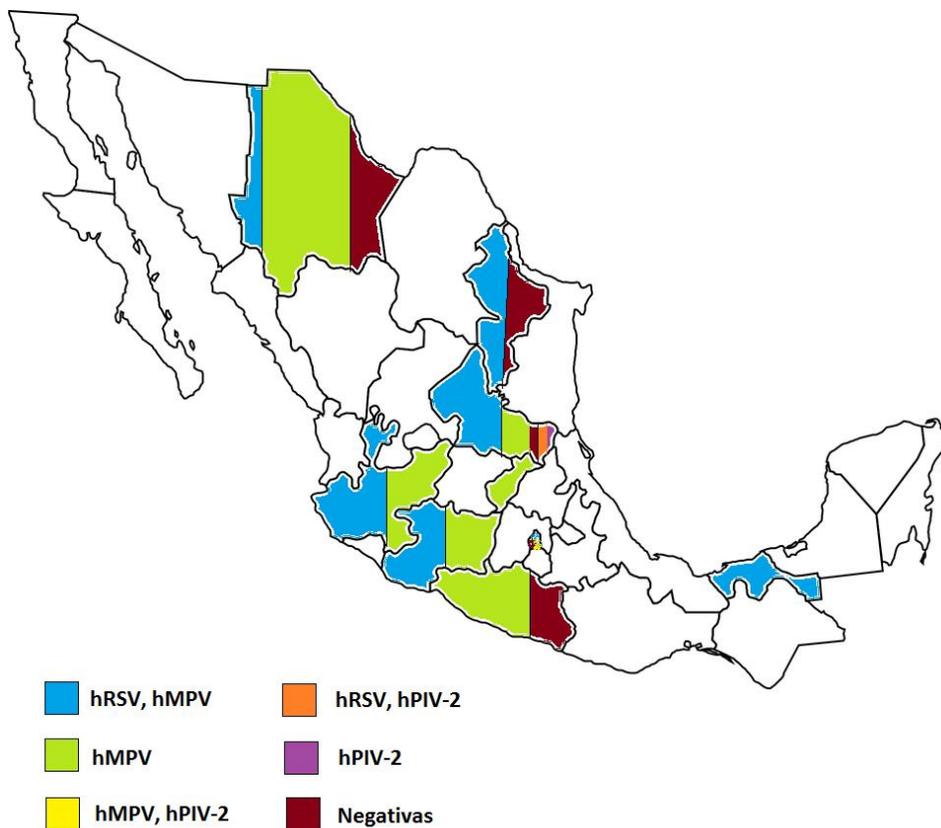
Gráfica 5, Relación de incidencia de coinfecciones virales según genes amplificados y el mes de la toma de muestra.

4.4.4.- Coinfecciones virales hRSV, hMPV y hPIV-2 por Estado geográfico.

Del total de las 200 muestras, 118 muestras contenían en la historia clínica el estado de procedencia, se observa que el estado de SLP (San Luis Potosí) presenta gran variedad de coinfecciones virales, así como el DF (Distrito Federal) y Guerrero (Tabla 10) (Gráfica 6).

Coinfecciones virales (hRSV, hMPV y hPIV-2) por Estado geográfico de la República Mexicana									
	hRSV, hMPV	hRSV, hPIV-2	hMPV	hMPV, hPIV-2	hPIV-2	hRSV, hMPV, hPIV-2	Negativas para tres virus		Total
CHIHUAHUA	1	0	6	0	0	0	3	0	10
DISTRITO FEDERAL	8	0	5	2	0	1	1	0	18
GUERRERO	0	0	9	0	0	0	1	0	10
JALISCO	1	0	1	0	0	0	0	0	3
MICHACÁN	1	0	1	0	0	0	0	0	3
NUEVO LEÓN	1	0	0	0	1	0	0	0	3
QUERETARO	0	0	2	0	0	0	0	0	3
SLP	11	0	13	0	1	2	5	0	32
TABASCO	1	0	0	0	0	0	0	0	1

Tabla 10, Relación entre los estados de procedencia de las muestras y el tipo de coinfección (hRSV, hMPV y hPIV-2) presente.



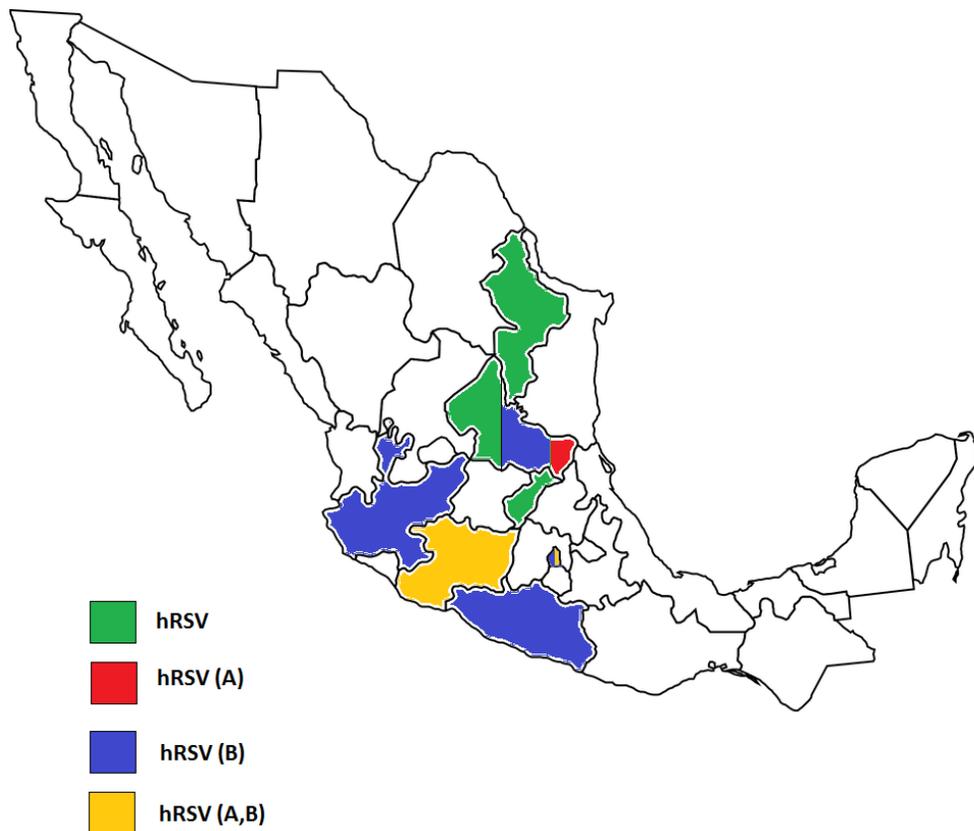
Gráfica 6, Incidencia de coinfección viral (hRSV, hMPV y hPIV-2) según gen amplificado en relación al estado del cual proviene la muestra.

4.4.5.- Coinfecciones virales (hRSV A y B) por Estado geográfico.

Del total de las 200 muestras, 118 muestras contenían en la historia clínica el estado de procedencia, se observa que el estado de SLP (San Luis Potosí) presenta gran variedad de coinfecciones virales, así como el DF (Distrito Federal) y Guerrero (Tabla 11) (Gráfica 7).

Coinfecciones virales hRSV (A y B) por Estado geográfico de la República Mexicana.				
	hRSV	hRSV (A)	hRSV (B)	AB
CHIHUAHUA	0	0	0	0
DISTRITO FEDERAL	0	0	12	1
GUERRERO	0	0	1	0
JALISCO	0	0	1	0
MICHACÁN	0	0	0	1
NUEVO LEÓN	1	0	0	0
QUERETARO	1	0	0	0
SLP	6	8	4	0
TABASCO	0	0	0	0

Tabla 11, Relación entre los estados de procedencia de las muestras y el tipo de coinfección (hRSV A y B) presente.



Gráfica 7, Incidencia de coinfección viral (hRSV A y B) según gen amplificado en relación al estado del cual proviene la muestra.

5.1-Discusión y análisis de Resultados.

