



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

*“DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE VIRUS  
SINCITIAL RESPIRATORIO HUMANO (HRSV) EN  
MUESTRAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON  
INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA”*

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Q.F.B. SERGIO PAULO ALPUCHE LAZCANO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ROCÍO GABRIELA TIRADO MENDOZA

COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDIVAR  
DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de abril de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **ALPUCHE LAZCANO SERGIO PAULO** con número de cuenta 510020802, con la tesis titulada **"DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO HUMANO (HRSV) EN MUESTRAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA"**, realizada bajo la dirección de: **DRA. ROCÍO TIRADO MENDOZA:**

Presidente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA  
Vocal: DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ  
Secretario: DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA  
Suplente: DRA. MIRZA GABRIELA ROMERO VALDUCINOS  
Suplente: DRA. PATRICIA TATO ZALDIVAR

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 04 de junio de 2012

*María del Coro Arizmendi*  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA**

## **AGRADECIMIENTOS**

- ❖ Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por darme la oportunidad de realizar el posgrado y por siempre darme su apoyo.
  
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico recibido como becario de maestría.
  
- ❖ A la Dra. Rocío Gabriela Tirado Mendoza, por ser mi tutora y amiga. Por su apoyo total y por dejarme formar parte de su equipo de trabajo.
  
- ❖ A la Dra. Patricia Margarita Tato Zaldivar, por formar parte de mi comité tutor y por siempre estar a mi lado.
  
- ❖ A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, por formar parte de mi comité tutor y por siempre enseñarme algo nuevo.

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

- ❖ Al Dr. Daniel Ernesto Noyola Cherpitel. Investigador de la Universidad de San Luis Potosí, México. Por la donación de muestras clínicas para este trabajo.
- ❖ A la Dra. Irma López Martínez. Jefa del Departamento de Virología, INDRE. Por la donación de muestras clínicas para este trabajo.
- ❖ A la Dra. Lilian Hernández Mendoza, Prof. Asoc. C. de T.C. Por su apoyo académico en la realización de esta tesis.
- ❖ Al Dr. Javier Ambrosio Hernández, Prof. Titular B. de T.C. Por su apoyo en el uso de sus instalaciones de laboratorio.
- ❖ A la Dra. Francisca Hernández Hernández, Prof. Titular B. de T.C. Por su apoyo académico y uso del termociclador.
- ❖ A la Dra. Ana María Cevallos Gaos. Investigador Titular A. de T.C. Por su apoyo y asistencia en el diseño de cebadores.
- ❖ A la Biol. Olivia Reynoso Ducoing. Tec. Acad. Titular A. de T.C. Por el apoyo en el manejo de equipo para líneas celulares.
- ❖ A la Q.F.B. Erika Córdova Martínez. Tec. Acad. Asoc. B. de T.C. Por el apoyo en el manejo del termociclador.
- ❖ Al M en C. Carlos Santiago Olivares. Tec. Acad. Asoc. C. Por la asistencia en los resultados de citometría de flujo.
- ❖ A la Lic. América Inuerreta González, Asistente de traducción, Facultad de Medicina, UNAM. Por su ayuda en textos en Ingles
- ❖ Al Lic. Ademar Alpuche Lazcano. Por su ayuda en ayuda en textos en Ingles.
- ❖ Al Biol. Jorge Gaona Bernal por la asistencia del uso de equipo de citometría de flujo.
- ❖ Al Q.F.B Ernesto Guerrero Sánchez, por su asistencia en el diseño de cebadores.

## **DEDICATORIAS**

### ⊖ ***A Dios y a mis padres.***

Mamá muchas gracias por el apoyo y cariño que siempre recibo de ti. Siempre incondicional ante cualquier cosa y este proceso no fue la excepción.

Papá muchas gracias por tu apoyo y cariño. Siempre estas para darme ánimo y decirme una palabra que me motiva a ser mejor cada día.

- ⊖ A Gieraldin Campos, mi novia, gracias porque siempre has estado para apoyarme, gracias por compartir tu cariño y amor.
- ⊖ A mi hermano Ademar Alpuche, gracias por tenderme la mano en lo que necesito. Gracias por esas miles de dudas resueltas en inglés.
- ⊖ A la Dra. Rocío Gabriela Tirado Mendoza, muchas gracias por compartir este proyecto y ser mi amiga, espero que esta amistad dure muchos años.
- ⊖ A la Dra. Lilian Hernández Mendoza, muchas gracias por ser mi amiga, ayudarme siempre en lo que necesité, no hay palabras suficientes para agradecerle.
- ⊖ A mis amigos José Villegas, Jairo Campos y Carlos Olivares, siempre me inspiran a hacer algo mejor y siempre están cuando los necesito.
- ⊖ A mi mejor amigo de esta vida y de la otra Ody, que aunque sé que no estas con migo en cuerpo sé que siempre me acompañas en espíritu.
- ⊖ A la Dra. Ana María Fernández, a la Dra. Lilia Roberts, la M en C Laura Aguilar, a la Dra. Rima, a todos mis compañeros que están y ya no están en el laboratorio a Jesús, Jessica, Hayde, Rodrigo, Grace, José, Fernando, Suri, Karla, Bety, Guadalupe, Chelo, Elsa... Muchas gracias siempre hicieron que esta estancia fuese agradable.

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>I. Antecedentes</b>	<b>5</b>
<b>I.i. Características generales del hRSV</b>	<b>5</b>
<b>I.ii. Proteínas Virales</b>	<b>7</b>
<b>I.iii. Ciclo replicativo</b>	<b>10</b>
<b>I.iv. Respuesta inmune ante hRSV</b>	<b>15</b>
<b>I.iv.i Inmunidad innata</b>	<b>16</b>
<b>I.iv.ii Inmunidad Adquirida</b>	<b>21</b>
<b>II. Importancia de las infecciones respiratorias agudas (IRA)</b>	<b>24</b>
<b>III. Importancia del hRSV a nivel mundial</b>	<b>24</b>
<b>IV. Importancia del hRSV en México</b>	<b>27</b>
<b>V. Vacunas y tratamientos</b>	<b>29</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>32</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>33</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
<b>7. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>66</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>70</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>71</b>
<b>10. ANEXO</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO-I-A</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO-I-B</b>	<b>80</b>

## RESUMEN

El **virus sincitial respiratorio humano (hRSV)** es reconocido a nivel mundial como el agente etiológico más importante de enfermedades respiratorias agudas en niños menores de dos años; causando cuadros respiratorios desde leves hasta enfermedades respiratorias graves. Además, constituye un factor de riesgo para personas de la tercera edad e inmunosuprimidas. El hRSV se ha clasificado con base en la variación de la secuencia del gen que codifica para la glicoproteína G en dos subgrupos: A y B. Hasta el momento, no se ha establecido de manera contundente una relación entre la gravedad de la enfermedad y alguno de los subgrupos virales. Reportes de epidemiología molecular indican diferentes patrones de circulación para los subgrupos virales. En México las infecciones respiratorias agudas son la primera causa de morbimortalidad en niños menores de cinco años. Sin embargo, en México no existen datos de los patrones de circulación de los diferentes subgrupos virales de hRSV por temporada y tampoco contamos con métodos diagnósticos rápidos, específicos y costeables. En este estudio se propuso determinar la incidencia de los subgrupos virales y asociarlos con la gravedad de la enfermedad y grupo de edad. Métodos. A partir de muestras clínicas de pacientes pediátricos con cuadro respiratorio agudo, se llevó a cabo el aislamiento viral de hRSV en la línea celular de carcinoma de laringe humano. Los aislados virales se tipificaron por ensayos de inmunofluorescencia (IF) directa e indirecta y se genotipificaron por RT-PCR. Resultados: el 73% de las muestras

son positivas por IF. Los resultados de la genotipificación indican que el 95 % de muestras analizadas son positivas para el hRSV, donde el 79.5% fue subgrupo A, de acuerdo con el resultado de amplificación del gen G del hRSV.

## ABSTRACT

The **human respiratory syncytial virus (hRSV)** is worldwide known as the most important etiologic agent for acute respiratory diseases in children under two; it causes both, moderate and severe respiratory episodes. Furthermore, it is important to point out that it constitutes a risk for the elderly and immunosuppressed patients. The hRSV has been classified based on the variations in the gene sequence codifying for the glycoprotein G into two subgroups: A and B. So far, no convincing relation between the seriousness of the disease and any of the viral subgroups has been established. Reports from molecular epidemiology indicate different circulation patterns for the viral subgroups. In México, acute respiratory infections are the leading cause of morbidity and mortality in children under five years. Nevertheless, in México, there are no data on circulation patterns for the different hRSV seasonal viral subgroups; neither do we count on swift, specific, nor affordable diagnosis methods. In this research, we determine the viral subgroups incidence, and to associate them with the seriousness of the disease and the age group. Methods. Starting from clinical samples coming from pediatric patients suffering acute respiratory symptoms, we carried out a hRSV viral isolation within the human larynx carcinoma cell line. The viral isolations were established by direct and indirect immunofluorescence (IF) tests and later genotyped by RT-PCR. Results. 73% of the samples are positive by if the genotyping results indicate that 95% of the analyzed samples are positive for

the hRSV; 79.5% turned out to be a subtype, according to amplification result from the hRSV G gene.

# 1. INTRODUCCIÓN

## I. Antecedentes

### I.i. Características generales del hRSV

El Virus Sincitíal Respiratorio humano (hRSV por sus siglas en inglés human Respiratory Syncytial Virus) se encuentra clasificado de acuerdo al ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), en el orden de los *Mononegavirales*, de la familia *Paramyxoviridae* y de la subfamilia de los *Pneumovirinae*. La subfamilia *Pneumovirinae* tiene dos géneros: los *Pneumovirus* y los *Metapneumovirus*. Dentro de los *Pneumovirus* se incluyen al hRSV, al virus sincitíal respiratorio bovino (bRSV) y al virus de neumonía de ratón (PVM) [1]. Los viriones de hRSV están constituidos por una nucleocápside helicoidal y una bicapa lipídica que adquieren de la membrana citoplásmica de la célula hospedera.

Son virus pleomórficos de 100 a 350 nm de diámetro (Figura 1).

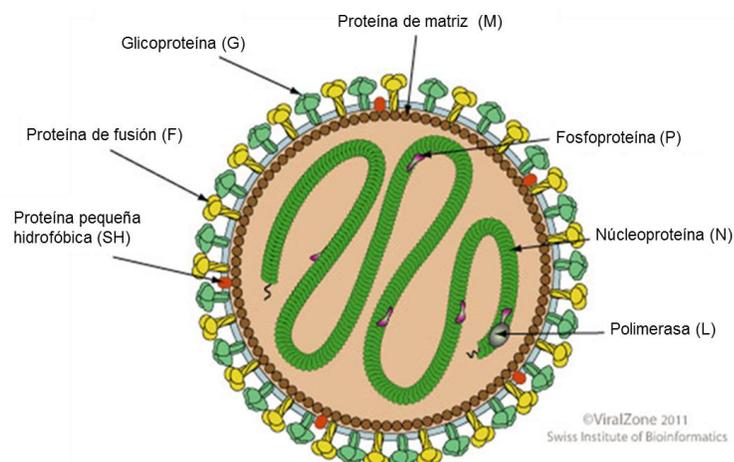


Figura 1. Esquema representativo del hRSV (I). Se muestran sus diferentes estructuras del virión.

Tienen un genoma conformado por una sola hebra de RNA no segmentado de polaridad negativa (Figura 2).

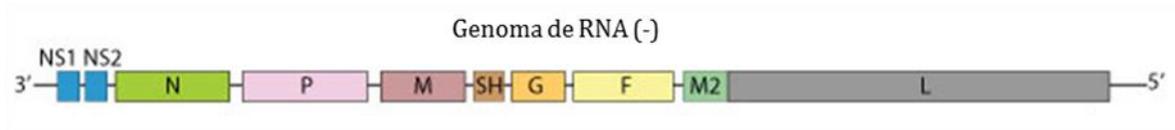


Figura 2. (I). Mapa genómico (15.2 kb) de hRSV. Con orientación de 3'-5' (en sentido negativo), contiene 10 genes. NS1 y NS2 son genes de proteínas no estructurales; N, gen de la nucleoproteína; gen P codifica para la fosfoproteína; gen M codifica para la proteína de matriz; gen SH codifica para la proteína pequeña hidrofóbica; gen G para la proteína de anclaje; gen F codifica para la proteína de fusión; gen M2 presenta dos marcos de lectura abierto (ORF) M2-1 y M2-2 (no se muestran). El gen L codifica para la proteína de mayor tamaño en el complejo de polimerasa. Los genes M2 y L en hRSV se sobreponen en el nucleótido 68. [1].

El RNA genómico del hRSV mide aproximadamente 15.2 Kb. Como miembro del orden de los *Mononegavirales*, la replicación implica la síntesis de una copia complementaria exacta de polaridad positiva o antigenoma, ambas hebras de RNA conservan una fuerte interacción con la proteína N (nucleoproteína). El hRSV codifica para mRNA monocistrónicos virales a los que se les adiciona un cap (7mG/7 metilguanina) en el extremo 5' y se poliadenilan en el extremo 3'. Cada gen presenta un marco de lectura abierto (ORF), excepto M2, el cual tiene un solapamiento con M2-1 (nt 10-594 en cepas A2-con194 aa y en caso de hRSV B cepa 18537 del 10-597-con 195 aa) y M2-2 (nt 563-835 en cepas A2 con 90 aa y en caso de hRSV B cepa 18537 del 554-835 con 95 aa) [2]. El genoma de hRSV codifica para 11 proteínas, 9 de ellas estructurales (N, P, L, G, F, SH, M, M2-1, M2-2) y 2 no estructurales (NS1, NS2).

## I.ii Proteínas Virales

- Nucleoproteína (N)** Es la proteína de la nucleocápside, y forma parte del complejo ribonucleoproteico, N, está unida a lo largo del RNA genómico y del antígeno (intermediario replicativo). La interacción N-RNA confiere protección al genoma viral de la acción de RNasas celulares durante la transcripción y replicación del genoma viral.
- Fosfoproteína (P)** La proteína P, forma parte del complejo de polimerasa, además forma un complejo con la proteína N de forma libre, el cual mantiene a N en forma soluble, disponible en el momento del ensamble del virión.
- Polimerasa viral dependiente de RNA (L)** La proteína L es la proteína de mayor tamaño en el complejo de polimerasa, tiene seis segmentos discretos (subsegmentos dentro de la misma proteína) que contienen residuos conservados,
- Proteína de unión (G)** Es una glicoproteína transmembranal tipo III. Es la proteína de anclaje, por el extremo amino terminal se localiza la región hidrofóbica que interactúa con otras proteínas virales como M, esta región se localiza por la cara citoplasmica, mientras que la región carboxilo terminal se queda orientada hacia la parte externa, comprometiendo dos tercios de la proteína. En el proceso de unión virus-célula, participa el dominio de unión a heparan sulfato. Además de este dominio, la proteína G presenta una región central no glicosilada rica en cisteínas, cuya característica principal es su analogía con la quimiocina CX3C (fractalcina), lo que

permite la unión de la proteína viral con el receptor CX3CR1. Recientemente se han descrito otras dos moléculas como posibles receptores la L-selectina y anexina II.

**Proteína de fusión (F)** Es una glicoproteína de tipo I que está embebida en la envoltura lipídica del virus, regula la entrada del virus a la célula blanco por fusión entre la envoltura del virión y la membrana celular del hospedero. La proteína F es expresada en la superficie celular y puede mediar la fusión entre células vecinas produciendo sincitios. La proteína F es sintetizada en forma inactiva como  $F_0$ , que es un precursor que se ensambla en forma de homotrímero y es activado por acción de las endoproteasas en la cara trans- del aparato de Golgi, formando dos regiones, una en el extremo carboxilo (F1) y otra por la parte amino (F2). La fracción F1 contiene el péptido de fusión que es el que inicia la fusión entre envoltura y membrana. La subunidad F1 también contiene dominios heptarepetidos que se asocian durante la fusión.

**Proteína pequeña hidrofóbica (SH)** Es una pequeña proteína integral de membrana con características hidrofóbicas, está anclada por el extremo amino; y el extremo carboxilo está orientado hacia la parte extracelular. Intracelularmente, SH se acumula en múltiples formas  $SH_0$ ,  $SH_g$ ,  $SH_p$ ,  $SH_t$ . Su función real aun es desconocida, al parecer no está asociada a la morfogénesis de partículas virales. Aunque se ha podido demostrar que la SH, participa en la

inhibición de la apoptosis, interfiriendo en la función de TNF- $\alpha$ .

Proteína de matriz (M) Es una proteína no glicosilada del componente interno del virión, la proteína M se acumula en la membrana plasmática del hospedero e interactúa con F, G, SH y el complejo ribonucleoproteico (RNP). Durante la morfogénesis, es esencial para la formación de partículas parecidas a virus (VLP por sus siglas en inglés, virus like particles). Recientemente se ha señalado su participación en la regulación de la expresión de genes celulares.

Proteína M2-1 Inicialmente se creía que era una segunda forma de la proteína M y posteriormente se descubrió que es un factor esencial para la viabilidad e infectividad viral, por ello promueve la progresión de la transcripción viral. En ausencia de esta proteína, la polimerasa viral termina el transcrito prematuramente. Esta proteína presenta motivos con dedos de zinc cerca del amino terminal, que son esenciales para su actividad.

Proteína M2-2 Es una proteína pequeña que se expresa intracelularmente en niveles muy bajos. Se ha sugerido que M2-2 participa en la regulación de transcripción RNA (+) a replicación del RNA (-).

Proteínas no estructurales NS1 y NS2. NS1 y NS2 contienen 139 y 124 aminoácidos respectivamente, participan como antagonistas inhibiendo la inducción de interferón (IFN- $\alpha/\beta$ ) alterando la señalización de los receptores (IFNAR).

El hRSV se ha clasificado en dos grupos A y B con base en la variación de la secuencia del gen que codifica para la glicoproteína G por dos razones, 1) La proteína ha mostrado una similitud en los nucleótidos del 67% y el 53% de similitud a nivel de aminoácidos entre el subgrupo A y el B. 2) La proteína-G es uno de los objetivos de la respuesta protectora por anticuerpos (Ac) neutralizantes, sugiriendo que la evolución de los dos grupos de hRSV, está bajo presión inmune selectiva en ciertos codones [3].

En el caso del subgrupo A se han descrito 7 genotipos (GA1-7) y para el subgrupo B, cuatro (GB1-4).

### **I.iii. Ciclo replicativo**

La infección eficiente *in vitro* en líneas celulares por el hRSV, requiere de varios pasos; primero la unión al receptor el cual implica a los glicosaminoglicanos (GAGs) celulares, específicamente heparan sulfato y sulfato de condroitina B. Las proteínas G y F parecen mediar esta unión a GAGs, en especial G. Además de los GAGs para que esta unión sea más eficiente se requiere de la participación de un co-receptor, para el caso de la proteína F, se sugieren a la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM 1), RhoA, TLR4 y para el caso de la G, están propuestas CX3CR1 y anexina II [1]. Una vez que la unión de virus-célula se ha dado, la entrada viral ocurre por fusión de la envoltura viral con la membrana celular. Para hablar de la fusión es necesario analizar la estructura de la proteína F. La proteína F es sintetizada como F<sub>0</sub>, precursor que se ensamblara como homotrímero y que es activado por el corte producido por endoproteasas en el complejo trans-Golgi,

donde se producirán dos subunidades  $\text{NH}_2\text{-F}_2\text{-F}_1\text{-COOH}$  más un fragmento p27. Con lo que se produce un  $\text{F}_1$  en el extremo amino, que contiene el péptido de fusión y que está seguido por regiones heptarepetidas (HR1 y HR2) que se asociarán durante la fusión y las cuales participan en el cambio conformacional necesario para la fusión eficiente. La inserción del péptido de fusión dentro de los lípidos de membrana seguidos por la interacción con HR1 y HR2 forman un complejo de seis hélices haciendo que la envoltura viral y la membrana celular se unan y se fusionen para posteriormente dar la entrada a la cápside [4, 5], (Figura 3).

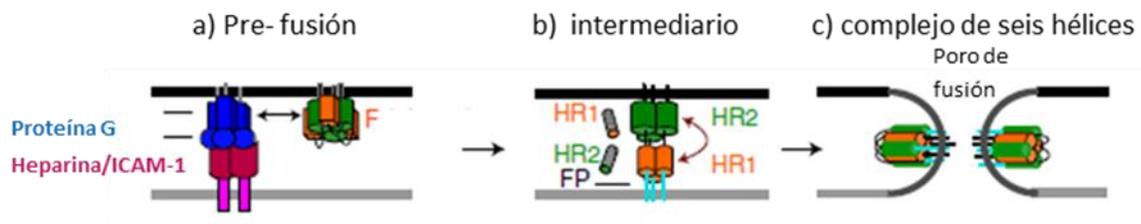


Figura 3. Fenómeno de fusión en paramyxovirus. Se aprecia en a) La cooperación de la proteína G con F uniéndose a receptores como Heparina (para G) o ICAM-1 (co-receptor para F) en un fenómeno de pre-fusión b) El cambio conformacional de la proteína F, el cual expone las regiones heptarepetidas (HR) y el péptido de fusión (FP), c) El complejo formado por las seis hélices para dar el poro de fusión. Imagen modificada de Aguilar H. et al 2011.

Una vez que se ha producido la fusión, la cápside es liberada en el interior de la célula y se lleva a cabo la transcripción y replicación del RNA viral. La transcripción y replicación siguen el modelo de los mononegavirales. La polimerasa reconoce al genoma en el extremo 3', el cual comienza con la región líder de 44 nucleótidos [6]. Los genes son transcritos secuencialmente guiados por fragmentos cortos de comienzo y por señales de genes de finalización por cada ORF [7]. Durante la replicación del RNA, la polimerasa ignora las señales de

transcripción y produce un intermediario replicativo positivo llamado antígenoma, el cual posteriormente sirve como templado para producir genomas. En el genoma del hRSV existe una sobreposición de los genes M2 y L en 68 nucleótidos [8]; estudios con mini replicones han mostrado que durante la transcripción del gen M2, la polimerasa viral escanea en ambas direcciones (río arriba y abajo) para localizar el sitio de inicio del gen L [9]. El escaneo podría ser la mayor actividad de la polimerasa, se especula que se produce este fenómeno en cada empalme de genes durante la transcripción así como en el inicio de la transcripción y replicación del RNA. La replicación del RNA se lleva a cabo por la proteína L, la cual también se encarga de añadir el cap y la cola de poli A, a los mRNA monocistrónicos virales que una vez producidos serán traducidos por los ribosomas [10]. Una vez sintetizados los genomas y las proteínas virales (complejo RNP), las proteínas de la nucleocápside se ensamblan y encapsidan el RNA genómico, formando complejos helicoidales de RNP en los cuales, el RNA viral es fuertemente comprimido, esta estructura es resistente a RNasas [11]. Por difracción de rayos X y microscopía crioelectrónica, se ha determinado la estructura de la proteína N del hRSV, la cual corresponde a un anillo decamerico [12]. Esta estructura contiene en su interior el RNA viral y le confiere protección a receptores de helicasa propios de la célula como RIG-I y MDA-5 [11]. Una vez formado el complejo RNP, debe ser incorporado a las partículas virales que gemarán, esta incorporación es selectiva y cada partícula recibirá solo una copia de RNA genómico, esta selección se ha demostrado en células que fueron transfectadas para producir nucleoproteínas (NP) de parainfluenza 1 (PIV1), al

mismo tiempo fueron infectadas con virus Sendai. Al analizar las estructuras de nucleocápside, se encontró que contenían las NP de PIV1 pero no las del virus Sendai [13]. En el proceso de ensamblaje de partículas virales participa la proteína M, que es un puente directo entre el complejo RNP y la envoltura viral. Además la proteína M organiza el ensamblaje. Esta proteína es altamente abundante y se une directamente a las membranas celulares ocupando una posición central que permite la interacción del complejo RNP con las glicoproteínas virales por las colas citoplasmáticas [14]. Para varios paramixovirus, la proteína M se expresa en ausencia de otras proteínas virales y es suficiente para liberar VLPs, lo que se comprobó a partir de células transfectadas con genomas incompletos de hRSV, estos procesos se han visto en PIV1, virus Sendai, Nipah y virus de Sarampión [15]. Aunque M es capaz de producir VLPs, su rendimiento se mejora cuando está en presencia de otros componentes como glicoproteínas o proteínas de la nucleocápside [15]. La cooperación de glicoproteínas virales (F, G y SH para hRSV) con la proteína M para la formación de partículas virales se realiza muy cerca de la membrana citoplásmica de la célula, donde gemarán los viriones, estas interacciones resultan importantes para la formación de partículas virales, como en el caso de parainfluenza 5 (PIV5), donde M se ha observado en acúmulos en la membrana de células infectadas por ensayos de fluorescencia y co-localización. Sin embargo estos acúmulos se pierden en células infectadas con mutantes de PIV5 en los cuales la cola de HN y/o F que se encuentra por la parte citoplásmica de la célula, es truncada [16, 17]. Este tipo de evidencia también se ha demostrado con hRSV donde en ensayos de co-localización se ha observado

la interacción de G con M en cepas silvestre, sin embargo esto no ocurre con cepas mutantes donde a G se le han removido los primeros seis aminoácidos que se encuentran por la cara citoplásmica [18]. En cuanto a la cooperación de M con proteínas de la nucleocapside se sabe que las interacciones de incorporación de los genomas dentro de los viriones que gemarán son manejados por la proteína M. Existe evidencia de la directa interacción entre M y las proteínas de nucleocapside [19]. En células infectadas con virus de Sarampión se ha observado el complejo RNP en la membrana plasmática, pero no en células infectadas con un virus de Sarampión recombinante, el cual contenía una proteína M inestable [20]. Los microdominios dentro de los lípidos de membrana como colesterol y esfingolípidos (ricos en balsas lipídicas), tienen el potencial de actuar como plataformas para el ensamblaje por poseer puntos que permiten la concentración de proteínas virales antes de la gemación. Existe evidencia de que las balsas lipídicas son un factor importante durante las infecciones con paramyxovirus, esta información ha sido obtenida a través de varios experimentos en los que se interrumpen los microdominios de las balsas lipídicas por insuficiencia de moléculas de colesterol por medio de la metil- $\beta$ -ciclodextrina, (M $\beta$ CD). En estos virus no se afecta la liberación pero si la infectividad [14]. La proteína M, también participa en la en la formación de filamentos y la liberación del virus una vez que se ha dado la unión entre nucleocapside, M y glicoproteínas virales (Figura 4). [14, 21].

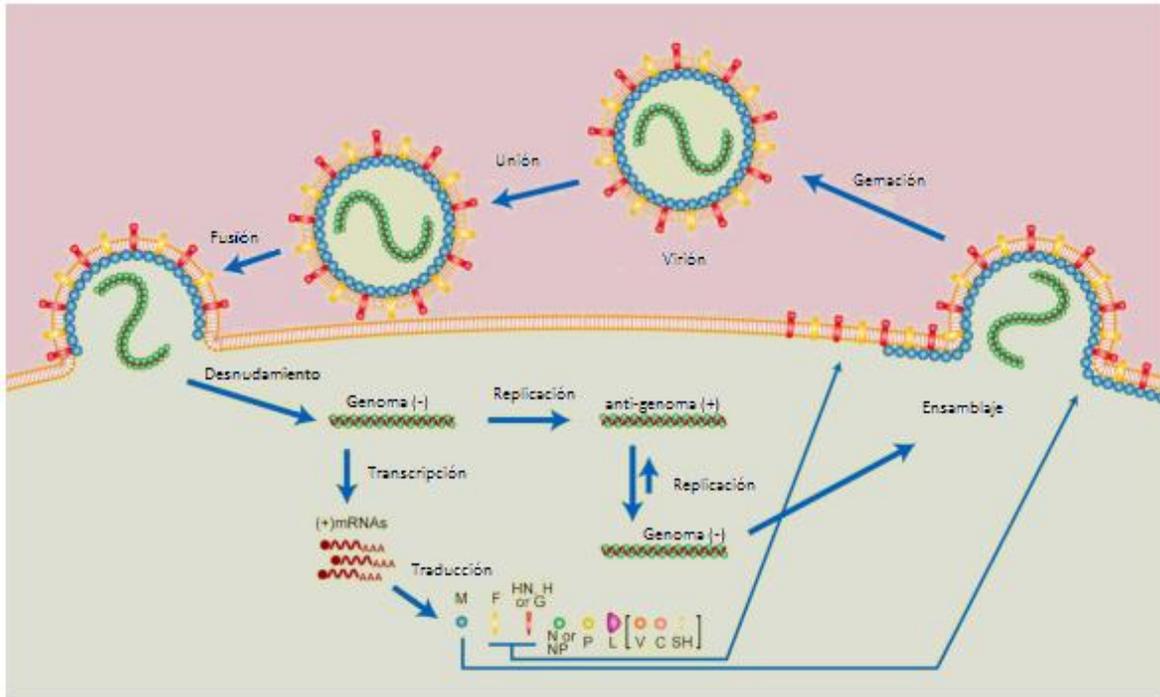


Figura 4. Ciclo replicativo de hRSV .Se pueden observar las etapas del hRSV durante la infección de una célula. Imagen modificada de Megan S et al 2010.

#### I.iv. Respuesta inmune ante hRSV

Hablar de la inmunidad en humanos hacia el hRSV es hablar de inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad adaptativa juega un rol primario en una infección por hRSV, pero la magnitud y calidad de este tipo de respuesta inmune depende de las señales emitidas por la respuesta innata (Figura 5). Después de la estimulación de células dendríticas en la mucosa nasal, la interacción del hRSV con el epitelio respiratorio es inminente, por lo que, de manera general se inducen señales intracelulares que resultan en una activación de mecanismos antivirales que incluyen la producción de citocinas, quimiocinas y la inducción de elementos

intrínsecos que regulan la sobrevivencia de la célula. El patrón de expresión de citocinas y quimiocinas activa el tráfico de células de la respuesta inmune al sitio de infección lo que podría aumentar la eliminación del virus o la exacerbación de la enfermedad.

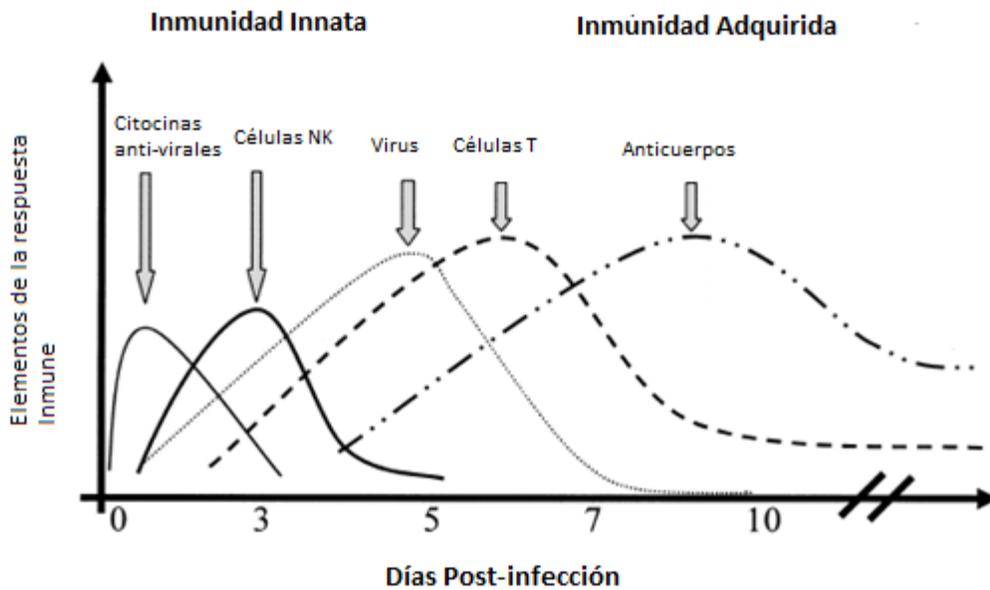


Figura 5. Mecanismos de defensa contra una infección por hRSV. Se observa la sobreposición entre la inmunidad innata y adquirida. Imagen modificada de Tripp et al 2004.