Con base a los resultados obtenidos basados en cultivo celular, aislamiento viral y genotificación viral mediante la técnica de RT-PCR de punto final, observamos que el método es específico para los virus estudiados, sin embargo existen muestras que presentan infección por hRSV y no fue posible determinar el subgrupo viral. Así como en el caso de hMPV no todas las muestras fueron positivas para la amplificación de los dos genes N y L. Esto puede deberse a mutaciones puntuales de los virus modificando el sitio de unión de los oligonucleótidos diseñados, sugiriendo la presencia de variantes virales.

Dentro de las incidencias encontradas para el virus hMPV, podemos sugerir la presencia de variantes del virus, ya que en 43 casos positivos para el virus, en 31 muestras se amplificó tanto el gen N como el gen L, esto se debe a que las secuencias tanto del gen que codifica para la proteína N y L se encuentran presentes en el genoma del virus, la no amplificación de estos genes podría estar relacionado a la diferencias entre las secuencias propias de las variantes virales del hMPV. Se consideró amplificar los genes N y L para detectar la mayor cantidad de hMPV y así eliminar un sesgo por variantes del virus, es por esta razón al amplificar los genes N y L incluimos a un mayor número de muestras positivas ya que la amplificación de solo uno de estos genes podría dar un falso negativo al ser una variante del virus hMPV debido a que los oligonucleótidos diseñados para las secuencias consenso no se unen al virus presente en esas muestras.

El manejo de los datos obtenidos se realizó con ayuda del programa IBM® SPSS® Statistics versión 19, el cual contempla todos los datos recopilados, sin embargo para poder realizar las diferentes relaciones es imprescindible colocar un valor a un dato no recopilado, es por ello que aunque se logró la genotipificación de los agentes virales provenientes de las muestras clínicas, una gran cantidad de ellas no contaban con uno o varios de los datos, por lo cual se consideró trabajar con los datos que si se contaban y asignar los faltantes como perdidos, los cuales pueden cuantificarse, abriendo aún más el marco de incertidumbre sobre el panorama real. Esto dificulta la relación y comparación de las muestras y limita el estudio. Considero que aunque el estudio cuente con esta problemática es un esfuerzo considerable que ayuda a la interpretación del panorama de circulación de estos virus, abriendo la puerta a más estudios que junto con este contribuyan a fortalecer al sector salud.

En Relación al diagnóstico presuntivo, observamos que Influenza se considera como el principal diagnóstico, y enfermedades tipo influenza en segundo lugar, sin embargo en nuestros resultados el principal agente etiológico es la infección por hRSV (subgrupo B principalmente) seguido de la coinfección provocada por hRSV y hMPV., lo que nos habla de la importancia de las pruebas moleculares como diagnóstico así como la realización de la historia clínica del paciente, ya que un gran número de muestras no contaban con ella, lo que repercutió directamente en el panorama real. Del mismo modo considero relevante hacer énfasis en la

importancia de la elaboración de la historia clínica y no solo recurrir a las pruebas moleculares, en conjunto deben de estar relacionadas para brindar un mejor acercamiento al padecimiento del paciente.

Considero importante mencionar que siendo hRSV el principal agente causal de IRAS en este estudio, la determinación del subgrupo viral nos podría brindar información sobre signos o síntomas asociados a un determinado subgrupo viral. Así como al resto de los tres virus, direccionando de mejor forma un tratamiento.

Existen 14 muestras que fueron negativas para estos tres virus, es necesario realizar un diagnóstico molecular para otro tipo de virus como por ejemplo el virus de Influenza, o hPIV-1, así como la secuenciación masiva de las muestras positivas y negativas. Es imprescindible realizar la secuenciación de las muestras negativas para el subgrupo de hRSV y para hPIV-2, así como las muestras negativas para hMPV ya que por ahora no existe una cepa de referencia y es posible que existan variantes del virus ya que en unos casos se detecta la amplificación del gen N y en otros el gen L, para descartar posible variación genética, y en otros casos se observa la amplificación de los dos genes tanto N como L, y así poder asegurar que la amplificación de estos genes se debe a una infección por un solo tipo del virus.

Creo importante mencionar que el grueso de las muestras aportadas son mediante la técnica de Exudado Faríngeo, con un 30% del total de las muestras y el Exudado Nasofaríngeo solo el 2.5%, siendo este último el indicado para el diagnóstico molecular, a pesar de esto se obtuvo una buena genotificación de los agentes virales. En este punto considero importante homogenizar el criterio medico tanto para la toma de muestra como el diagnóstico clínico.

En relación a los resultados obtenidos se observa que estos virus a pesar de presentar estacionalidad anual, comparten semejanzas en los meses en los que se observa un incremento en la incidencia de las infecciones y coinfecciones, estos meses son a finales de Diciembre a principios de Marzo, lo que nos habla que el sector salud debe considerar el uso de campañas informativas, donde se mencionen los puntos principales a cumplir en materia de profilaxis, fortaleciendo a los médicos quienes realizan el diagnostico a tomar en cuenta una posible infección o coinfeccion(es) por alguno de estos virus. Aunado a esto es importante un refuerzo en los meses de Agosto, Septiembre y Noviembre donde empiezan a repuntar las infecciones y coinfecciones virales, esto puede explicarse ya que en el invierno por el deterioro del sistema inmune frente a los cambios de temperatura, así como la sensibilización del epitelio causado por temperaturas bajas, lo que facilita la infección del virus, así como el mismo incremento en la incidencia de infecciones y coinfecciones virales. En el caso de los meses de otoño, y primavera existe un fenómeno similar provocado por las temporadas de lluvia lo que hace que el virus se propague más eficientemente por medio de las gotas de saliva expulsadas por los pacientes infectados por alguno de estos tres virus, la humedad del medio

ambiente contribuye a que el virus se mantengan latentes en las gotas de saliva, y la propagación de sea más eficiente.

Con base a los resultados aquí presentados, es posible encontrar coinfecciones de estos tres virus, considero que la semejanza en la estacionalidad de estos virus contribuye a la exposición frente a estos virus y por ende a la coinfección viral, así como el deterioro del sistema inmune por la infección de un solo virus contribuye a la sensibilización del epitelio de las vías respiratorias.

La historia clínica establece un orden cronológico de los padecimientos del paciente, la cual contribuye a un diagnóstico eficiente, sin embargo al no contar con esta, el diagnóstico se vuelve azaroso donde se pierden de vista factores que hablan de un determinado padecimiento o circunstancias que faciliten un diagnóstico preciso. Sin embargo en el presente estudio se encontró que 96 muestras no cuentan con la historia clínica completa, esto puede estar íntimamente relacionado con los datos obtenidos, mostrando verdades a medias, lo que limitó la riqueza de información que la historia clínica podría brindar.

La coinfección principal está dada por hRSV y hMPV, el aumento de la incidencia de las infecciones por hRSV y hMPV puede contribuir a una posible coinfección viral, la cual puede repercutir en el estado de salud del paciente. Considero importante el seguimiento y evolución de los pacientes con las diferentes coinfecciones virales para determinar el impacto de estas, y así poder establecer un pronóstico eficiente, es posible que una coinfección por alguno de estos virus pueda contribuir a un mayor equilibrio entre la respuesta humoral y celular contribuyendo a un pronóstico favorable que el asociado a una infección ocasionada por un solo virus.

Existen pocos estudios en relación a coinfecciones respiratorias, en los cuales se mencionan diferencias entre la coinfección principal, así como el origen de la coinfección. Un antiviral que sea capaz de actuar de forma selectiva contra virus de RNA en este caso de infecciones es ideal, puesto que si observamos que un número considerable de muestras (186) presentan coinfección por alguno de estos virus, al poder detectar alguno de estos tres virus de RNA, nos hablaría de la posibilidad de que se presentara en coinfección con otro(s) virus, logrando abarcar un mayor número de coinfecciones que en este estudio pasen desapercibidas.

En relación a las incidencias encontradas para estos virus en los diferentes estados de los cuales provienen algunas de las muestras, se observa una amplia distribución geográfica de los diferentes virus estudiados, sin embargo considero que existe un sesgo ya que a pesar que los hospitales son considerados regionales (lo que sugiere que pueden llegar a ellos pacientes de cualquier estado de la república mexicana) la cantidad de muestras proporcionadas son de una región específica (en especial SLP y DF), omitiendo un panorama general del mapa viral de México. Sería interesante la secuenciación de los diversos virus estudiados en comparación al estado de procedencia en el cual se pueda relacionar la similitud entre las

variantes virales, y así obtener un mapa de variantes virales el cual brinde información sobre la cercanía o similitud entre los estados, brindando información sobre patrones de migración y de clima. Considero importante incluir en el estudio a los diferentes estados de la república Mexicana para de este modo mejorar el estudio. Considero importante la integración de un grupo multidisciplinario en el desarrollo del estudio.

A pesar de ser un estudio que se realizó de manera retrospectiva, considero que contribuye a los estudios epidemiológicos del país. Considero la técnica de RT-PCR punto final como una prueba accesible y eficaz para la determinación de estos agentes virales.

5.1.1.-Conclusiones.

- Se logró Genotipificar 186 aislados virales provenientes de muestras clínicas de pacientes pediátricos que cursaban con infección respiratoria aguda de un total de 200 muestras clínicas.
- Se logró relacionar 117 muestras clínicas con el tipo de coinfección viral y el estado del cual proviene la muestra, sin embargo por la falta de historia clínica puede producir un sesgo en el manejo de los datos.
- Se logró determinar la infección y coinfecciones virales provocadas por hRSV, hMPV y hPIV-2.
- Se encontró mediante la técnica molecular RT-PCR una incidencia acumulada de hMPV 0.215, hMPV y hPIV-2 0.015, hMPV y hRSV 0.23, hRSV 0.42, hMPV, hPIV-2 y hRSV 0.035, hPIV-2 y hRSV 0.005, hPIV-2 0.01 durante 10 años, 6 meses 14 días.
- Con los datos encontrados se puede brindar información necesaria para realizar un esquema de patrones de circulación de los diferentes virus así como las coinfecciones virales provocadas por hRSV, hMPV y hPIV-2.

6.1.- Perspectivas

- Analizar las muestras por RT-PCR punto final con oligonucleótidos específicos para PIV-1.
- Realizar la secuenciación al total de las muestras y así confirmar la presencia de variantes virales.

^I Identification of an Unclassified Paramyxovirus in Coleura afra: A Potential Case of Host Specificity, Gael D. Maganga, Mathieu Bourgarel, Judicael Obame Nkoghe, Nadine N'Dilimabaka, Christian Drosten, Christophe Paupy, Serge Morand, Jan Felix Drexler, and Eric M. Leroy, 2014 Dec 31

^{II} Influence of Respiratory Syncytial Virus F Glycoprotein Conformation on Induction of Protective Immune Responses. Palomo C1, Mas V1, Thom M2, Vázquez M1, Cano O1, Terrón MC3, Luque D3, Taylor G4, Melero JA5. J Virol. 2016 May

^{III} Human metapneumovirus small hydrophobic (SH) protein downregulates type I IFN pathway signaling by affecting STAT1 expression and phosphorylation, Hastings AK, Amato KR, Wen SC, Peterson LS, Williams JV. 2016 Apr 27.

^{IV} "La proteína no-estructural NS1 exclusiva del virus respiratorio sincicial: mecanismo de plegamiento y ensamblado quasi-espontáneo de oligómeros esféricos estables" (2014) Pretel, Miguel Esteban

^V Nishio et al., 2001, Parisien et al., 2001.

^{VI} Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits and antagonizes tetherin, K. Ohta¹, H. Goto¹, N. Yumine¹, M. Nishio¹ Journal of General Virology (2016)

^{VII} Potential siRNA Molecules for Nucleoprotein and M2/L Overlapping Region of Respiratory Syncytial Virus: In Silico Design Somayeh Shatizadeh Malekshahi,¹ Ehsan Arefian,² Vahid Salimi,¹ Talat Mokhtari Azad,¹ and Jila Yavarian^{1,*} Jundishapur J Microbiol. 2016 Apr;

^{VIII} Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2 are crucial pathogenic factors that modulate interferon signaling and Treg cell distribution in mice. Yang P1, Zheng J1, Wang S1, Liu P1, Xie M1, Zhao D2. *Virology*. 2015 Nov.

^{IX} Human respiratory syncytial virus non-structural protein NS1 modifies miR-24 expression via transforming growth factor- β . Bakre A, Wu W, Hiscox J, Spann K, Teng MN, Tripp RA. *J Gen Virol*. 2015 Nov;96(11):3179-91.

^{XI} Características clínicas y epidemiológicas de la infección por virus parainfluenza en niños hospitalizados, Luis E. Vega-Briceño, Dahiana Pulgar B., Marcela Potin S., Marcela Ferres G. e Ignacio Sánchez D. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, 25 abril 2007.

^{XII} Use of laboratory and administrative data to understand the potential impact of human parainfluenza virus 4 on cases of bronchiolitis, croup, and pneumonia in Alberta, Canada. Fathima S1, Simmonds K2,3, Invik J1,3, Scott AN2, Drews S4,5,6. *BMC Infect Dis*. 2016 Aug.

^{XIII} Recombinant human parainfluenza virus type 2 with mutations in V that permit cellular interferon signaling are not attenuated in non-human primates. Anne Schaap-Nutt1,* , Christopher D'Angelo1, Emerito Amaro-Carambot1, Sheila M. Nolan1, Stephanie Davis1, Shenelle-Marie Wise1, Caraline Higgins1, Konrad Bradley1, Olivia Kim1, Reina Mayor1, Mario H. Skiadopoulos1, Peter L. Collins1, Brian R. Murphy1, and Alexander C. Schmidt1. *Virology* . 2010 October 10; 406(1)

^{XIV} Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. Tayyari F, Marchant D, Moraes TJ, Duan W, Mastrangelo P, et al. (2011) *Nat Med* 17: 1132–1135

^{XV} NSAIDs diclofenac, indomethacin, and meloxicam highly upregulate expression of ICAM-1 and COX-2 induced by X-irradiation in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Sep 26.

^{XVI} RhoA-derived peptide dimers share mechanistic properties with other polyanionic inhibitors of respiratory syncytial virus (RSV), including disruption of viral attachment and dependence on RSV G. Budge PJ1, Li Y, Beeler JA, Graham BS. *J Virol*. 2004 May

^{XVII} Genetic Polymorphisms of Toll-like Receptor 4 are Associated with Respiratory Syncytial Virus Infection in a Chinese Infant Population. Zhu H, Fu Z, Gao L, Wang L, Liu E, Tian D. *Clin Lab*. 2015

^{XIX} CX3CR1 is an important surface molecule for respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells.

Chirkova T1, Lin S1, Oomens AG2, Gaston KA1, Boyoglu-Barnum S1, Meng J1, Stobart CC1, Cotton CU3, Hartert TV4, Moore ML1, Ziady AG1, Anderson LJ1. *J Gen Virol*. 2015 Sep;96(9):2543-56

^{XX} Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures. *J Virol*. 2015 Aug. Epub 2015 May 20

^{XXI} Effect of Hemagglutinin-Neuraminidase Inhibitors BCX 2798 and BCX 2855 on Growth and Pathogenicity of Sendai/Human Parainfluenza Type 3 Chimera Virus in Mice Makiko Watanabe,1 Vasiliy P. Mishin,1† Scott A. Brown,2 Charles J. Russell,1 Kelli Boyd,4‡ Y. Sudhakara Babu,5 Garry Taylor,6 Xiaoping Xiong,3 Xiaowei Yan,3 Allen Portner,1 and Irina V. Alymov. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Sept. 2009, p. 3942–3951

^{XXII} The Fusion Protein Specificity of the Parainfluenza Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein Is Not Solely Defined by the Primary Structure of Its Stalk Domain.