#### I.iv.i Inmunidad innata

La inmunidad innata provee la primera línea de resistencia ante la infección por hRSV. Una variedad de componentes secretados en el tracto respiratorio contribuyen a inhibir la infección por hRSV [22] particularmente algunos componentes de la mucosa que incluyen colectinas y lactoferrinas [22-24]. Varios

de estos componentes se unen a glicoproteínas expresadas por el hRSV y facilitan su eliminación a través de la agregación u otros efectos como la activación de la función leucocitaria. Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) del virus son reconocidos por receptores de patrones de reconocimiento a (PRR) por parte de la célula, lo que hace que se desencadene una respuesta inmune dentro y fuera de la célula. Existen dos grupos principales de PRRs de la respuesta inmune innata: a) los que están como componentes secretores, que incluyen moléculas como CD14, colectinas, ficolinas y pentraxinas y b) los que están asociados a las células como los DC- SIGN (por sus siglas en inglés *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), selectinas y los receptores tipo Toll (TLR) [25], a continuación se dan algunos ejemplos.

### *Colectinas*

La familia de estas proteínas, incluyen proteínas surfactantes A y D (SP-A y SP-D) las cuales interactúan con glicoproteínas virales (como F y G en el hRSV), esta opsonización, ayuda a inducir la fagocitosis de partículas virales. Al parecer SP-A es un importante inductor en la inmunidad ante el hRSV ya que SP-A se une a la subunidad de F<sub>2</sub> y neutraliza la infección de hRSV inhibiendo la fusión del virión [26].

## Receptores tipo Toll

Los TLRs se encuentran en la superficie celular y dentro de la célula, anclados a las membranas celulares. Principalmente, están encargados del reconocimiento a patógenos en la inmunidad innata, para muchos de ellos ya se ha descrito el ligando que reconocen en patógenos específicos tal es el caso de los TLR 3 y TLR4 para el hRSV. Los TLRs al reconocer proteínas o material genético del patógeno inducen cascadas de señalización en la célula para la producción de diferentes productos como citocinas y quimiocinas [27] (Figura 5).

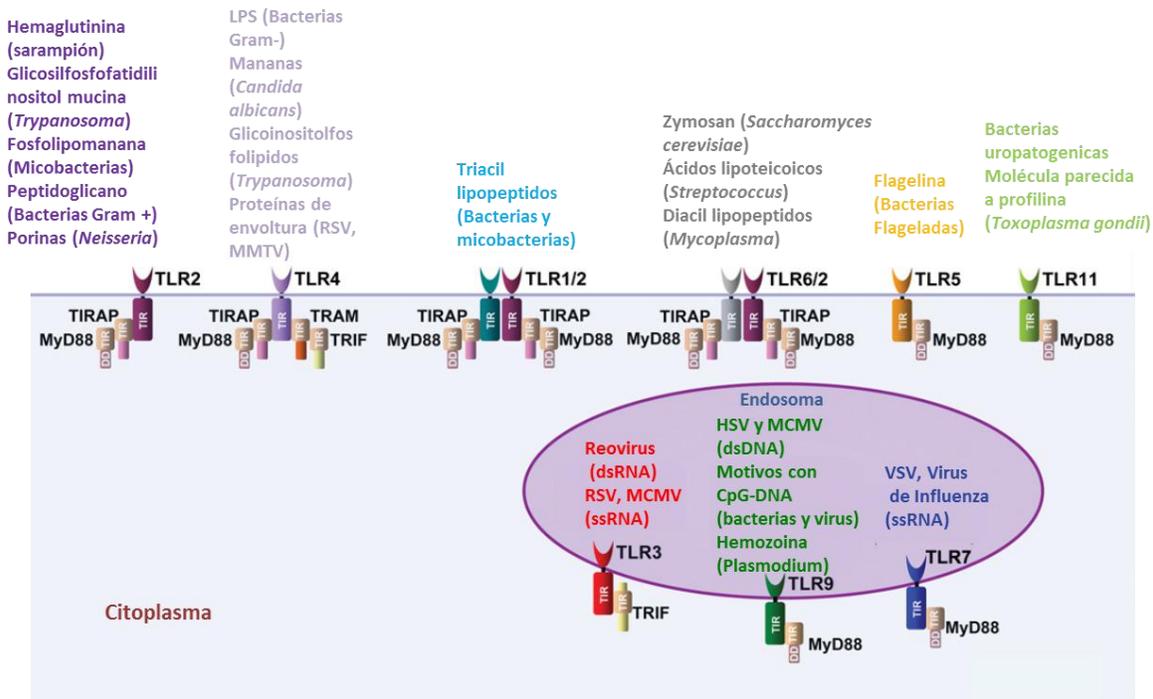


Figura 5. Receptores TLR de la inmunidad innata, se observa la gran cantidad de patógenos que pueden reconocer entre ellos el hRSV por medio de TLR 3 y TLR4. Imagen modificada de Kumar et al 2009.

Cuando existe un reconocimiento de RNA de doble cadena (intermediario en el hRSV), por medio de TLR3 y por la detección de glicoproteínas F por TLR4 o CD14 se induce una cascada de señalización (Figura 6) que finaliza en la inducción de factores de transcripción como ERK y NFκB para la producción de citocinas pro-inflamatorias o en la inducción de IRF3 e IRF7 a través de TBK1/iKKE para translocarse al núcleo e inducir la transcripción de interferón (IFN). Las células dendríticas plasmocitoides (pDC) son la mayor fuente de IFNα/β y pueden detectar intermediarios de genoma de RNA de cadena sencilla de origen viral. Interesantemente cuando las pDC son infectadas por hRSV, la vía de transducción de señales asociada a TLR7/9 se ve bloqueada [28] por las dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2, las cuales inhiben la inducción de IFNα/β. Este efecto se da por la inhibición de la fosforilación y translocación nuclear de IRF3. También se ha demostrado que estas dos proteínas no estructurales inhiben la síntesis de IFN tipo λ-1,2,3, los cuales regulan los efectos antivirales [29, 30].

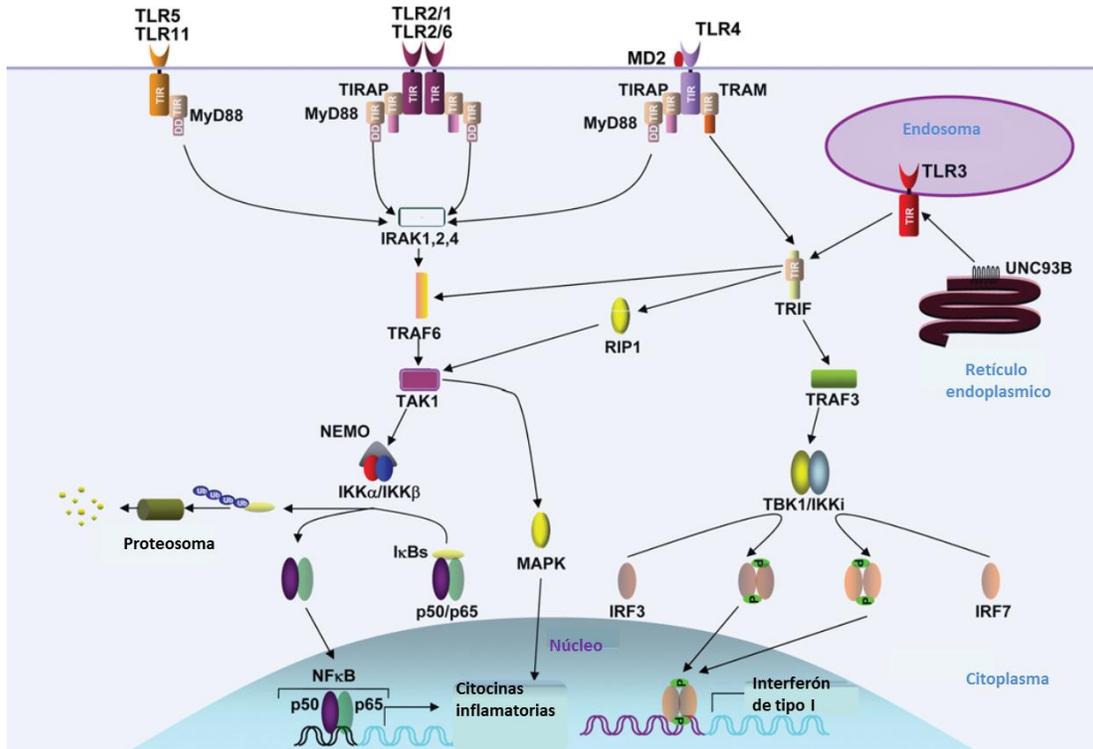


Figura 6. Transducción de señales de TLRs. Se aprecia como TLR3 y TLR4 pueden finalizar en la transcripción de IFN o citocinas pro-inflamatorias Imagen modificada de Kumar et al 2009.

### *Citocinas en respuesta a la infección hRSV*

La infección por hRSV en células epiteliales induce un espectro de citocinas y quimiocinas que afecta el balance entre la eliminación del virus y la patogénesis de la enfermedad. Se ha demostrado que en líneas celulares A-549 infectadas con hRSV, se expresan quimiocinas CC (Exodus-1, TARC, RANTES, MCP-1, MDC y MIP-1 $\alpha/\beta$ ), del grupo CXC (GRO- $\alpha/\beta/\gamma$ , ENA-78, IL-8 y TAC) y del grupo CX3C (fractalcina) [31]. Además de estas quimiocinas, se ha demostrado la síntesis de las siguientes citocinas, IL-4, IL-6, IL-11, TNF $\alpha$  [32]. Estos patrones de citocinas y

quimiocinas se han correlacionado con la gravedad de la enfermedad pues esta gama de citocinas produce inflamación severa en bronquios y/o bronquiolos.

Las células de la respuesta innata responden a toda esta cascada de citocinas y quimiocinas, incluyendo macrófagos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos y linfocitos NK, cada una de ellas participa importantemente durante la infección. Sin embargo, un desbalance en las citocinas y quimiocinas puede exacerbar la inflamación y contribuir a la patogénesis de la enfermedad.

#### I.iv.ii Inmunidad Adquirida

La inmunidad adquirida es mediada por células B (humoral) y células T (celular), las cuales median la especificidad antigénica, la diversidad del reconocimiento del antígeno, la memoria y la autotolerancia inmune.

##### *Inmunidad Humoral*

Las infecciones por hRSV pueden ocurrir a muy temprana edad cuando el sistema inmunológico aún no ha madurado y los anticuerpos transmitidos por vía materna juegan un papel importante. Los infantes empiezan a recibir anticuerpos de la madre por vía transplacentaria a partir de la semana 26 y hasta la 32 de gestación. Este tipo de anticuerpos son principalmente de tipo IgG1 y tendrán una vida media de 3 semanas. Cuando estos anticuerpos empiezan a decaer [1], comienzan a aparecer anticuerpos en suero y secreciones en títulos altos para F y G del hRSV, estos aumentan su concentración y especificidad conforme pasa la edad del niño. Hay estudios que mencionan que los primeros anticuerpos sintetizados por los infantes están dirigidos hacia la glicoproteína F del hRSV y son de tipo IgM e IgA

[33]. Aunque en otros estudios mencionan que, en niños de Kenia, los primeros anticuerpos en aparecer son contra las regiones variables de la proteína G [34]. En adultos sanos con infecciones naturales por hRSV, se ha demostrado que la protección por los anticuerpos nasales de tipo IgA es mayor a la generada por los anticuerpos IgG en suero [35]. Sin embargo, en nuevos modelos se ha reportado que la resistencia a la infección hacia hRSV en vías respiratorias superiores por anticuerpos se ha asociado a un aumento en la vida media de IgM e IgG y no de la IgA [36]. Las personas de la tercera edad tienden a desarrollar la infección más grave, por tanto surge la pregunta de si existe un defecto en la producción de anticuerpos contra hRSV [22]. Ahora bien, se ha reportado en pacientes de la tercera edad un mayor título de anticuerpos con respecto a adultos jóvenes, sin embargo, no se detectó un incremento en la actividad neutralizante de estos anticuerpos, pudiendo favorecer la susceptibilidad a la infección en las personas de la tercera edad. Se ha demostrado que la actividad neutralizante de los anticuerpos contra hRSV no es suficiente para detener la infección y que el título de anticuerpos neutralizantes debe elevarse para compensar la baja función de los mismos [37]. En un estudio similar, los niveles de anticuerpos tanto en personas mayores como en adultos jóvenes fueron similares, sin embargo los anticuerpos de las personas mayores tuvieron una mayor producción de anticuerpos neutralizantes para ambos subtipos de hRSV, así como un incremento en la respuesta específica ante antígenos F, G subtipo A y G subtipo B, los autores sugieren, que debió haber una mejor respuesta humoral y que esto pudo ser ocasionado por el cambio de una respuesta de Th1 a Th2, pues encontraron una

disminución en la respuesta por células T, en modelos *in vivo* en ratones de edad avanzada y adultos humanos mayores [31, 38, 39].

### *Inmunidad Celular.*

La infección por hRSV es controlada principalmente por la inmunidad celular, que elimina las células infectadas por el hRSV, siendo las principales encargadas de esta acción los linfocitos T citotóxicos (CTLs), por su reconocimiento mediante el MHC-I. Diferentes estudios demuestran, que en niños con infección respiratoria aguda por hRSV, la sangre contiene un alto número de CTLs específicas para hRSV [40, 41]. En otro estudio, se mostró en adultos infectados por hRSV, que las proteínas NS2, N, M, M2, F y SH fueron reconocidas por los CTLs de los pacientes [42, 43]. Aunado a esto se ha determinado que estas células reconocen la M2, F y N como blancos principales [44]. En el caso de linfocitos T CD4 positivos, estos contribuyen a la inmunidad del hRSV pero también a la patogénesis de la enfermedad por ejemplo; los T CD4 positivos producen un amplio espectro de citocinas requeridas para mediar la respuesta inmune, incluyendo IL-2 e IFN  $\gamma$ , lo cual contribuye a la respuesta antiviral. En ratones BALB/c, con una infección primaria por hRSV este induce una mezcla de citocinas de tipo Th1/Th2 con limitada patogénesis de la enfermedad *per se*, esto debido a la aparición temprana de IFN  $\gamma$ , el cual controla el balance Th1/Th2. Sin embargo, no hay IFN  $\gamma$  durante las infecciones subsecuentes lo que hace que el balance se pierda y este se desplace a una respuesta Th2, donde esto podría ser un detonante en la exacerbación y gravedad de la enfermedad [45-47].

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

Una de las primeras causas de muerte infantil a nivel mundial, y más común en países en vías de desarrollo, son las Infecciones Respiratorias Agudas (IRAs), (WHO, 2002), las cuales constituyen un complejo grupo de enfermedades provocadas por diversos agentes causales que afectan las vías respiratorias. La morbilidad por infecciones respiratorias agudas (IRAs) se estima en 94,037,000, DALYs (años de vida ajustados por discapacidad, que es una medida de la carga global de la enfermedad, expresada como el número de años perdidos debido a una enfermedad, discapacidad o muerte prematura) y 3,9 millones de muertes al año (WHO, 2002). La OMS reporta que un 62% de todas las muertes (de niños y adultos) son atribuibles a infecciones respiratorias agudas (II). Un meta-análisis reciente demostró que en todo el mundo 1,9 millones de niños murieron por infecciones respiratorias agudas en el año 2000, el 70% de ellos en África y el sudeste asiático (II). En México, el índice de mortalidad por IRAs según con la última estadística en el 2008 del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), reporta que es la octava causa de muerte en general en México, con 15,096 defunciones y la segunda causa de muerte en niños entre 1 y 4 años de edad.