Masato Tsurudome,corresponding authora Morihito Ito,b Junpei Ohtsuka,a,c Kenichiro Hara,a,c Hiroshi Komada,d Machiko Nishio,e and Tetsuya Nosakaa *J Virol*. 2015 Dec 15; 89(24): 12374–12387.

^{XXIII} Role of Hydrogen Sulfide in Paramyxovirus Infections Hui Li,a Yinghong Ma,a Oliver Escaffre,b Teodora Ivanciuc,a Narayana Komaravelli,a John P. Kelley,a Ciro Coletta,c Csaba Szabo,c Barry Rockx,b,f Roberto P. Garofalo,a,d,e Antonella Casolaa, *Journal of Virology* May 2015 Volume 89 Number 10

^{XXIV} Ryan F. Russell, Partial Attenuation of Respiratory Syncytial Virus with a Deletion of a Small Hydrophobic Gene Is Associated with Elevated Interleukin-1 β Responses.

XXV Fuentes S, Tran KC, Luthra P, Teng MN, He B 2007. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *J Virol* 81:8361–8366. 02717-06

XXVII C-Terminal DxD-Containing Sequences within Paramyxovirus Nucleocapsid Proteins Determine Matrix Protein Compatibility and Can Direct Foreign Proteins into Budding Particles. Ray G, Schmitt PT, Schmitt AP. *J Virol*. 2016 Jan 20.

XXVIII The Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Forms Tetramers and Interacts with RNA and P in a Competitive Manner. Thi-Lan Tran,¹ Nathalie Castagné,¹ Virginie Dubosclard,¹ Sylvie Noinville,¹ Emmanuelle Koch,¹ Mohammed Moudjou,¹ Céline Henry,² Julie Bernard,¹ Robert Paul Yeo,³ and Jean-François Eléouët^{1,*} *J Virol*. 2009 Jul.

XXIX Phosphorylation of Human Metapneumovirus M2-1 Protein Upregulates Viral Replication and Pathogenesis. Cai H1, Zhang Y1, Lu M2, Liang X1, Jennings R1, Niewiesk S1, Li J3. *J Virol*. 2016 Jul

XXX Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits interferon production and signaling and is required for replication in nonhuman primates. Anne Schaap-Nutt1,* , Christopher D'Angelo1, Margaret A. Scull2,3, Emerito AmaroCarambot1, Machiko Nishio4, Raymond J. Pickles2,3, Peter L. Collins1, Brian R. Murphy1, and Alexander C. Schmidt. *Virology*. 2010 February 20; 397(2): 285. doi:10.1016/j.virol.2009.11.018.

XXXI Miguel Ángel Galván-Morales, Rosa Elena Sarmiento-Silva, Ma. Eugenia Manjarrez-Zavala, Modulación de la síntesis de interferones en la infección por paramixovirus 2013. *PLoS Pathog*. 2015 Dec; 11(12): e1005318.

XXXII Roles of the putative integrin-binding motif of the human metapneumovirus fusion (f) protein in cell-cell fusion, viral infectivity, and pathogenesis. Wei Y1, Zhang Y, Cai H, Mirza AM, Iorio RM, Peeples ME, Niewiesk S, Li J. *J Virol*. 2014 Apr;88(8):4338-52.

XXXIII A recombinant sialidase fusion protein effectively inhibits human parainfluenza viral infection in vitro and in vivo, Anne Moscona, Matteo Porotto2, Samantha Palmer2, Caroline Tai1, Lori Aschenbrenner1, *J Infect Dis*. 2010 July 15.

Gallen Triana-Baltzer1, Qi-Xiang Li1, David Wurtman1, Stefan Niewiesk3, and Fang Fang1,

XXXIV Effect of In Vitro Syncytium Formation on the Severity of Human Metapneumovirus Disease in a Murine Model

Laetitia Aerts,1 Marie-Hélène Cavanagh,1 Julia Dubois,1 Julie Carbonneau,1 Chantal Rhéaume,1 Sophie Lavigne,2 Christian Couture,2 Marie-Ève Hamelin,1 and Guy Boivin1,**PLoS One*. 2015; 10(3): e0120283.

XXXV Association of the parainfluenza virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins on cell surfaces. Yao Q1, Hu X, Compans RW, *J Virol*. 1997 Jan.

XXXVI Fearn R. & Collins P. L. Role of the M2-1 Transcription Antitermination Protein of Respiratory Syncytial Virus in Sequential Transcription. *J. Virol*. 73, 5852–5864 (1999).

XXXVII Systematic Analysis of Cell-Type Differences in the Epithelial Secretome Reveals Insights into the Pathogenesis of Respiratory Syncytial Virus–Induced Lower Respiratory Tract Infections. Yingxin Zhao, Mohammad Jamaluddin, Yueqing Zhang, Hong Sun, Teodora Ivanciuc, Roberto P. Garofalo and Allan R. Brasier. *J Immunol* April 15, 2017.

XXXVIII Human metapneumovirus infection in chronic obstructive pulmonary disease: impact of glucocorticosteroids and interferon. Kan-O K1,2,3,4, Ramirez R5, MacDonald MI1, Rolph M6, Rudd PA6, Spann KM7, Mahalingam S6, Bardin PG1,2,3, Thomas BJ1,2,3. *J Infect Dis*. 2017 Apr 4.

XXXIX Are leukotriene inhibitors useful for bronchiolitis? Pérez-Gutiérrez F1, Otárola-Escobar I2, Arenas D3. *Medwave*. 2016 Dec 16.

XL Global Burden of Disease Study.Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015 August 22; 386(9995): 743–800. doi:10.1016/S0140-6736(15)60692-4 PMID: 26063472

XLi Coinfection of the Respiratory Tract: Viral Competition for Resources Lubna Pinky, Hana M. Dobrovolny* Physics and Astronomy Department, Texas Christian University, Fort Worth, Texas, United States of America Published: May 19, 2016.