## **III. Importancia del hRSV a nivel mundial**

El hRSV es la causa más importante de infecciones del tracto respiratorio bajo en infantes. Se menciona que a nivel mundial el hRSV es responsable del 50 al 90% de hospitalizaciones por bronquiolitis, del 5 al 40% de neumonías y del 10 al 30% de las traqueobronquitis [15]. Estudios de Landmark en 1960, mostraron que el

hRSV es la principal causa de enfermedades respiratorias en pacientes pediátricos en los Estados Unidos. Tan solo en ese país se estima que las hospitalizaciones al año a causa del hRSV son de 73,400 a 126,300, además de 500 muertes por cuadros de bronquiolitis y neumonía en niños menores de un año [48]. En Canadá, la atención hospitalaria por consecuencia de enfermedades respiratorias a causa del hRSV cuesta \$18 millones de dólares americanos cada año [48]. A través, del mundo, el hRSV es el patógeno respiratorio más importante en los niños de 1 a 2 años de edad siendo la principal causa de bronquiolitis viral y neumonía, infectando a más del 70% de niños en el primer año de vida y al 100% de niños en el segundo año [49]. La magnitud del costo es entendible, ya que prácticamente todos los infantes son infectados con el hRSV en los primeros dos años de vida, y el uno por ciento necesita atención hospitalaria [50]. En países desarrollados, se han estudiado grupos de personas de alto riesgo, en estos grupos se incluyen aquellas que presentan desordenes crónicos, estos grupos incluyen infantes menores de seis meses de edad, infantes prematuros con o sin enfermedad crónica de pulmón (displasia broncopulmonar-BPD, por sus siglas en ingles), niños con cardiopatía congénita hemodinámicamente significativa (CHD, por sus siglas en ingles), pacientes inmunosuprimidos (incluyendo los que están bajo tratamientos de quimioterapias, trasplante de órganos o de medula ósea y quienes tienen desordenes del sistema inmune), o con fibrosis quística e infantes con enfermedad neuromuscular [51-53]. Año con año existen variaciones de la infección por hRSV por temporada, estas variaciones parecen estar implicadas en la epidemiología del hRSV [15]. El hRSV es un virus estacional, alcanzando picos

en invierno y primavera, en climas templados la mayor cantidad de infecciones se producen entre noviembre y mayo [51]. En Europa, las re-hospitalizaciones por hRSV ocurre entre octubre y mayo generando los máximos picos de brotes en diciembre/enero y marzo [15]. Durante este tiempo las infecciones por hRSV pueden llegar hasta un 100% en centros de cuidado infantil. Sin embargo, un estudio Austriaco que incluía 863 infantes prematuros de edades de 29 a 32 semanas, reveló que el 18% fueron hospitalizados a causa del hRSV, fuera de la temporada típica de infección [54]. En este mismo sentido se han estudiado las variaciones de temporada que puede tener en el hemisferio sur, en Gambia los picos máximos de actividad se han presentado durante el verano entre agosto y septiembre por periodos hasta de 4 años (1993-1996) [55].

Las manifestaciones clínicas más comunes de la infección por hRSV en todos los grupos de edades son la rinitis febril y/o faringitis sin o con leve afección de los bronquios. Sin embargo, las consecuencias pueden ser más serias en niños entre los 2 y 6 meses de vida. Al menos el 1 % de este grupo desarrolla infección grave por hRSV, que requiere admisión hospitalaria y de estos al menos el 1% muere [56]. Particularmente, la patología en niños prematuros y de 1 a 3 meses de edad, inicia con rinitis puede complicarse con tos y fiebre, posteriormente presentar cuadros de disnea, otitis media, y cianosis, además de diseminarse al tracto respiratorio inferior infectando a los bronquiolos y alvéolos [15]. La infección del epitelio respiratorio por hRSV induce una respuesta inflamatoria local que se asocia con patologías y sintomatologías propias de la enfermedad como: goteo nasal, apnea, apatía, fiebre, mala alimentación, respiración sibilante y tos [57]. Las

co-infecciones con bacterias no son frecuentes en países desarrollados, sin embargo, en países en vías de desarrollo son comunes, lo que explicaría la alta fatalidad en naciones en desarrollo [51]. Los patógenos más frecuentes en las co-infecciones en infantes maduros y prematuros son *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* [15].

#### **IV. Importancia del hRSV en México**

En México existen pocos reportes de epidemiología molecular sobre el impacto que tiene el hRSV, no obstante se ha señalado en estudios realizados en el Distrito Federal con una muestra de 300 pacientes que el 65% de las enfermedades respiratorias son causadas por virus respiratorios, de ellos el de mayor incidencia es el hRSV en niños de 0 -5 años de edad detectado principalmente en el periodo de invierno-primavera [58]. Otro estudio, realizado también en la Ciudad de México, reportó que, en niños con asma o con dificultad respiratoria el 75% de los casos de infecciones respiratorias fueron causadas por virus respiratorios predominando el hRSV en niños menores de 3 años [59]. El grupo de Noyola y col (2007), estudiaron un total de 2036 muestras de niños hospitalizados en San Luís Potosí de mayo 2003 a abril 2005, del total, 734 (36.1%) pacientes se diagnosticaron con infección respiratoria aguda, de los cuales 616 (24.8%) resultaron positivos a hRSV [60]. Wong y colaboradores (2010) reportaron la frecuencia de virus respiratorios en hospitales de tercer nivel en el Distrito Federal, de niños entre los 10 meses y 15 años, entre enero del 2004 y octubre del 2006, de 986 muestras analizadas, el 14% fueron positivas, la

frecuencia del hRSV fue del 80%, 8% de parainfluenza 1, 5% de parainfluenza 3, 2%, adenovirus, 2%, influenza A, 1 %, parainfluenza 2 y 1% de influenza B. El hRSV, que tuvo la mayor frecuencia, se asoció a neumonía y bronquiolitis en los niños menores de 3 años [61].

En el Distrito Federal (2009), en 168 pacientes pediátricos entre 2 y 17 años de edad provenientes del Instituto Nacional de Pediatría que presentaban cuadros de asma (100 casos) y sibilancias (68 casos), se realizó un estudio para determinar la frecuencia viral. La identificación viral fue positiva en el 75 y 44% respectivamente. En niños en edad preescolar con sibilancias se encontró que el virus predominante era el hRSV [59]. Muchos casos de las hospitalizaciones en México por IRAs se suelen atribuir al virus de influenza [62], sin embargo en un estudio realizado en 2009 (año en que se observó el brote pandémico de influenza) Noyola y colaboradores determinaron la contribución que podían tener el hRSV y el A(H1N1) en la gravedad de la enfermedad durante dicha pandemia, 657 pacientes con LTRI durante el periodo de Abril 2009 a Marzo del 2010, fueron analizados y en 180 casos se encontró virus de influenza pandémica y 133 fueron positivos para hRSV, siendo que el virus de influenza se encontró sobre todo en adultos mientras que el hRSV fue común en niños. Aunque el trabajo no detectó diferencias en cuanto a la gravedad de la enfermedad, este dato aporta más evidencia de que el hRSV es un virus de suma importancia en México [62]. En otro reporte acerca de la importancia de los genotipos del hRSV en la ciudad de México. Tirado y col (1995) realizaron un estudio de búsqueda del hRSV en aspirados nasofaríngeos de 82 infantes menores de 12 meses de edad,

hospitalizados por enfermedades del tracto respiratorio, con diagnóstico de bronquitis, bronquiolitis, neumonía y laringotraqueobronquitis. Los resultados de este estudio coincidieron con lo reportado a nivel mundial, ya que el subtipo predominante correspondió al subgrupo A [63].

## **V. Vacunas y tratamientos**

Desde el descubrimiento del hRSV en 1956, se han realizado muchos intentos de vacunas y tratamientos, a pesar de ello actualmente no existen vacunas cien por ciento garantizadas. Además, los métodos profilácticos y terapéuticos disponibles son muy limitados. Específicamente los anticuerpos monoclonales de origen humano (palivizumab), son el único método permitido de terapia para niños en alto riesgo, mientras que la ribavirina es usada para el tratamiento de la infección [64]. Debido a la gravedad de la enfermedad y al limitado uso de tratamientos surge la demanda de obtener una vacuna contra el hRSV que sea efectiva y segura, hoy más que nunca. Durante los primeros intentos de crear una vacuna surgió la idea de la vacuna de hRSV inactivado con formalina (FI-RSV) durante 1960 [65]. Desgraciadamente esta vacuna fue poco protectora, y en realidad solo logro aumentar la gravedad de la enfermedad. Estudios subsecuentes usando modelos experimentales demostraron que la FI-RSV inducía un desbalance en la respuesta tipo Th2, esto se asoció con una inflamación masiva en el pulmón a causa de linfocitos T CD4 [64]. Por esta razón, la evaluación de vacunas para el hRSV debe realizarse con sumo cuidado y tener en cuenta todas las consecuencias para que no se repita lo que paso con la FI-RSV. Varias estrategias están siendo usadas

para el desarrollo de una vacuna para el hRSV. Algunas de ellas se enfocan en el desarrollo de la atenuación a través de pases en frío y/o por mutagénesis química (cepas cpts RSV), este tipo de vacuna actualmente se encuentra en fase clínica I/IIa [66, 67]. Otro tipo de vacunas que se están probando son las de subunidades. Aunque, son consideradas inapropiadas para la población en edad pediátrica debido a la exacerbación de la enfermedad, provocada por proteínas como F y sobre todo G [68]. Sin embargo, varias proteínas derivadas del hRSV están siendo evaluadas como candidatas a desarrollarse en vacunas por subunidades y actualmente se están probando en etapas pre-clínicas y clínicas. Una de las estrategias que se está desarrollando en este tipo de vacunas, es el uso correcto de diferentes tipos de adyuvantes que mantengan la inmunogenicidad pero que disminuyan los efectos adversos [69, 70]. También se están realizando vacunas a través de vectores virales, con virus de Vaccinia, Adenovirus, virus Sendai y PIV [64]. Muchos de los modelos que se desarrollan por vectores han dado una buena inmunidad protectora en modelos animales y posiblemente puedan ser desarrollados en humanos en un futuro cercano.

Como se ha mencionado, actualmente no se cuenta con una vacuna contra el hRSV y menos aún, un tipo de vacuna que garantice la efectividad en ambos subtipos. Al ser un problema grave de salud pública a nivel mundial, es necesario conocer y anticipar los patrones de circulación por subtipo en México. Sin embargo, hasta ahora no existe este patrón de circulación de los subtipos de hRSV a nivel nacional, más aún, no existe una subtipificación del hRSV por medio de técnicas con mayor sensibilidad como el RT-PCR y que sean más accesibles a

institutos y hospitales del país. Por ello surge la necesidad de crear herramientas que faciliten el diagnóstico y contribuyan a conocer el panorama del patrón de circulación de hRSV en México.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El hRSV es de suma importancia a nivel mundial por el elevado índice de morbimortalidad que produce. Sin embargo, en México no existen datos de los patrones de circulación de los diferentes subgrupos virales de hRSV por temporada y tampoco contamos con métodos diagnósticos rápidos, específicos y costeables. Por ello, es necesario implementar técnicas moleculares para detectar, identificar y tipificar al agente viral, para que apoyen el diagnóstico en México de las infecciones causadas por este virus.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El hRSV es el agente etiológico más importante de enfermedades respiratorias agudas en niños menores de dos años de edad a nivel mundial. El hRSV presenta dos subgrupos el A y el B en relación a su proteína G, los reportes de epidemiología molecular indican diferentes patrones de circulación para los subgrupos virales alrededor del mundo. En México no existen reportes de la frecuencia y de las características epidemiológicas de los subgrupos virales y más aún, no se cuenta con un método de diagnóstico específico y rápido.

## **4. OBJETIVOS**

### **I. Objetivo general**

- Estandarizar un método de diagnóstico molecular rápido, sensible y específico para la detección y genotipificación de hRSV.

-

### **II. Objetivos específicos.**

- Aislamiento del hRSV a partir de exudados faríngeos y nasofaríngeos de muestras provenientes de pacientes en edad pediátrica.
- Determinación de hRSV para muestras clínicas, por medio de ensayos de inmunofluorescencia (IF).
- Diseño de cebadores específicos para genes N, P, F y G del hRSV.
- Determinación de hRSV por RT-PCR para muestras positivas y negativas previamente valoradas por ensayos de IF.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **A) MUESTRAS CLINICAS**

Muestras pediátricas a partir de lavados bronquioalveolares fueron proporcionadas por la Universidad Autonoma de San Luis Potosí y por el Instituto de Nacional de Referencia Epidemiológica (anexo I-A).

### **B) PROPAGACIÓN DE VIRUS**

#### *I) Propagación de virus de referencia y título viral*

Monocapas de células A-549 (células epiteliales alveolares tipo II de origen humano, ATCC CCL-185r) y HEp-2 (células epiteliales de carcinoma de laringe de origen humano, ATCC CCL-23) se infectaron con la suspensión viral de hRSV de referencia cepa Long (subtipo A) y cepa (B1) cp23 clona 1A2. La suspensión viral se cosechó de 48 a 72 h después de la infección o hasta la observación de efecto citopático (formación de sincitios o células gigantes multinucleadas). La cosecha viral de hRSV se clarificó por centrifugación (15 min a 1500 rpm) y se tituló por TCID<sub>50</sub> (del inglés: Tissue Culture Infectious Dose affecting 50% of the cultures, dosis media infectiva).

#### *II) Propagación de virus a partir de muestras clínicas.*

Monocapas de células A-549 y HEp-2 se infectaron con las diferentes muestras clínicas. Se cosecharon hasta observar efecto citopático (hasta diez días después de la infección) y se realizó hasta un triple ciego.

### **C) ENSAYOS DE CITOMETRIA DE FLUJO.**

#### *I) Infección de células por hRSV*

Monocapas de células A-549 y HEp-2 a un 90% de confluencia se infectaron con el hRSV de referencia a una moi (multiplicity of infection) de 1 durante 24 h, paralelamente se llevó a cabo el ensayo para células no infectadas (control negativo). La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul tripano.

#### *I.i) Ensayos de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)*

Para seleccionar la línea celular más eficiente para el aislamiento viral a partir de muestras clínicas se llevó a cabo la cuantificación de la expresión de antígeno viral por citometría de flujo. El ensayo se llevó a cabo con el virus de referencia, en este caso la cepa Long subtipo A

#### *I.ii) Procedimiento y estandarización para ensayos de FACS.*

El ensayo se realizó en tubos eppendorf (Axygen) de 1.5 mL, tratados por 30 min a 37°C con 1 mL de PBS-Albumina (PBS-ABS al 0.1%). Se retiró la solución y se adicionaron  $3 \times 10^5$  células. Las células se lavaron una vez con PBS-ABS 0.1% en frío posteriormente, se bloquearon con PBS-suero fetal bovino (SFB) al 2% durante 30 min a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron 2 veces con PBS-ABS al 0.1% en frío (en el segundo lavado se pasaron las células a tubos eppendorf (de 0.25 mL). Se adicionó el anticuerpo primario (Mouse anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibody, Millipore, Cat No. MAB858-2), a una

dilución de 1:25, se incubó durante 2 h en agitación constante suave a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces con PBS-ABS al 0.1% en frío. Se adicionó el segundo anticuerpo (Goat anti-mouse IgG (H+L) fluorescein conjugated secondary antibody, Millipore, Cat No. AP308F Formerly Roche 1814222) en una dilución de 1:2500, en agitación constante en total oscuridad durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces más con PBS-ABS al 0.1% en frío y oscuridad. Las células se fijaron con para-formaldehído (Electro Microscopy Sciences, Cat. No. 19210) al 4% durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en 300 µL de la misma solución. Finalmente, se leyeron en el citometro de flujo FACS cam Becton.