-
- ^{XLII} Severity of Respiratory Syncytial Virus Lower Respiratory Tract Infection With Viral Coinfection in HIV-Uninfected Children. Mazur N1,2,3, Bont L2,4, Cohen AL5,6, Cohen C7,8, von Gottberg A8,9, Groome MJ1,10, Helfferscee O8,9, Klipstein-Grobusch K3,7, Mekgoe O11, Naby F12, Moyes J7,8, Tempia S5,6, Treurnicht FK8, Venter M13,14, Walaza S7,8, Wolter N8,9, Madhi SA1,10; South African Severe Acute Respiratory Illness (SARI) Surveillance Group. *Clin Infect Dis*. 2017 Feb 15
- ^{XLIII} Coinfections of the Respiratory Tract: Viral Competition for Resources. Lubna Pinky, Hana M. Dobrovolny* Physics and Astronomy Department, Texas Christian University, Fort Worth, Texas, United States of America h.dobrovolny@tcu.edu
- ^{XLIV} Incidence and Clinical Course of Respiratory Viral Coinfections in Children Aged 0-59 Months. Nitsch-Osuch A1, Kuchar E2, Topczewska-Cabaneck A3, Wardyn K3, Źyćńska K3, Brydak L4. *Adv Exp Med Biol*. 2016;905:17-23
- ^{XLV} Human Respiratory Syncytial Virus: Role of Innate Immunity in Clearance and Disease Progression. Farrag MA, Almajhdi FN. *Viral Immunol*. 2016 Jan
- ^{XLVI} The role of Th17 and Treg responses in the pathogenesis of RSV infection Thomas C. Mangodt, Mikhail A. Van Herck, Sara Nullens, José Ramet, Jozef J. De Dooy, Philippe G. Jorens & Benedicte Y. De Winter. *Pediatric Research* 2015 78, 483–491.
- ^{XLVII} Functional motifs responsible for human metapneumovirus M2-2-mediated innate immune evasion. Chen Y1, Deng X2, Deng J3, Zhou J4, Ren Y1, Liu S1, Prusak DJ5, Wood TG5, Bao X6. *Virology*. 2016 Dec.
- ^{XLVIII} Parainfluenza Viruses Kelly J. Henrickson* *Clin Microbiol Rev*. 2003 Apr; 16(2): 242–264.
- ^{XLIX} Interferon signalling network in innate defence. Takaoka A, Yanai H. *Cell Microbiol*. 2006 Jun;8
- ^L Innate immune response to viral infection, Shohei Koyama a,b, Ken J. Ishii a,c, Cevayir Coban a,b, Shizuo Akira a,b,* . 2008
- ^{LI} *Advances in immunology*, Volume 117, Frederick W. ALT. Howard Hughes Medical Institute, Boston, Massachusetts, USA 2013 pp 101.
- ^{LII} eutrophil infiltration and activation in bronchiolitic airways are independent of viral etiology. Cavallaro EC1, Liang KK1, Lawrence MD1, Forsyth KD2, Dixon DL1,3. *Pediatr Pulmonol*. 2016 Jul 13.
- ^{LIII} *Inmunologia*. A. Arnaiz-Villena, J. R. Regueiro, Carlos López Larrea 1995. Pp 59-62.
- ^{LIV} 20. Barber GN. 2001. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 8:113–126. doi:10.1038/sj.cdd.4400823
- ^{LV} 12. Pavlin JA, Hickey AC, Ulbrandt N, Chan YP, Endy TP, Boukhvalova MS, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Libraty DH, Green S, Rothman AL, Ennis FA, Jarman R, Gibbons RV, Broder CC. 2008. Human metapneumovirus reinfection among children in Thailand determined by ELISA using purified soluble fusion protein. *J Infect Dis* 198:836–842. doi:10.1086/591186
- ^{LVI} Role of type I interferon signaling in human metapneumovirus pathogenesis and control of viral replication. Hastings AK1, Erickson JJ1, Schuster JE2, Boyd KL1, Tollefson SJ3, Johnson M3, Gilchuk P1, Joyce S1, Williams JV4. *J Virol*. 2015 Apr;89(8):4405-20. doi: 10.1128/JVI.03275-14
- ^{LVII} Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits innate immune response in monocyte-derived dendritic cells. Ren J1, Liu G2, Go J1, Kolli D1, Zhang G3, Bao X4. *PLoS One*. 2014 Mar 11;9(3):e91865. doi: 10.1371/journal.pone.0091865. eCollection 2014
- ^{LVIII} Current management of parainfluenza pneumonitis in immunocompromised patients: a review. *Ann R Falsey. Infection and drug Resistance* 7 agosto 2012.
- ^{LX} Guía de Práctica Clínica sobre Bronquiolitis Aguda, GUÍAS DE PRÁCTICA CLÍNICA EN EL SNS MINISTERIO DE SANIDAD Y POLÍTICA SOCIAL.
- ^{LXI} <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>
- ^{LXII} Novel insights into human respiratory syncytial virus-host factor interactions through integrated proteomics and transcriptomics analysis EXPERT REVIEW OF ANTI-INFECTIVE THERAPY, 2016, VOL. 14, NO. 3, 285–297.
- ^{LXIII} Potentiation of ribavirin-induced teratogenesis by natural purines, Calvin C. Willhite, Vergil H. Ferm *Experimental and Molecular Pathology* Volume 28, Issue 2, April 1978, Pages 196-201

- LXIV Ribavirin inhibits human parainfluenza virus type 2 replication in vitro. Kihira S1, Uematsu J, Kawano M, Itoh A, Ookohchi A, Satoh S, Maeda Y, Sakai K, Yamamoto H, Tsurudome M, O'Brien M, Komada H. *Microbiol Immunol*. 2014 Nov;58(11):628-35.
- LXV Intravenous ribavirin by constant infusion for serious influenza and parainfluenzavirus infection, Hayden FG1, Sable CA, Connor JD, Lane J. *Antivir Ther*. 1996 Jan
- LXVI Antiviral Treatments. Ison MG1. [Clin Chest Med](#). 2017 Mar.
- LXVII Treatment with oral ribavirin and IVIG of severe human metapneumovirus pneumonia (HMPV) in immune compromised child. Shachor-Meyouhas Y, Ben-Barak A, Kassis I. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Aug;57(2):350-1. doi: 10.1002/pbc.23019.
- LXVIII Antiviral Activity of Favipiravir (T-705) against a Broad Range of Paramyxoviruses In Vitro and against Human Metapneumovirus in Hamsters. Jochmans D1, van Nieuwkoop S2, Smits SL2, Neyts J1, Fouchier RA2, van den Hoogen BG3. 2016 Jul 22.
- LXX Deval J et al. Efecto bioquímico de las mutaciones de resistencia contra los inhibidores sinérgicos de la ARN polimerasa de RSV. . 2016 10 de mayo; 11 (5): e0154097.
- LXXI Molecular Basis for the Selective Inhibition of Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase by 2'-Fluoro-4'-Chloromethyl-Cytidine Triphosphate. Published online 2015 Jun 22. doi: 10.1371/journal.ppat.1004995. Jerome Deval,1,* Jin Hong,1 Guangyi Wang,1 Josh Taylor,1 Lucas K. Smith,1 Amy Fung,1 Sarah K. Stevens,1 Hong Liu,1 Zhinan Jin,1 Natalia Dyatkina,1 Marija Prhavic,1 Antitsa D. Stoycheva,1 Vladimir Serebryany,1 Jyanwei Liu,1 David B. Smith,1 Yuen Tam,1 Qingling Zhang,1 Martin L. Moore,2,3 Rachel Fearn,4 Sushmita M. Chanda,1 Lawrence M. Blatt,1 Julian A. Symons,1 and Leo Beigelman1,*
- LXXII Wang G, et al. Discovery of 4'-chloromethyl-2'-deoxy-3',5'-di-O-isobutyryl-2'-fluorocytidine (ALS-8176), a first-in-class RSV polymerase inhibitor for treatment of human respiratory syncytial virus infection. *J Med Chem*. 2015 Feb 26;58(4):1862-78.
- LXXIII Figueras-Aloy J, Quero Jiménez J; Comité de Estándares de la Sociedad Española de Neonatología. Recomendaciones para la prevención de la infección por virus respiratorio sincitial. *An Pediatr (Barc)*. 2005.
- LXXIV Recomendaciones de uso de palivizumab para la prevención de la infección por virus respiratorio sincitial en prematuros de 321 a 350 semanas de gestación. J. Figueras Aloy , X. Carbonell Estrany y Comité de Estándares de la Sociedad Española de Neonatología. Disponible en Internet el 10 de julio de 2010.
- LXXV American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn. Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for the prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics*. 2003 Dec;112(6 Pt 1):1442-6.
- LXXVI Structural basis for antibody cross-neutralization of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. Wen X1, Mousa JJ2, Bates JT2, Lamb RA3,4, Crowe JE Jr2,5,6, Jardetzky TS1. *Nat Microbiol*. 2017 Jan 30;2:16272. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.272.
- LXXVII. Efficacy against very virulent (vv) Marek's Disease Virus (MDV) of the HVT/ ND recombinant and the immunity against virulent (v) New Castle Disease Virus (NDV). *Memorias de la 56th Western Poultry Conference*, 83. Las Vegas, Nevada, USA. Hein R.G. and G. Slacum (2007)
- LXXVIII Human metapneumovirus virus-like particles induce protective B and T cell responses in a mouse model. Cox RG1, Erickson JJ, Hastings AK, Becker JC, Johnson M, Craven RE, Tollefson SJ, Boyd KL, Williams JV. *J Virol*. 2014 Jun;88(11):6368-79. doi: 10.1128/JVI.00332-14. Epub 2014 Mar 26.
- LXXIX Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes S. Martínez-Flórez, J. González-Gallego, J. M. Culebras* y M.ª J. Tuñón, Departamento de Fisiología, Universidad de León y *Hospital de León. *España Nutr. Hosp.* (2002) XVII (6) 271-278.
- LXXX Phenolic Compounds from the Flowers of *Bombax malabaricum* and Their Antioxidant and Antiviral Activities. Zhang YB1,2, Wu P3,4, Zhang XL5,6, Xia C7,8, Li GQ9, Ye WC10, Wang GC11,12, Li YL13,14.
- LXXXI Karron R. Overview of the RSV vaccine field. In: WHO, consultation on respiratory syncytial virus (RSV) vaccine, development. Geneva: World Health Organization; 2015.
- LXXXII Respiratory viral infections and host responses; insights from genomics. *Molecules*. 2015 Nov 5;20(11):19947-57. doi: 10.3390/molecules201119660.
- Troy NM1, Bosco A2. *Respir Res*. 2016 Nov 21.