#### **D) ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA**

##### *l) Ensayos de inmunofluorescencia indirecta para muestras clínicas*

Monocapas de células HEp-2 se resuspendieron y se adicionaron 100 µL de la suspensión celular en cubreobjetos (PROBIOTEK) colocados en placas de 12 pozos (NUNC 12 well), una vez fijados, se completó medio mínimo esencial Dulbecco (D-MEM) al 7% de suero fetal bovino (SFB) y se incubaron por 24 h a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, se lavaron con PBS 2 veces y se infectaron con 100 µL de la cosecha viral del tercer pase de la muestra clínica y paralelamente con el virus de referencia hRSV a una moi de 1, durante 2 h a 37°C, posteriormente se retiró el inóculo y se añadió D-MEM sin SFB (1.5 mL) y se incubaron bajo las mismas condiciones durante 24 h. Se retiró el medio D-MEM y se fijaron durante 5 min con metanol y posteriormente con

acetona por 30 seg y se dejó secar al aire. Se adicionó 1 mL de solución de bloqueo PBS- Albumina al 1% más 5% de SFB (PBS-ABS, al 1%, SFB 5%) durante 12 h a 4°C. Se lavó tres veces con 200µL de PBS- tween 0.3%-ABS 0.1% por 10 min en agitación constante a temperatura ambiente, se adicionó el anticuerpo primario (Mouse anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibody, Millipore, Cat No. MAB858-2), en una dilución de 1:25 en PBS-ABS 0.5%, la reacción se llevó a cabo durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente tres veces con 200µL de PBS- tween 0.3%-ABS 0.1% por 10 min a temperatura ambiente en agitación constante, se incubó un segundo anticuerpo (Goat anti-mouse IgG (H+L) fluorescein conjugated secondary antibody, Millipore, Cat No. AP308F Formerly Roche 1814222) a una dilución de 1:2500 en PBS-ABS 1%, + 5% SFB, por 1 h en agitación constante en obscuridad. Se lavó nuevamente tres veces con 200µL de PBS- tween 0.3%- ABS 0.1%, por 10 min con agitación constante a temperatura ambiente y en total obscuridad. Los cubreobjetos se fijaron en portaobjetos (MADESA esmerilados) y observaron en un microscopio OLYMPUS BX60. Paralelamente se analizó el control negativo (células sin infectar).

## *II) Ensayos de inmunofluorescencia directa para muestras clínicas*

Monocapas de células HEp-2 se resuspendieron y se adicionaron 100 µL de la suspensión celular en cubreobjetos (PROBIOTEK) colocados en placas de 12 pozos (NUNC 12 well), una vez fijados, se agregó 2 mL de medio mínimo esencial Dulbecco (D-MEM) al 7% de suero fetal bovino (SFB) y se incubaron por 24 h a

37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación se lavaron con PBS 2 veces y se infectaron con 100 µL de la cosecha viral del tercer pase de la muestra clínica y paralelamente con el virus de referencia hRSV a una multiplicidad de infección de 1, durante dos horas a 37°C, posteriormente se retiró el inóculo y se añadió D-MEM sin SFB (1.5 mL) y se incubaron bajo las mismas condiciones durante 24 h. Se retiró el medio D-MEM y se fijaron durante 5 min con metanol y posteriormente se permeabilizaron con acetona por 30 seg y se dejó secar al aire. Se añadió 1 mL de solución de bloqueo, durante 12 h a 4°C. Se lavó tres veces con 200µL de PBS- tween 0.3%- ABS 0.1% por 10 min en agitación constante a temperatura ambiente. Se agregó el anticuerpo monoclonal conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (OXOID, IMAGEN, Respiratory Syncytial Virus (RSV) REF, K610211-2) a una dilución de 1:10 en PBS- tween 0.3%- ABS 0.1%, y se incubó en agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente tres veces con 200µL de PBS-tween 0.3%-ABS 0.1% por 10 min en agitación constante a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se fijaron en portaobjetos (MADESA esmerilados) y observaron en un microscopio OLYMPUS BX60. Paralelamente se analizaron el control positivo (hRSV de referencia) y el control negativo (células no infectadas).

### ***E) EXTRACCIÓN DE RNA***

Monocapas de HEp-2 se infectaron con la suspensión viral de hRSV de referencia cepa Long a las 18, 24 y 36 h con una moi de 1. Después de transcurridos los tiempos establecidos, las monocapas de HEp-2 se resuspendieron y centrifugaron por 10 min a 2000 RPM en una centrifuga ROTOFIX hettich, en tubos cónicos de

15 mL (NEPTUNE) hasta obtener un botón celular. Al botón celular se le añadió 1 mL de TRIzol Reagent (Invitrogen Cat no. 15596-026), se resuspendió gentilmente, y posteriormente se pasó a tubos eppendorf de 1 mL. Paralelamente, la cinética se realizó en células no infectadas.

Este procedimiento se realizó para cada uno de los puntos de la cinética de infección viral. Posteriormente se adicionó un volumen de 200  $\mu$ L de cloroformo frío grado molecular, por cada mL de TRIzol. Se agitó por 15 seg en un vortex (Thermolyne Maxi Mix) y se centrifugó a 10000 RPM por 10 min en una centrífuga eppendorf 5415-C. Al finalizar la centrifugación, se observaron dos fases una orgánica y otra inorgánica; la fase inorgánica superior contiene el RNA, esta fase se pasa a otros tubos eppendorf limpios y estériles; la fase orgánica que contiene DNA y proteínas se descarta. A la fase inorgánica se le adicionó un volumen de 500  $\mu$ L de isopropanol frío grado molecular y posteriormente se dejó precipitando a  $-70^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Las muestras se pasaron a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 min, posteriormente se centrifugaron a 10000 RPM por 10 min y se decantó el sobrenadante. El botón de RNA se lavó con etanol al 75% v/v, y se centrifugó a 10000 RPM por 10 min. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el botón. El botón de RNA se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua con DEPC (Dietilpirocarbonato). La concentración de RNA se determinó por espectrofotometría a 260 nm en un espectrofotómetro de luz UV (Ultrospec 1000). La concentración de RNA se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:  $\mu\text{g} = \text{DO}_{260} \times \text{Factor de dilución} \times 40\mu\text{g} \times 1 \text{ mL}$  [71].

## **F) RT-PCR**

### *I) Síntesis del DNA complementario.*

Para realizar la síntesis del DNA complementario se necesita partir de al menos 3  $\mu\text{g}$  de RNA. En un tubo eppendorf nuevo de 0.2 mL se adicionaron 4  $\mu\text{L}$  de amortiguador de reacción 5X (Invitrogen y 00146), 2  $\mu\text{L}$  de DTT (Invitrogen y00147) 0.1 M, 1 $\mu\text{L}$  de dNTPs (Invitrogen cat no 18427-013) 10 mM, 0.5  $\mu\text{L}$  de inhibidor de RNasa (Invitrogen cat no 155118-012), 3  $\mu\text{g}$  de RNA y se adicionó agua con DEPC hasta completar un volumen de 20  $\mu\text{L}$ . En un termociclador tipo Palm Cycler se colocaron las muestras a 80°C durante 5 min. Los tubos de reacción se mantuvieron a 4°C durante 7 min, posteriormente se les adicionó 1  $\mu\text{L}$  de oligo-dT (Invitrogen 58862) y se incubaron durante 10 min, a 65°C, la reacción nuevamente se mantuvo a 4°C durante 7 min. Se les adicionó 1  $\mu\text{L}$  de transcriptasa reversa a cada tubo (Invitrogen, SuperScript, cat no 100004925) y la reacción se incubó a 42°C durante 1 h.

### *II) Diseño y síntesis de cebadores para genes virales n, p, f y g.*

Los oligonucleótidos específicos para los diferentes genes virales se diseñaron y seleccionaron con el programa DNAMAN 2.7. Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó la secuencia de referencia del NCBI: NC\_001781.1, y AY911262.1 para el subtipo A y para el hRSV subtipo B (B1 cp23 clona 1A2) se utilizó el GenBank: M17213.1

Además se realizó un alineamiento de los oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes con el programa ClustalW2-multiple séquense alignment de EMBL-EBI. Posteriormente se realizó una búsqueda de especificidad de los oligonucleótidos diseñados para confirmar que estos mismos no se unieran ni alinearan con otros genes que no fuesen del hRSV lo que se logró con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los cebadores correspondientes se sintetizaron en el Instituto de Fisiología Celular (UNAM). En la tabla 1 se muestran las secuencias de los cebadores utilizados.

### *III) Amplificación del cDNA*

En un tubo eppendorf nuevo de 0.2 mL se adicionaron 7  $\mu$ L del cDNA (templado), 5  $\mu$ L de amortiguador 10X PCR (Invitrogen y02028), 1  $\mu$ L de dNTP (Invitrogen cat no 18427-013) 10 mM, 1.5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (y02016) 50 mM, 0.2  $\mu$ L de Taq polimerasa platinum (Invitrogen cat no. 10966-030), 5  $\mu$ L de cada cebador a una concentración 10  $\mu$ M y agua con DEPC para aforar a 50  $\mu$ L.

Tabla 1. Oligonucleótidos y secuencias usadas para amplificar fragmentos de genes N, F, P y G de hRSV.

Cebadores para virus sincitial respiratorio (RSV) Generales.					
No.	Nombre	Secuencia	Genes de RSV	Tamaño del amplificado	Región del gen
1	Nf2	5'TGGTCTTACAGCCGTGAT 3'	N	370 pb	546-916
	Nr2	3'CACCACTTCGTCCTAAGA5'			
2	Nf3	5'CCCAAGGACATAGCCAACA3'	N	293 pb	619-912
	Nr3	3'TAACCCACCACTTCGTCC5'			
3	Ff1	5'ATGAACAGTTTAACATTACCAAGTGA3	F	193 pb	1127- 1320
	Fr1	5'CCACGATTTTTATTGGATGCTG3'			
4	Ff2	5'CACAAACAAGGCTGTAGTCA3'	F	546 pb	532-1078
	Fr2	5'GCTGTGGGAAGAAAGATACT3'			
5	Ff3	5'TTATACTCAACAATGCCAAAAAAACC3'	F	563 pb	361-924
	Fr3	5'GGTAATTGTACTACATATGCTAAGAC3'			
6	PF1	5'GTTTCAAAGAAGACCCTACAC 3'	P	237 pb	271-508
	PR1	5'TCCCGAGCAGATGTAGGT3'			
Cebadores para virus sincitial respiratorio (RSV) Subtipo A cepa Long					
7	Gf1	5'AACGCACCGCTAAGACAC3'	G	789 pb	35-824
	Gr1	5'-GAGGAGGTTGAGTGGAAG-3'			
8	Gf2	5'CCCAACATACCTCACTC3	G	549 pb	275-824
	Gr2	5'-GAGGAGGTTGAGTGGAAG-3'			
9	FWDGA3	5'GCCTCGGCAAACCACAAAGTCAC 3'	G	370 pb	202-572
	REVGA3	5'CAGATAGCCAGCAGGTTGGATTG 3'			
Cebadores para virus sincitial respiratorio (RSV) Subtipo B (B1) cp23 clona 1A2					
10	FWD GB1	5'GCCGAGCACAAAACCACGCC 3'	G	428 pb	435-863
	REVB1	5'GTAGAGGGCTCGGATGCTGTG 3'			
11	FWDGB2	5'CACAAGAATCAACGCACTGCCAGG 3'	G	295 pb	10-305
	REVB2	5'GATGAGCTAACCCCTTCTGGTGGG 3'			

La reacción se corrió en un termociclador de gradiente (Palm cyler), la reacción se calentó a 95°C durante 10 min, con la finalidad de eliminar la transcriptasa reversa que puede actuar como inhibidor de la polimerasa.

La amplificación de genes virales se llevó a cabo durante 37 ciclos a una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 50 seg, la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos se estableció por gradiente de temperatura y se realizó un gradiente de 3 puntos para cada uno de los genes virales (Tabla 2). La extensión fue a 72°C durante 50 seg y un ciclo final de 72°C por 10 min.

La amplificación para el gen de control interno fue  $\beta$ -Actina [72], las condiciones fueron 35 ciclos, a una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 40 seg, la extensión a 72°C durante 40 seg y un ciclo final de extensión a 72°C por 10 min.

Tabla 2. TM específicas a cada uno de los cebadores se les realizó un gradiente de 3 puntos donde la TM mostrada es la óptima.

Cebadores para virus sincitial respiratorio (hRSV) Generales.		
No.	Nombre	TM
1	Nf2	52°C
	Nr2	
2	Nf3	50°C
	Nr3	
3	Ff1	56°C
	Fr1	
4	Ff2	54°C
	Fr2	

5	Ff3	55°C
	Fr3	
6	PF1	52°C
	PR1	
Cebadores para virus sincitial respiratorio (RSV) Subtipo A cepa Long		
7	Gf1 (GA2)	55°C
	Gr1	
8	Gf2 (GA1)	55°C
	Gr2	
9	FWDGA3	58°C
	REVGA3	
Cebadores para virus sincitial respiratorio (RSV) Subtipo B (B1) cp23 clona 1A2		
10	FWD GB1	58°C
	REVGB1	
11	FWDGB2	58°C
	REVGB2	

Los productos de amplificación se observaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y se analizaron en un fotodocumentador de imágenes (Biorad), con un marcador de peso molecular FastRuler™ Low Range DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas Cat no. #SM1103)

## 6. RESULTADOS

### *A) Propagación del virus de referencia y título viral*

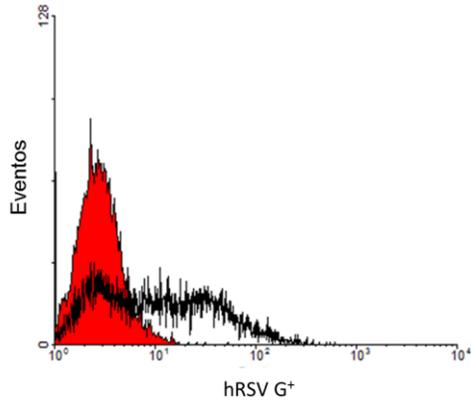
La propagación y título viral para la cepa Long se determinó en ambas líneas celulares A-549 y HEp-2 por TCID<sub>50</sub>. El título viral para la cepa Long en A-549 fue de  $6.18 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml y en HEp-2 de  $1.02918 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml y el título viral para el subtipo B (B1) cp23 clona 1A2 fue de  $2 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml. El título viral más alto se obtuvo en la línea celular HEp-2, por lo que se consideró a ésta línea como la de elección para la propagación y aislamiento viral a partir de las muestras clínicas.

### *B) Ensayos de FACS*

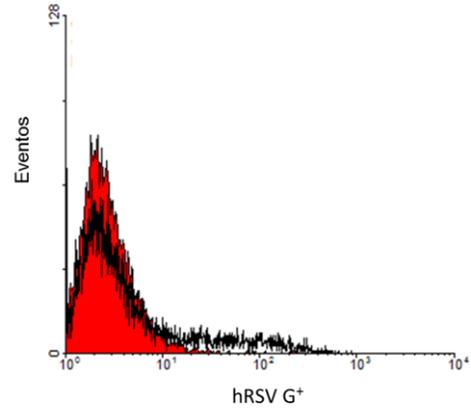
Para establecer la diferencia cuantitativa de expresión de antígeno viral entre ambas líneas celulares se decidió utilizar ensayos de citometría de flujo. Los resultados obtenidos demostraron que hubo un mayor número de células HEp-2 que expresó el antígeno viral en comparación con la línea A-549. Un 34.4% de células HEp-2 expresó el antígeno viral a una moi de 1, mientras que a la misma multiplicidad, las A-549 proporcionaron un 16%. Este resultado nos muestra concordancia con el título viral y confirma que la línea celular HEp-2 es la adecuada para el desarrollo del proyecto. Los resultados de citometría de flujo se muestran en la figura 6.