LXXXIII Prediction of influenza B vaccine effectiveness from sequence data. Pan Y1, Deem MW2. Vaccine. 2016 Jul 26.

LXXXIV Incidence and etiology of hospitalized acute respiratory infections in the Egyptian Delta.

Rowlinson E1,2, Dueger E2, Mansour A1, Azzazy N3, Mansour H1, Peters L1, Rosenstock S1, Hamid S1, Said MM2, Geneidy M3, Allah MA3, Kandeel A4. Influenza Other Respir Viruses. 2016 Jul 26.

LXXXV Jackson S, Mathews KH, Pulanić D, Falconer R, Rudan I, Campbell H, Nair H. Risk factors for severe acute lower respiratory infections in children – a systematic review and meta-analysis. Croat Med J. 2013

LXXXVI <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>

ANEXO 1. Historia Clínica

	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	Mes de toma de muestra
1	INdRE	671	1104	M	ENASO	/	24/12/2009	26/12/2009	IRAG	Diciembre
2	INdRE	1032	12	F	EFAR	/	01/02/2010	08/02/2010	PVR	Febrero
3	INdRE	1040	516	F	EFAR	DF	21/01/2011	26/01/2011	ETI	Enero
4	INdRE	1062	9	M	SOB	JALISCO	15/01/2011	17/01/2011	ETI	Enero
5	INdRE	1098	0	M	EFAR	DF	23/01/2011	31/01/2011	IRAG	Enero
6	INdRE	1099	5	M	ENASO	/	20/01/2010	25/01/2010	IRAG	Enero
7	UASLP	1162	10	M	/	SLP	/	30/08/2004	NEUMONIA	Agosto
8	INdRE	1189	48	M	EFAR	DF	01/02/2011	02/02/2011	INFLUENZA	Febrero
9	UASLP	1202	1	M	/	SLP	/	08/10/2004	NEUMONIA	Octubre
10	INdRE	1207	228	F	EFAR	/	07/02/2010	09/02/2010	IRAG	Febrero
11	UASLP	1222	9	M	/	SLP	/	21/10/2004	NEUMONIA	Octubre
12	INdRE	1255	8	M	EFAR	DF	31/01/2011	08/02/2011	IRAG	Enero
13	INdRE	1282	5	M	SOB	DF	07/02/2011	09/02/2011	IRAG	Febrero
14	INdRE	1293	324	M	SOB	NUEVO LEÓN	26/01/2011	28/01/2011	ETI	Enero
15	INdRE	1298	804	F	SOB	NUEVO LEÓN	02/02/2011	03/02/2011	ETI	Febrero
16	INdRE	1325	2	M	EFAR	/	03/01/2010	07/01/2010	ETI	Enero
17	INdRE	1326	5	M	ENASO	/	04/01/2010	08/01/2010	ETI	Enero
18	INdRE	1333	3	M	EFAR	/	13/01/2010	18/01/2010	IRAG	Enero
19	INdRE	1335	24	F	SOB	TABASCO	25/01/2011	27/01/2011	ETI	Enero
20	INdRE	1335	36	M	EFAR	/	17/01/2010	18/01/2010	IRAG	Enero
21	UASLP	1344	5	M	/	SLP	/	11/12/2004	NEUMONIA	Diciembre
22	UASLP	1348	5	M	/	SLP	/	14/12/2004	NEUMONIA	Diciembre
23	INdRE	1375	24	M	EFAR	MICHACÁN	02/02/2011	04/02/2011	DX PANEL	Febrero
24	INdRE	1377	2	M	EFAR	MICHACÁN	02/02/2011	08/02/2011	DX PANEL	Febrero
25	INdRE	1378	5	M	EFAR	MICHACÁN	08/02/2011	11/02/2011	DX PANEL	Febrero
26	INdRE	1418	696	M	SOB	NUEVO LEÓN	04/02/2011	06/02/2011	ETI	Febrero
27	INdRE	1426	888	M	EFAR	QUERETARO	07/02/2011	10/02/2011	ETI	Febrero
28	INdRE	1432	10	F	EFAR	/	01/02/2010	02/02/2010	ETI	Febrero
29	INdRE	1440	8	M	SOB	JALISCO	07/02/2011	07/02/2011	IRAG	Febrero
30	INdRE	1452	11	F	SOB	JALISCO	12/02/2011	15/02/2011	ETI	Febrero
31	INdRE	1537	264	M	EFAR	EDO. MEX	22/02/2011	23/02/2011	Influenza	Febrero

32	INdRE	1586	0	M	SOB	GUERRERO	21/02/2011	24/02/2011	DX PANEL	Febrero
33	INdRE	1589	1	F	EFAR	/	20/02/2010	22/02/2010	ETI	Febrero
34	INdRE	1661	10	F	EFAR	/	07/02/2010	10/02/2010	ETI	Febrero
35	INdRE	1690	17	M	EFAR	GUERRERO	21/02/2011	03/03/2011	DX PANEL	Febrero
36	INdRE	1693	3	M	EFAR	GUERRERO	25/02/2011	04/03/2011	DX PANEL	Febrero
37	INdRE	1773	24	F	SOB	GUERRERO	22/02/2011	24/02/2011	DX PANEL	Febrero
38	INdRE	1874	2	F	SOB	GUERRERO	01/03/2011	10/03/2011	DX PANEL	Marzo
39	INdRE	1883	288	F	EFAR	DF	17/03/2011	22/03/2011	Influenza	Marzo
40	INdRE	1894	12	F	SOB	GUERRERO	15/02/2011	15/03/2011	IRAG	Febrero
41	INdRE	1905	132	F	ENASO	/	16/02/2010	19/02/2010	ETI	Febrero
42	INdRE	1917	984	F	SOB	QUERETARO	10/03/2011	13/03/2011	Influenza	Marzo
43	INdRE	1918	744	F	SOB	QUERETARO	05/03/2011	11/03/2011	Influenza	Marzo
44	INdRE	1930	24	M	SOB	GUERRERO	13/03/2011	14/03/2011	DX PANEL	Marzo
45	INdRE	2017	24	M	SOB	GUERRERO	16/03/2011	17/03/2011	ETI	Marzo
46	INdRE	2023	36	M	SOB	GUERRERO	21/03/2011	24/03/2011	IRAG	Marzo
47	INdRE	2129	720	F	SOB	GUERRERO	20/03/2011	24/03/2011	ETI	Marzo
48	INdRE	2168	3	M	SOB	CHIHUAHUA	28/03/2011	31/03/2011	IRAG	Marzo
49	INdRE	2187	12	F	EFAR	/	23/02/2010	26/02/2010	ETI	Febrero
50	INdRE	2191	192	F	SOB	CHIHUAHUA	28/03/2011	01/04/2011	ETI	Marzo
51	INdRE	2225	12	M	SOB	GUERRERO	29/03/2011	31/03/2011	DX PANEL	Marzo
52	INdRE	2242	12	M	EFAR	DF	03/04/2011	04/04/2011	ETI	Abril
53	INdRE	2270	12	M	ENASO	DF	05/04/2011	07/04/2011	IRAG	Abril
54	INdRE	2340	12	M	SOB	CHIHUAHUA	31/03/2011	01/04/2011	Influenza	Marzo
55	INdRE	2348	8	M	SOB	CHIHUAHUA	30/03/2011	02/04/2011	IRAG	Marzo
56	INdRE	2371	12	M	SOB	CHIHUAHUA	31/03/2011	04/04/2011	INFLUENZA	Marzo
57	INdRE	2431	12	M	EFAR	/	07/03/2010	14/03/2010	ETI	Marzo
58	INdRE	2436	48	F	EFAR	DF	12/04/2011	12/04/2011	Influenza	Abril
59	INdRE	2453	288	F	SOB	DF	05/04/2011	07/04/2011	ETI	Abril
60	INdRE	2508	48	F	SOB	CHIHUAHUA	09/04/2011	11/04/2011	Influenza	Abril
61	INdRE	2522	996	M	SOB	CHIHUAHUA	09/04/2011	13/04/2011	ETI	Abril
62	INdRE	2523	11	M	SOB	CHIHUAHUA	10/04/2011	13/04/2011	Influenza	Abril
63	INdRE	2524	36	F	SOB	CHIHUAHUA	09/04/2011	14/04/2011	Influenza	Abril
64	INdRE	2652	1	M	EFAR	/	23/03/2010	26/03/2010	IRAG	Marzo
65	INdRE	2719	8	M	SOB	CHIHUAHUA	15/04/2011	18/04/2011	Influenza	Abril
66	UASLP	3101	/	M	/	SLP	/	12/11/2006	BRONQUIOLITIS	Noviembre
67	UASLP	3102	/	M	/	SLP	/	11/11/2006	BRONQUIOLITIS	Noviembre
68	UASLP	3112	/	M	/	SLP	/	13/11/2006	BRONQUIOLITIS	Noviembre
69	UASLP	3114	/	F	/	SLP	/	14/11/2006	BRONQUIOLITIS	Noviembre