I)

a) HEp-2

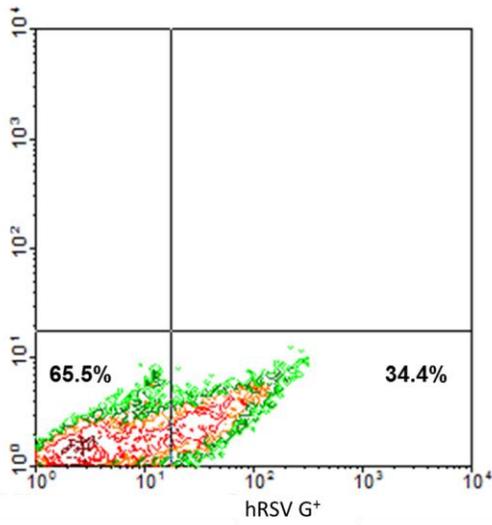


b) A-549



II)

c) HEp-2



d) A-549

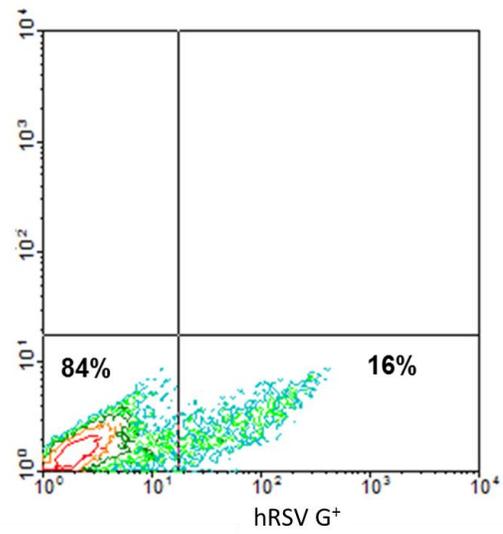
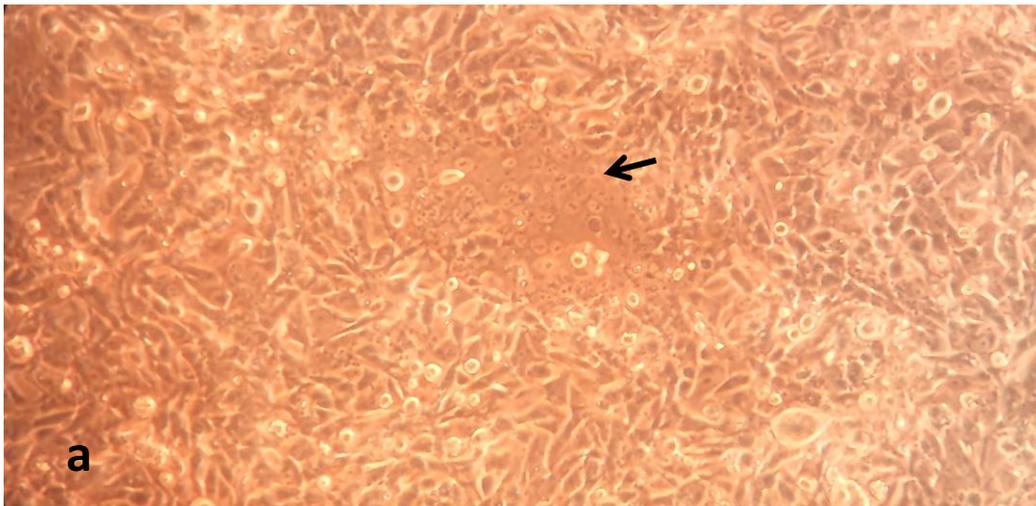


Figura 6. Ensayos de citometria de flujo de las líneas celulares HEp-2 y A-549 infectadas con hRSV. I) Intensidad de fluorescencia, en color rojo se muestra el control infectado que solo tiene el anticuerpo secundario, en color negro, células infectadas con anticuerpos primarios y secundarios. a) Células HEp-2 y b) Células A-549. II). Población infectada. c) Células HEp-2, y en d) células A-549. Claramente hay una tendencia que la población más susceptible para la infección con hRSV de referencia es la línea HEp-2, expresando un 34.4% a una moi de 1, mientras que a la misma multiplicidad en las A-549 solo hay un 16% de células infectadas.

### *C) Propagación del hRSV a partir de muestras clínicas*

Monocapas de células HEp-2 se infectaron con las muestras clínicas. A cada muestra se le dieron tres pases. Las muestras clínicas mostraron diferente efecto citopático y en algunos casos fue necesario incubar hasta por 10 días para observar los cambios morfológicos (Figura 7b).



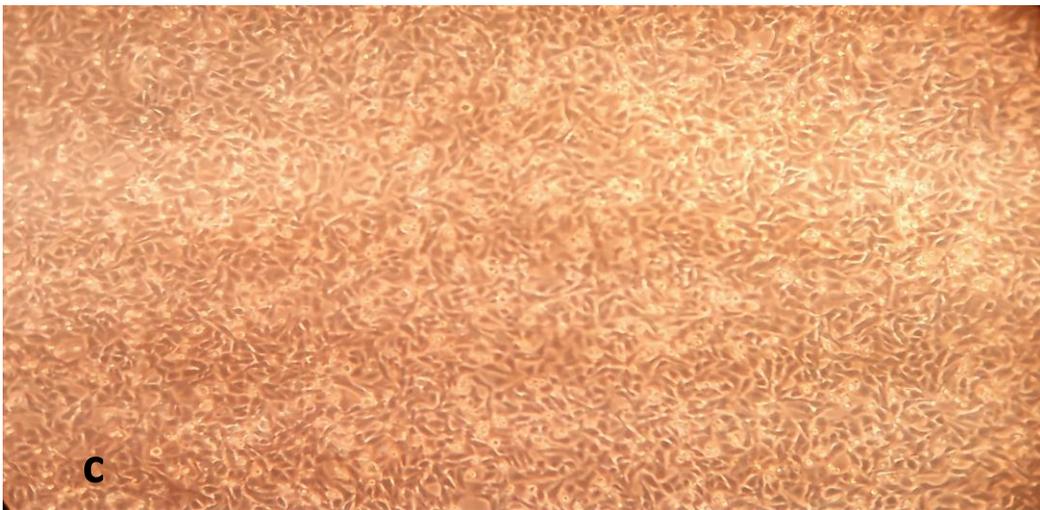
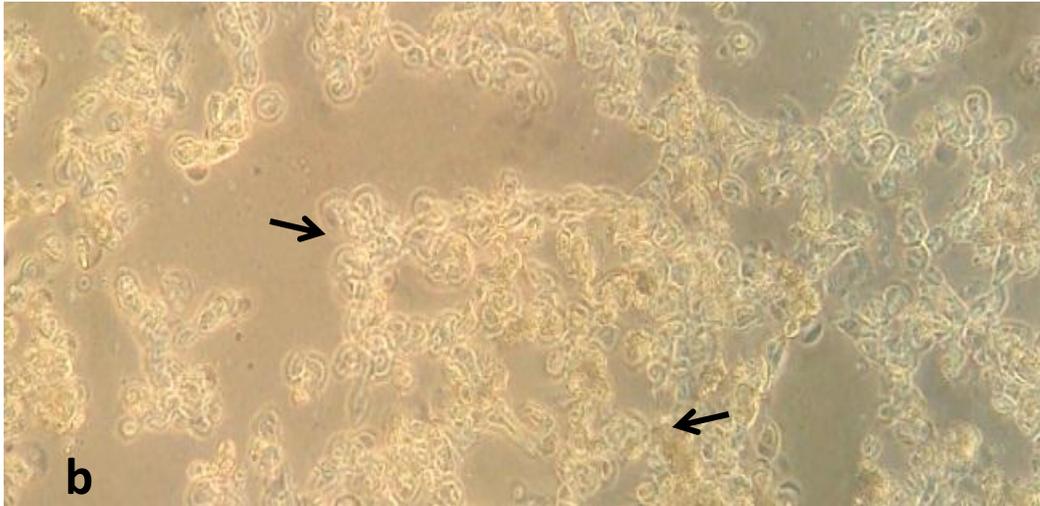


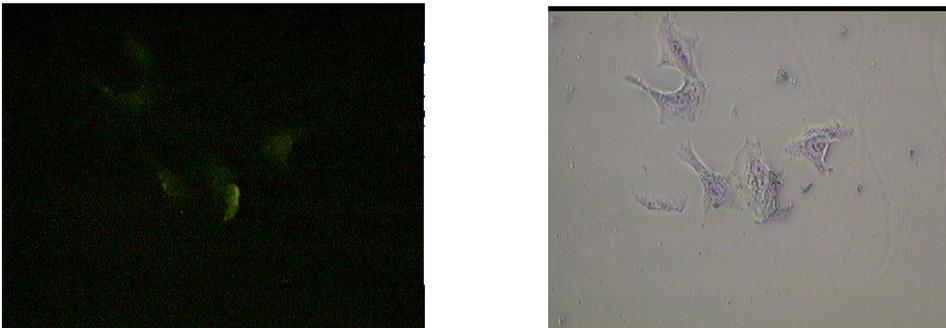
Figura 7. Comparación de efecto citopático a partir de hRSV de referencia y muestras clínicas a) Línea celular HEp-2 infectada con hRSV cepa Long. La flecha negra marca el efecto citopático característico. b) Línea celular HEp-2 infectada con muestras clínicas, la flecha negra marca el efecto citopático. c).Línea celular HEp-2 sin infectar

#### *D) Ensayos de inmunofluorescencia*

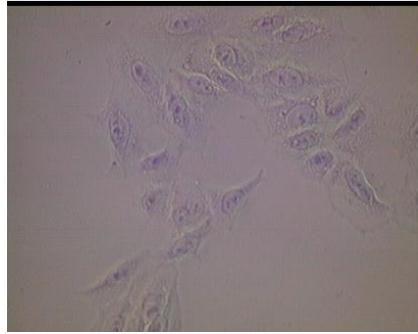
Los ensayos de IF directa e indirecta para hRSV se realizaron con la finalidad, primero, de estandarizar las condiciones óptimas del ensayo y seleccionar la metodología de mayor sensibilidad y mejor especificidad; segundo, tipificar las muestras clínicas. La IF directa resultó una mejor opción de acuerdo a la sensibilidad y especificidad; además el colorante de contraste (azul de Evans que emite una coloración roja o naranja) facilita la discriminación entre positivos y negativos. El fluorocromo (FITC) acoplado al anticuerpo primario de la IF directa emite una mejor señal que la del anticuerpo secundario de la IF indirecta.

En la figura 8, se muestran las diferencias entre (I) ensayos de IF indirecta y (II) directa. En la parte izquierda se observa el campo oscuro (con luz UV), y a la derecha se observa el campo claro (luz blanca).

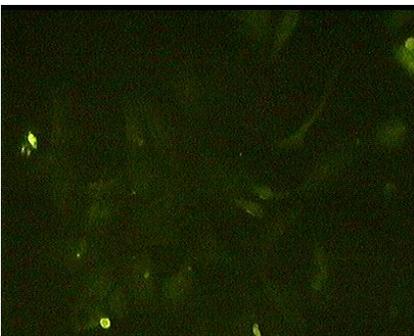
##### *I) inmunofluorescencia indirecta*



hRSV control positivo en HEp-2



Control de células HEp-2 sin infectar.

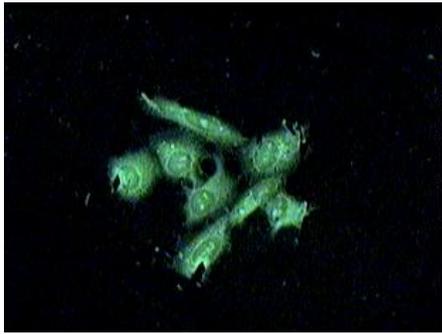


Muestra clínica en HEp-2 (1348)

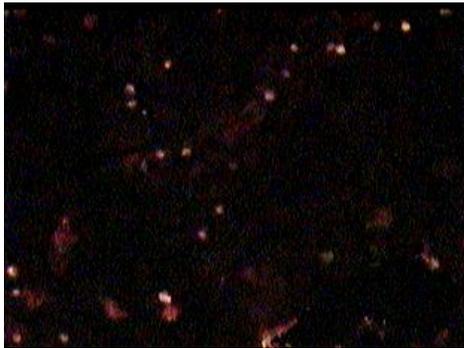


Muestra clínica en HEp-2 (1661)

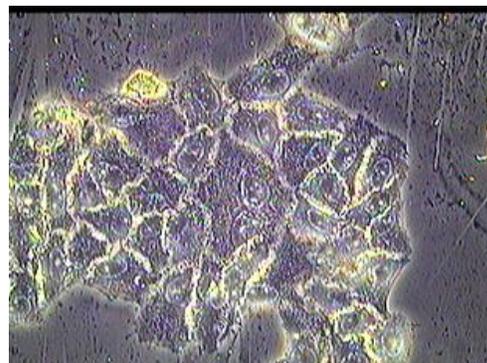
*II) Ensayos de inmunofluorescencia directa*



hRSV control positivo en HEp-2



Control de células HEp-2 sin infectar



Muestra clínica en HEp-2 (4514)

Figura 8. Ensayos de IF. I) IF indirecta. II) directa. Se observan diferentes muestras clínicas y los controles positivos y negativos.

En la tabla 3 se pueden observar los resultados de la tipificación por IF de todas las muestras.

Tabla 3. Resultados de la tipificación por inmunofluorescencia.

Muestra	Resultado	Muestra	Resultado
hRSV, cepa Long	Positivo	4208	Negativo
1344	Positivo	4510	Positivo
1348	Positivo	4112	Negativo
1162	Positivo	4593	Positivo
1202	Positivo	1589	Positivo
1222	Positivo	1326	Positivo
3101	Negativo	1905	Positivo
3102	Positivo	1661	Positivo
3112	Positivo	1099	Positivo
3114	Positivo	1032	Negativo
3115	Positivo	2187	Positivo
3152	Positivo	1325	Positivo
4130	Positivo	1335	Positivo
4514	Positivo	671	Positivo
4102	Negativo	2652	Negativo
4468	Negativo	1207	Negativo
4406	Negativo	1432	Positivo
4520	Negativo	1333	Positivo
4310	Negativo	2431	Positivo
3973	Negativo	control -	Negativo
4355	Positivo		

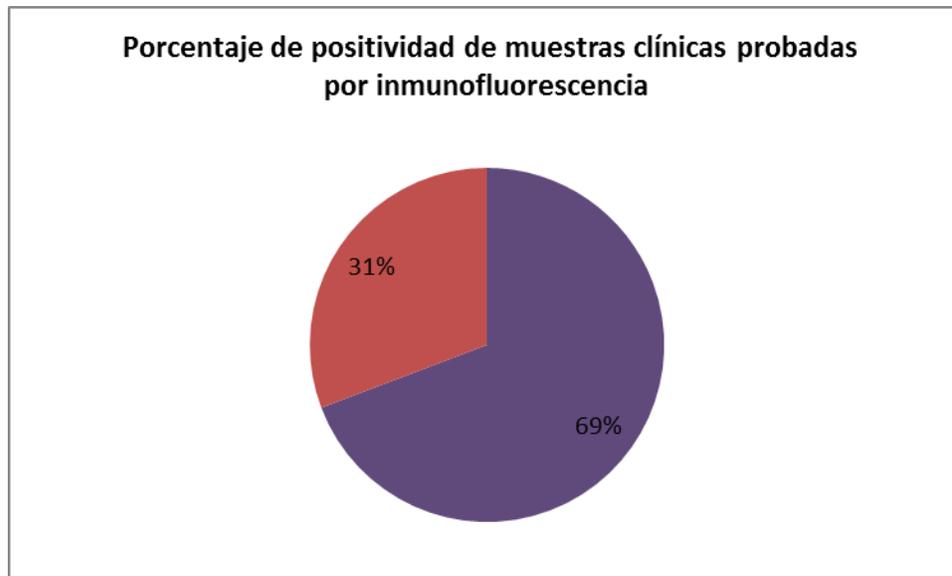


Grafico 2. Porcentaje de muestras positivas (púrpura) y negativas (rojo) para hRSV probadas por IF. De un total de 39 muestras, 27 muestras fueron positivas (69%) y 12 negativas (31%) para hRSV.

#### *E) Cinética de los genes N, P, F y G del hRSV de referencia*

Con la finalidad de establecer las condiciones óptimas de expresión de mensajeros virales para la genotipificación de los subtipos virales, se realizó una cinética de infección de 18, 24 y 36 h para evaluar los genes N, P, F y G del hRSV cepa Long. Los resultados obtenidos de la cinética de infección en los puntos correspondientes a 18 y 24 h pos-infección mostraron la amplificación de los genes virales N, P. Este dato coincide con el orden de estos genes en el genoma viral y por lo tanto con la síntesis de los RNA mensajeros. Se logró también la amplificación del gen F pero no del gen G, a estos tiempos lo que llamó nuestra atención ya que en el genoma viral, el gen g se localiza antes que el F (Figura 9). La amplificación se logró luego de 36 h de infección (Figura 10). Con esto se sugieren los siguientes posibles eventos: 1) Existe un menor número de copias de

mRNA de G en comparación con N, P y F, a las 18 y 24 h. 2) Pudo haber degradación de mRNA de G. 3) La región seleccionada para la amplificación de G pudo no haber sido seleccionada adecuadamente por los cebadores y por tanto no existen tantas copias amplificadas en el proceso de PCR como en los otros genes.



Figura 9. Cinética de expresión de genes virales. Se realizó una cinética de expresión de los mensajeros virales de los genes N, P, F y G. La amplificación se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en la sección de material y métodos. PM, corresponde a los marcadores de peso molecular (expresado en pares de bases), N, P, F y G (genes virales), corresponden a las bandas de amplificación N (371pb), P (235 pb), F (182 pb) y G (550 pb), la posición del amplificado se señala con la flecha negra. De color naranja, la región que debiese estar amplificada en la misma proporción que en los otros genes a las 18 y 24h.

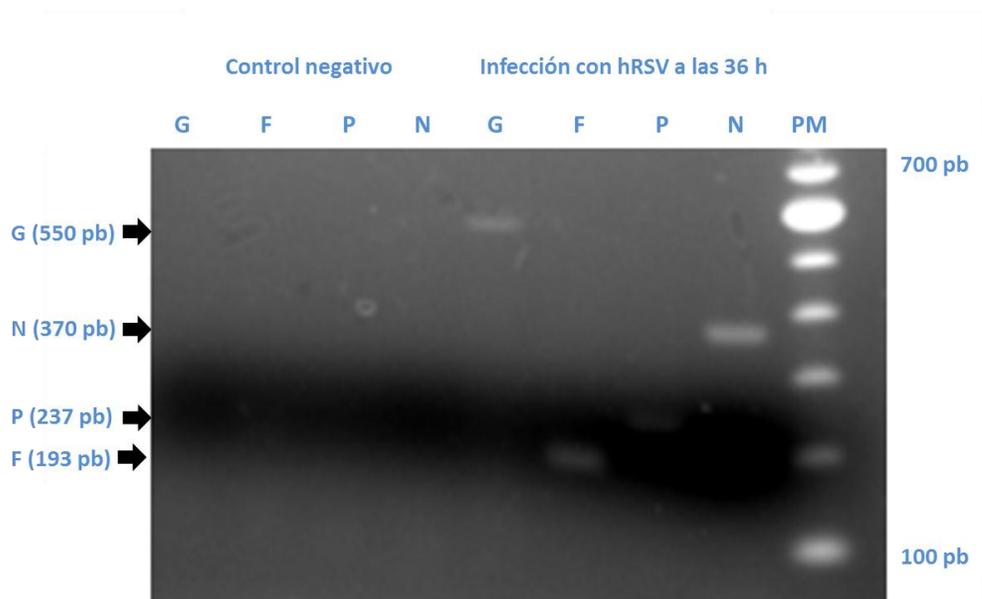


Figura 10. Amplificación del gen G de hRSV a las 36h. El ensayo de amplificación se describe en la sección de material y métodos. PM, corresponde a los marcadores de peso molecular, N, P, F y G (genes virales). La posición del amplificado se señala con la flecha negra.

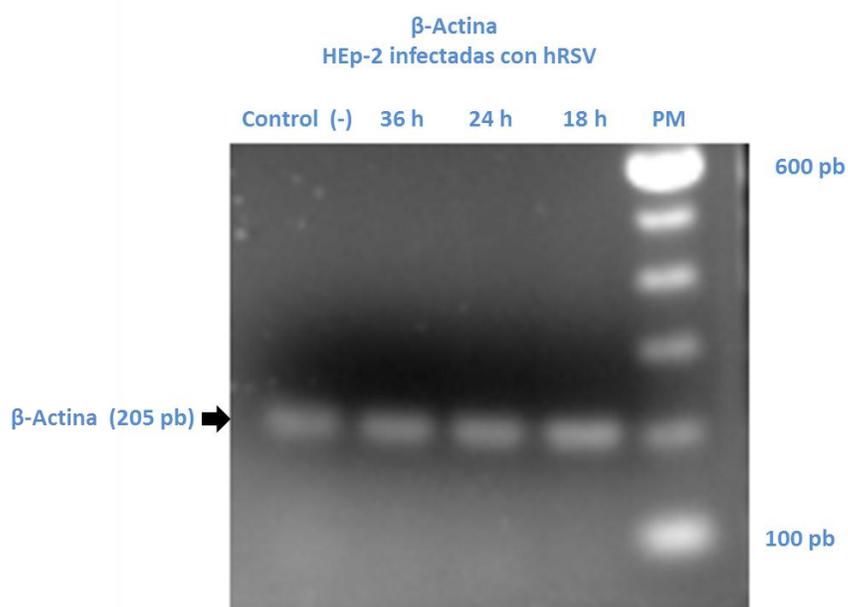


Figura 11. Control de reacción  $\beta$ -Actina en la línea celular HEp-2. La posición del amplificado se señala con la flecha negra. La amplificación del gen de actina como control interno se describe en la sección de material y métodos. PM corresponde al marcador de peso molecular. 18, 24 y 36 h representan los tiempos pos-infección con hRSV. Control (-), son células HEp-2 sin infectar.

*F) Cebadores para hRSV A y hRSV B*

Para llevar a cabo la genotipificación de hRSV se diseñaron oligonucleótidos específicos. Los genes seleccionados fueron: N, P, F y G, de los cuales N, P, y F se diseñaron para determinar la presencia del virus y G para identificar el subgrupo. Posterior al diseño se probaron los diferentes cebadores en ambas cepas Long para el subtipo A y B1, para el subtipo B. Los resultados obtenidos mostraron que los oligonucleótidos seleccionados para la amplificación de los genes N2, N3, P1, F3, GA1, GA2, GA3, permitieron llevar a cabo la identificación de hRSV del subgrupo A pero no del B, solo el oligonucleótido GB2 pudo detectar la presencia del subtipo B (tabla 4). El par de oligonucleótidos F1 o F2, pueden ser utilizados para la identificación de hRSV. Es importante mencionar que el uso de estos pares de oligonucleótidos permitieron la amplificación de los genes en estudio desde las 18 h pos-infección, obteniendo mejores amplificadas a las 36 h.

Nombre	RSV A	RSV B	Nombre	RSV A	RSV B
<b>N</b>			<b>F</b>		
N2	Positivo	negativo	F3	Positivo	negativo
N3	Positivo	negativo	<b>G</b>		
<b>P</b>			GA1	Positivo	negativo
P1	Positivo	negativo	GA2	Positivo	negativo
<b>F</b>			GA3	Positivo	negativo
F1	Positivo	Positivo	GB1	Negativo	negativo
F2	Positivo	Positivo	GB2	Negativo	Positivo

Tabla 4. Identificación de los subgrupos A y B de cepas de referencia del hRSV. Este proceso se realizó por mediante el uso de distintos cebadores.

### *G) Genotipificación de muestras clínicas*

De acuerdo con los resultados obtenidos para las cepas de referencia A y B, se eligieron a los oligonucleótidos F1 y F2 para la identificación de hRSV y para la subtipificación en subgrupos virales se utilizaron 3 pares de oligonucleótidos para el subgrupo A, GA1, GA2 y GA3, (la selección estuvo basada en los resultados de las muestras clínicas pues al probar N2, N3, P1 y F3, la obtención de amplificadores no fue tan eficiente como con los oligonucleótidos de G) y para el subgrupo B, GB1. Con respecto a estos resultados es fundamental señalar, que la selección de estos oligonucleótidos permitió la obtención de productos de amplificación que correspondían al tamaño de fragmento esperado, pero además fue posible identificar otros amplificadores, que sugieren la presencia de variantes virales en el gen. Es importante mencionar que el análisis se realizó en muestras que resultaron positivas y negativas por IF, esto se hizo con la finalidad de incluir posibles falsos negativos por IF.

Los siguientes geles de agarosa son representativos de cada uno de los cebadores utilizados, en rojo se marca la banda que se esperaba ver en las muestras clínicas en relación con el virus de referencia

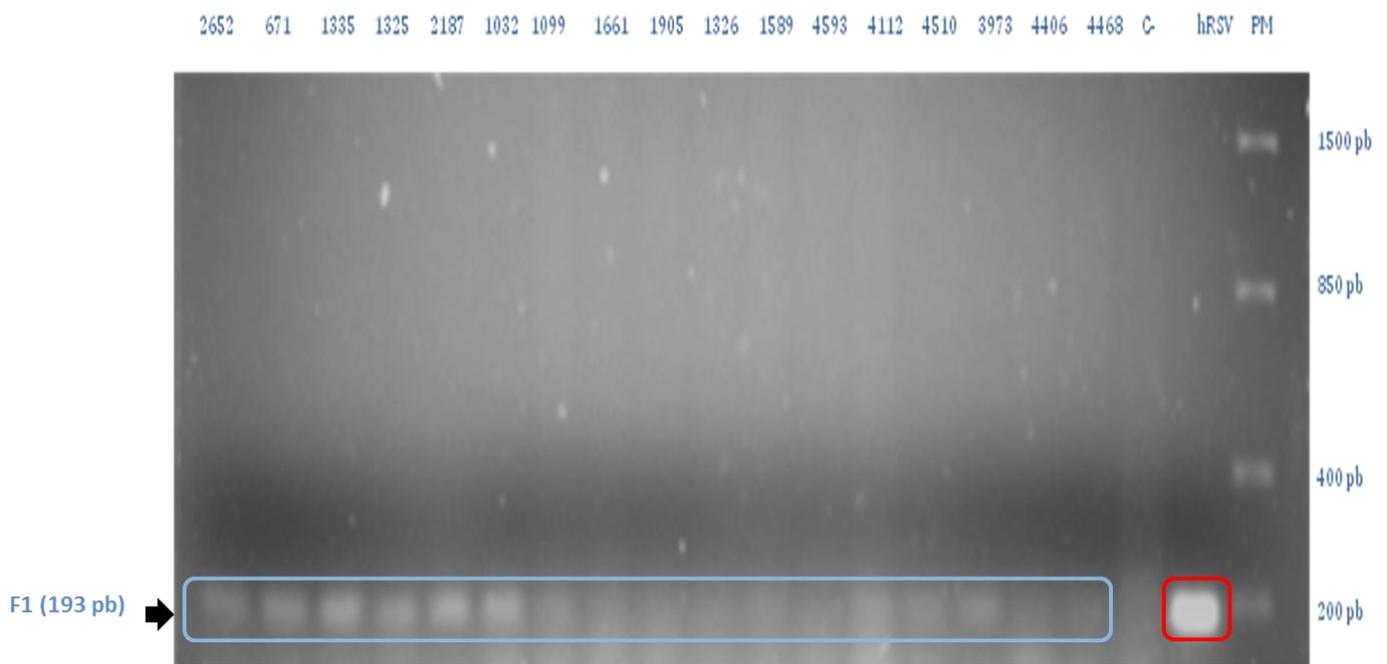
#### Amplificaciones de F.

Para la tipificación de las muestras clínicas se utilizaron dos pares de oligonucleótidos F1 y F2, los resultados obtenidos mostraron que para el caso de F1 se obtuvieron un total de 24 muestras positivas, de éstas, 7 fueron negativas por IF, lo cual corrobora la falta de sensibilidad de esta prueba. Respecto a F2, del

total de muestras analizadas sólo se logró amplificar la muestra 1202, lo que sugiere posibles cambios en esta región de amplificación.

En la figura 12 se muestran los geles representativos de los cebadores F1 y F2, en rojo se marca la banda que se esperaría ver en las muestras clínicas en relación con el virus de referencia.

### Cebador F1 (193 pb)



## Cebador F2 (546 pb)



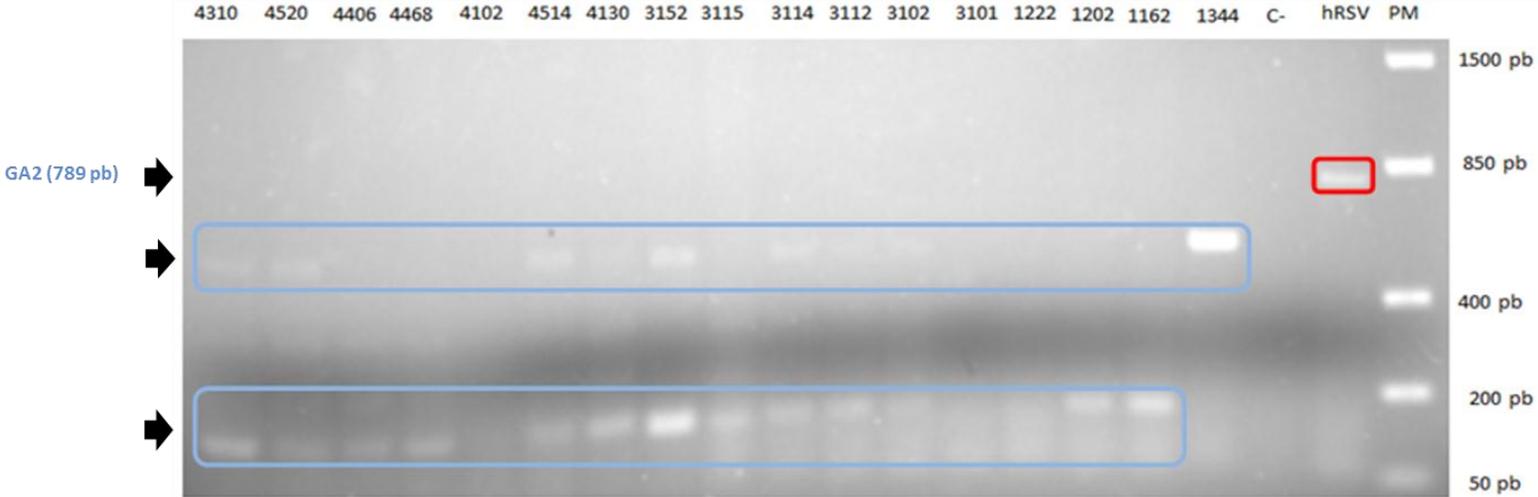
Figura 12 Cebadores para el gen F del hRSV. Se observan los amplificados con los cebadores F1 y F2, el rectángulo rojo representa el peso de la cepa de referencia, el rectángulo azul representa las muestras clínicas. La posición del amplificado se señala con la flecha negra.