70	UASLP	3115	/	F	/	SLP	/	14/11/2006	BRONQUIOLITIS	Noviembre
71	UASLP	3152	/	M	/	SLP	/	21/11/2006	BRONQUIOLITIS	Noviembre
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	/	/	/	/
92	UASLP	3699	/	/	/	SLP	/	/	/	/
93	UASLP	3705	/	/	/	SLP	/	/	/	/
94	UASLP	3721	/	/	/	SLP	/	/	/	/
95	UASLP	3734	/	/	/	SLP	/	/	/	/
96	UASLP	3749	/	/	/	SLP	/	/	/	/
97	UASLP	3763	/	/	/	SLP	/	/	/	/
97	INdRE	3973	12	F	EFAR	/	29/09/2008	30/09/2008	INFLUENZA	Septiembre
98	INdRE	4102	60	F	EFAR	/	10/07/2008	10/08/2008	INFLUENZA	Julio
99	INdRE	4112	96	M	EFAR	/	10/06/2008	10/09/2008	INFLUENZA	Junio
100	INdRE	4130	11	M	EFAR	/	10/10/2008	13/10/2008	INFLUENZA	Octubre
101	INdRE	4208	36	F	EFAR	/	10/10/2008	13/10/2008	INFLUENZA	Octubre
102	INdRE	4310	36	F	EFAR	/	14/10/2008	16/10/2008	INFLUENZA	Octubre
103	INdRE	4355	288	F	EFAR	/	19/10/2008	20/10/2008	INFLUENZA	Octubre
104	INdRE	4406	24	M	EFAR	/	20/10/2008	22/10/2008	INFLUENZA	Octubre
105	INdRE	4468	24	M	EFAR	/	18/10/2008	20/10/2008	INFLUENZA	Octubre
106	INdRE	4510	36	M	EFAR	/	22/10/2008	24/10/2008	INFLUENZA	Octubre

107	INdRE	4514	24	F	EFAR	/	26/10/2008	28/10/2008	INFLUENZA	Octubre
108	INdRE	4520	36	F	EFAR	/	18/10/2008	22/10/2008	INFLUENZA	Octubre
109	INdRE	4593	1	F	EFAR	/	26/10/2008	29/10/2008	INFLUENZA	Octubre
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	/	/	/	/
123	UASLP	5651	/	/	/	SLP	/	/	/	/
124	HRALM	UP-044	2 AÑOS	M	/	/	28/04/2013	/	/	Abril
125	HRALM	UP-051	1 AÑO	F	/	/	28/04/2013	/	/	Abril
126	HRALM	UP-061	8 AÑOS	F	/	/	3/05/20013	/	/	Mayo
127	HRALM	UP-012	1 AÑO	M	/	/	6/05/13	/	/	Mayo
128	HRALM	UP-1305	1 AÑO	M	/	/	17/05/2013	/	/	Mayo
129	HRALM	UP-071	3 AÑOS	M	/	/	22/05/2013	/	/	Mayo
130	HRALM	UP-062	3 AÑOS	F	/	/	23/05/2013	/	/	Mayo
131	HRALM	UP-312			/	/	31/05/2013	/	/	Mayo
132	HRALM	UP-030	3 AÑOS	F	/	/	03/06/2013	/	/	Mayo
133	HRALM	UP-025	6 AÑOS	M	/	/	03/06/2013	/	/	Junio
134	HRALM	UP-011	2 AÑOS	M	/	/	04/06/2013	/	/	Junio
135	HRALM	UP-018	1 AÑOS	F	/	/	04/06/2013	/	/	Junio
136	INdRE	0,003	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
137	INdRE	0,005	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
138	INdRE	928	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
139	INdRE	1686	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
140	INdRE	2225	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
141	INdRE	0,70	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
142	INdRE	0,90	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
143	INdRE	0,92	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
144	INdRE	145	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero

145	INdRE	1115	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
146	INdRE	1137	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
147	INdRE	1576	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
148	INdRE	1635	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
149	INdRE	1724	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
150	INdRE	1772	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
151	INdRE	1798	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
152	INdRE	1904	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
153	INdRE	1937	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
154	INdRE	1961	/	/	/	/	28/01/2013	/	/	Enero
155	HRALM	611	/	/	/	/	/	/	/	/
156	HRALM	1044	/	/	/	/	/	/	/	/
157	HRALM	1232	/	/	/	/	/	/	/	/
158	HRALM	1904	/	/	/	/	/	/	/	/
159	HRALM	2632	/	/	/	/	/	/	/	/
160	HRALM	3109	/	/	/	/	/	/	/	/
161	HRALM	3122	/	/	/	/	/	/	/	/
162	HRALM	4108	/	/	/	/	/	/	/	/
163	HRALM	4516	/	/	/	/	/	/	/	/
164	HRALM	617	14AÑOS	F	/	/	/	/	/	/
165	HRALM	208	/	/	/	/	/	/	/	/
166	HRALM	308	/	/	/	/	/	/	/	/
167	HRALM	408	/	/	/	/	/	/	/	/
168	HRALM	508	/	/	/	/	/	/	/	/
169	HRALM	806	/	/	/	/	/	/	/	/
170	HRALM	807	/	/	/	/	/	/	/	/
171	HRALM	808	/	/	/	/	/	/	/	/
172	HRALM	908	/	/	/	/	/	/	/	/
173	HRALM	1008	/	/	/	/	/	/	/	/
174	HRALM	109	/	/	/	/	/	/	/	/
175	HRALM	UP-052AI	2 AÑOS	F	EXUDADO	DF	01/02/2014	/	RINOFARINGITIS, CONJUNTIVITIS	Febrero
176	HRALM	UP-060QR	6 AÑOS	M	EXUDADO	DF	01/02/2014	/	RINOGARINGITIS, CONJUNTIVITIS	Febrero
177	HRALM	UP-012PP	/	/	/	/	/	/	/	/
178	HRALM	UP-013MR	2 AÑOS	F	EXUDADO	DF	01/02/2014	/	RINOFARINGITIS	Febrero
179	HRALM	UP-014EG	28-365 DIAS	M	EXUDADO	DF	11/01/2014	/	FARINGITIS, SX FEBRIL	Enero
180	HRALM	LM-O56	28-365 DIAS	F	EXUDADO	DF	13/02/2014	/	RINOFARINGITIS, BRONCOESPASMO	Febrero
181	HRALM	UP-023MP	11 AÑOS	F	EXUDADO	DF	11/01/2014	/	CEFALEA SECUNDARIA A SINUSITIS, RINOFARINGITIS	Enero

182	HRALM	UP-037SM	1 AÑO	M	EXUDADO	DF	11/01/2014	/	ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA SIN DESHIDRATACION	Enero
183	HRALM	UP-501GG	5 AÑOS	M	EXUDADO	/	11/01/2014	/		Enero
184	HRALM	UP-0311RH	3 AÑOS	M	EXUDADO	DF	09/11/2013	/	RINOFARINGITIS	Noviembre
185	HRALM	UP-0211PG	11 meses	F	EXUDADO	DF	09/11/2013	/	FARINGITIS	Noviembre
186	HRALM	LM-057	2 AÑOS	M	EXUDADO	DF	13/02/2014	/	RINOFARINGITIS	Febrero
187	HRALM	LM-058	/	/	/	DF	/	/	/	/
188	HRALM	UP-071JB	5 AÑOS	M	EXUDADO	DF	01/02/2014	/	RINOFARINGITIS	Febrero
189	HRALM	UP-017OM	3 meses	F	EXUDADO	DF	01/02/2014	/	RINOFARINGITIS	Febrero
190	HRALM	UP-068AT	3 AÑOS	M	EXUDADO	DF	01/02/2014	/	RINOFARINGITIS	Febrero
191	HRALM	LM-059	/	/	/	/	/	/	/	/
192	HRALM	UP-057FP	4 AÑOS	M	EXUDADO	DF	01/02/2014	/	RINOFARINGITIS, CONJUNTIVITIS	Febrero
193	HRALM	UP-9023	1 AÑO	F	EXUDADO	DF	/	/	RINOFARINGITIS	/
194	HRALM	UP-9027	5 AÑOS	F	EXUDADO	DF	19/05/2013	/	RINOFARINGITIS	Mayo
195	HRALM	UP-209	6 AÑOS	M	EXUDADO	DF	09/09/2013	/	LARINGOTRAQUEITIS FORBES 1	Septiembre
196	HRALM	UP-309	6 MESES	F	EXUDADO	DF	10/09/2013	/	RINOFARINGITIS	Septiembre
197	HRALM	UP-409	1 AÑO	M	EXUDADO	DF	10/09/2013	/	RINOFARINGITIS	Septiembre
198	HRALM	UP-509	7 MESES	M	EXUDADO	DF	10/09/2013	/	RINOFARINGITIS	Septiembre
199	HRALM	UP-609	1 MES	F	EXUDADO	DF	10/09/2013	/	RINOFARINGITIS	Septiembre
200	/	057-FP	/	/	/	/	/	/	/	/

Anexo 2. Relación de muestras con resultados de RT-PCR.

No. De Muestra	hRSV (F 193pb)	hMPV (L 447pb)	hMPV (N 599pb)	hRSV- A (GA549pb)	hRSV-B (GB 106pb)	PIV-2 (279pb)
671	Positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
1032	Positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
1040	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	positivas
1062	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo
1098	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
1099	Positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
1162	Positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
1189	Positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo

1202	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
1207	Positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
1222	negativo	Positivo	Positivo	positivo	negativo	negativo
1255	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
1282	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo
1293	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
1298	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positiva
1325	Positivo	negativo	negativo	Positivo	negativo	negativo
1326	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
1333	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
1335	Positivo	negativo	Positivo	positivo	negativo	negativo
1344	Positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
1348	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
1375	Positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivas
1377	negativo	negativo	Positivo	negativo	positivo	negativo
1378	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo
1418	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
1426	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
1432	Positivo	negativo	negativo	Positivo	negativo	negativo
1440	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
1452	Positivo	negativo	positivo	positivo	positivo	negativo
1537	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
1586	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
1589	Positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
1661	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
1690	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo
1693	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo
1773	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo
1874	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
1883	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo
1894	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo

1905	<i>negativo</i>	<i>negativo</i>	<i>negativo</i>	<i>positivo</i>	<i>negativo</i>	<i>positiva</i>
1917	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo
1918	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo
1930	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo
2017	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
2023	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
2129	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
2168	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
2187	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
2191	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo
2225	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
2242	Positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo	negativo
2270	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
2340	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo
2348	negativo	negativo	Positivo	negativo	positivo	Negativo
2371	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
2431	Positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
2436	negativo	Positivo	positivo	negativo	negativo	Negativo
2453	negativo	Positivo	positivo	negativo	negativo	Negativo
2508	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
2522	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
2523	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
2524	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
2652	Positivo	negativo	negativo	Positivo	negativo	Negativo
2719	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3101	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3102	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
3112	Positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
3114	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
3115	Positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
3152	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo

3491	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
3496	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Positiva
3497	Positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo	Negativo
3503	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
3510	negativo	Positivo	positivo	negativo	negativo	Negativo
3511	Positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	Negativo
3611	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3612	Positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	Negativo
3614	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3618	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3619	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3629	Positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	Negativo
3637	positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo	Negativo
3651	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3652	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
3699/3 659	Positivo	negativo	Positivo	positivo	negativo	Negativo
3670	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
3671	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
3674	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
3679	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
3696	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3705	Positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo	Negativo
3721	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
3734	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3749	Positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo	Negativo
3763	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
3973	Positivo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
4102	Positivo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
4112	Positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
4130	Positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo

4208	Positivo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
4310	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
4355	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
4406	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
4468	Positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
4510	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
4514	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
4520	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
4593	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
4969	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
5084	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
5153	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Positiva
5162	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
5243	negativo	Positivo	positivo	negativo	negativo	Negativo
5281	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
5524	negativo	Positivo	positivo	negativo	negativo	Negativo
5614	Positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo	Negativo
5615	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
5622	Positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	Negativo
5630	negativo	Positivo	positivo	negativo	negativo	Negativo
5637	Positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	Positiva
5643	Positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	Negativo
5651/5661	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
0,11	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	Negativo
0,12	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	Negativo
0,18	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	Negativo
0,25	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
0,30	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
0,44	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo
0,51	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo	Negativo

0,61	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo	Positiva
0,62	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
0,71	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Positiva
0,25	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
312	positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo	Positiva
1305	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
9023	negativo	positivo	Positivo	negativo	negativo	Positiva
9027	positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo	Positiva
617	Positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	Negativo
208	negativo	positivo	Positivo	negativo	negativo	Positiva
308	positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo	Negativo
408	Positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo	Negativo
508	Positivo	negativo	Positivo	negativo	positivo	Negativo
806	Positivo	negativo	positivo	positivo	negativo	Negativo
807	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
808	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
908	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
1008	Positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	Negativo
109	Positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	positiva
209	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
309	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
409	Positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	Negativo
509	Positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	Negativo
609	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
0,003	negativo	Positivo	Positivo	negativo	negativo	Negativo
0,005	negativo	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
928	negativo	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1686	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
2225	negativo	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
0,70	negativo	Positivo	negativo	negativo	positivo	Negativo
0,90	negativo	Positivo	positivo	negativo	positivo	Negativo

0,92	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
145	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
1115	negativo	Positivo	negativo	positivo	negativo	Negativo
1137	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1576	Positivo	negativo	Positivo	positivo	negativo	Negativo
1635	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
1724	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1772	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
1798	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
1904	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1937	Positivo	Positivo	Positivo	negativo	positivo	Negativo
1961	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
611	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
1044	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	Negativo
1232	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
1904	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
2632	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3109	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
3122	postivo	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
4108	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
4516	Positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
052-AI	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
060-QQ	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
012-PP	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
013-MR	Positivo	<u>Positivo</u>	negativo	negativo	negativo	Negativo
014-EG	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo	negativo
056-LM	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo	Negativo

023-PM	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
037-JM	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
501-GG	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
311	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
211	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
057-LM	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
058-LM	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo
071-JB	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
017-OM	negativo	negativo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
068-AT	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
059-LM	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo	Negativo
057-FP	Positivo	negativo	negativo	negativo	Positivo	negativo