## Amplificaciones del gen G

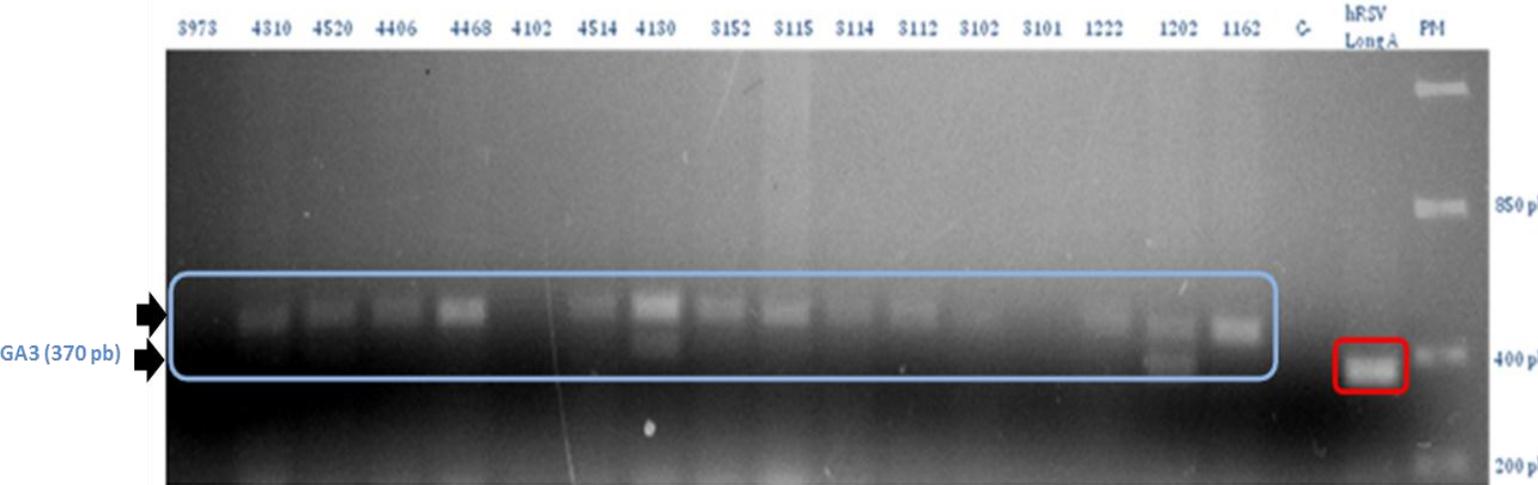
Para evaluar los subgrupos y la generación de variantes virales para el gen que codifica para la proteína G se evaluaron 3 cebadores de G subtipo A y 1 para subtipo B. Las variantes que se observaron repitieron el patrón prácticamente en todas las muestras que fueron positivas para ese cebador. En el caso de GA1 (549pb) se observó que solo una muestra fue positiva, 38 negativas y no se observaron fragmentos de diferente tamaño al peso esperado para GA1. Sin embargo, para GA2 (789 pb), hubo 29 muestras positivas y 10 negativas, además, se detectaron dos amplificaciones distintas en el mismo gel con las muestras



**Cebador GA2 (789 pb)**



**Cebador GA3 (370 pb)**



## Cebador GB2 (295 pb)

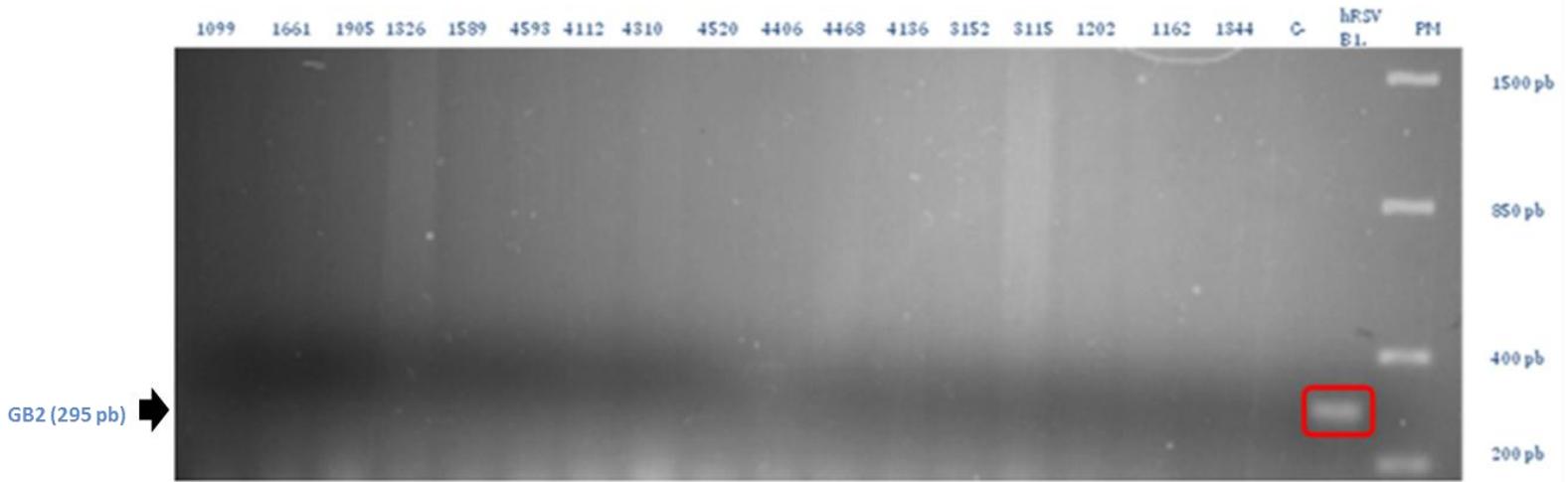


Figura 13. Amplificados de G subtipo A y subtipo B. El rectángulo rojo representa el peso de la cepa de referencia, el rectángulo azul representa las muestras clínicas y sus variantes. El rectángulo verde representa el control interno  $\beta$ -actina ( $\beta$ -ac).

Gráficamente se puede expresar así:

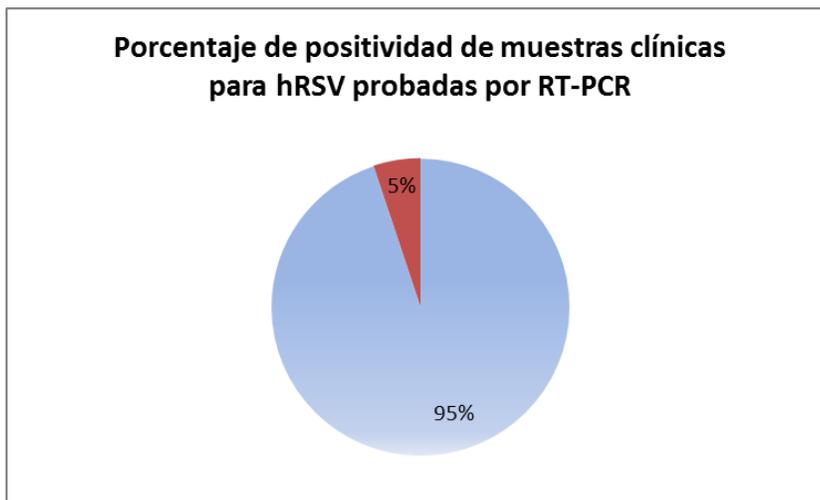


Gráfico 4. Porcentaje de muestras clínicas probadas para hRSV por medio de ensayos de RT-PCR. Se obtuvo un total de 37 muestras positivas (95%) mostradas en color azul y 2 negativas (5%) mostradas en color rojo.

Realizando una comparación de los ensayos de RT-PCR, se observó, que un 79% de las muestras clínicas resultaron ser del subgrupo A. Un 16 % se identificó como hRSV sin saber el subgrupo y el 5% del total de las muestras resultaron sin amplificación para cualquiera de los cebadores utilizados (Grafico 5). En el anexo I-B, se puede observar el resultado de cada uno de los cebadores utilizados para cada muestra clínica.

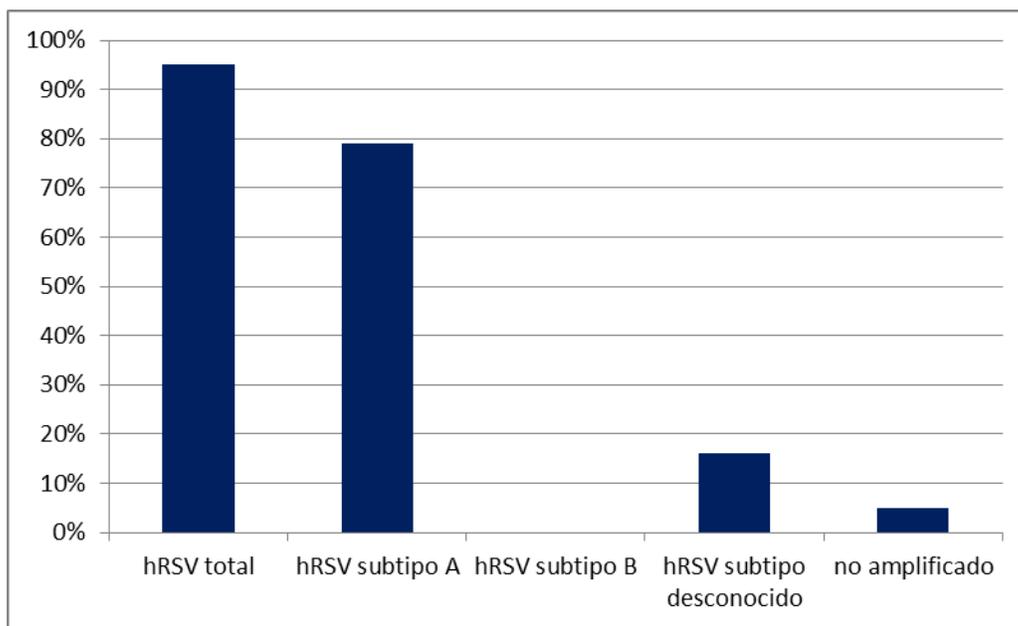


Grafico 5. Comparación de resultados por medio de RT-PCR. De un total de 39 muestras clínicas, se obtuvieron 37 muestras positivas para hRSV (95%). El 79% correspondió a hRSV subtipo A. No se obtuvo ningún amplificado del subtipo B. Un 16% (6 muestras) del total de muestras amplificadas (37 muestras), fue positivo para hRSV pero sin amplificación con los cebadores del subgrupo A o B. Y solo el 5% (2 muestras) no amplificó para ninguno de los cebadores utilizados.

Si se compara cada una de las técnicas utilizadas para la identificación del hRSV incluyendo el aislamiento y observación del efecto citopático (la cual tiene un margen de error amplio), se pueden obtener diferentes rendimientos (Grafico 6). Estos resultados pueden observarse de mejor forma en el anexo I-B.

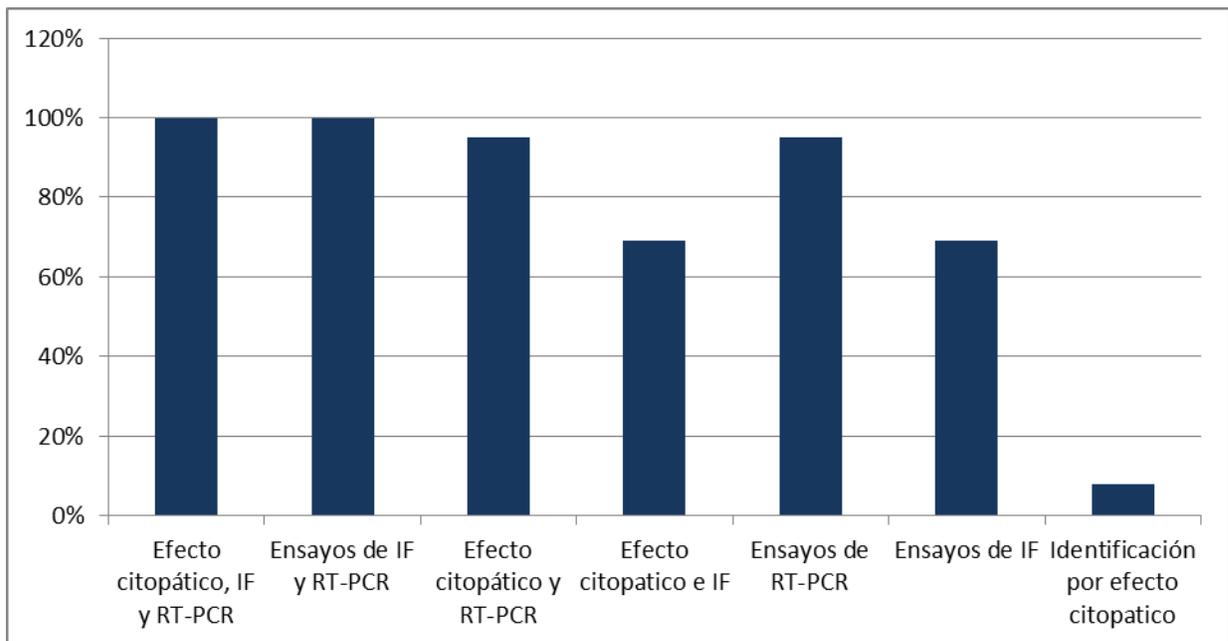


Grafico 6. Comparación de rendimiento de diferentes técnicas para la detección del hRSV. Se observa que al utilizar todas las técnicas o solo la IF y el RT-PCR combinados se puede alcanzar el 100% de rendimiento para detectar hRSV. Sin embargo solo el RT-PCR es la única técnica que identifica el subtipo de hRSV.

## 7. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las líneas celulares humanas de epitelio respiratorio (HEp-2) son las más permisivas y eficientes para poder propagar hRSV *in vitro*. El hRSV puede infectar a más de un tipo celular como linfocitos, monocitos y células dendríticas [73], por esa razón se probó propagar el hRSV en dos líneas celulares epiteliales diferentes que simularían lo que pasa *in vivo* con el fin de obtener mejores rendimientos del título viral y de material genético. De acuerdo a los resultados de titulación y de citometría de flujo, las A-549 (de origen alveolar) fueron menos permisivas para el hRSV mientras que con las HEp-2 (de origen de carcinoma de laringe) se obtuvo un mejor rendimiento en producción viral. Esto concuerda con lo reportado por Fields, B [1] pues la línea HEp-2 se considera la más eficiente para la replicación del hRSV. En este trabajo, las muestras clínicas no mostraron el efecto citopático característico de formación sincitios como los observados en el virus de referencia, por lo que no fue posible realizar la titulación del hRSV en muestras clínicas. Estos datos coinciden con lo reportado por Villenave y colaboradores en 2003; en ese trabajo, se realizaron comparaciones de citopatología, filogenia y cinéticas de crecimiento entre muestras clínicas y la cepa de referencia RSV A2. Los resultados demostraron que no es adecuada la comparación entre la cepa de referencia, que está adaptada por múltiples pases en una línea celular permisiva *versus* las muestras clínicas que no han tenido un proceso de adaptación, por lo tanto demostraron diferencias entre citopatología, cinética de crecimiento y filogenia [74]. Estos resultados se equiparan a los obtenidos en este trabajo, por ello resultó indispensable realizar pruebas que tuvieran una mayor sensibilidad

como IF y RT-PCR. Para saber los tiempos óptimos de infección con hRSV en la línea HEp-2 y obtener una concentración óptima de mRNA, se realizó una cinética que consistió de tres puntos 18, 24 y 36 h, los resultados demostraron que a las 36 h pos-infección se lograron amplificar todos los genes en cantidades suficientes para su detección por RT-PCR, una vez establecido el tiempo óptimo de infección para la amplificación de los fragmentos de genes se prosiguió a comparar el rendimiento entre la IF y el RT-PCR. De acuerdo con los resultados obtenidos se aprecia una mayor sensibilidad del RT-PCR con respecto a la técnica de IF, ya que si se comparan ambos, la IF puede dar falsos negativos, debido a la existencia de variantes virales, a una concentración insuficiente de antígeno o que el estado de la muestra no era el óptimo. La técnica de RT-PCR detectó la existencia del hRSV en la mayoría de muestras de los pacientes con IRAs, incluso en los ensayos de IF que resultaron negativos, estos datos concuerdan con lo descrito por Gueudin M en 2003 [75], en el que se realizó la detección de hRSV en 75 aspirados nasales de niños, por medio de IF, cultivo celular y RT-PCR tiempo real dando altos valores de sensibilidad por la RT-PCR (IF-82%, cultivo-80%, RT-PCR 100%). Aunque los valores para el RT-PCR son en tiempo real, el principio de la técnica es el mismo para la RT-PCR punto final. Así mismo David D en 2002 [76], a partir de cerebros de cadáveres humanos descompuestos recolectados entre 1998 y 2000, en Israel, realizaron el diagnóstico de rabia por medio de IF y RT-PCR, encontrando que 10 cadáveres fueron negativos a rabia por medio de IF y 7 de esos 10 fueron positivos a rabia por RT-PCR, la confirmación de estos amplificados se realizó por secuenciación del gen N. Estos resultados demuestran

la importancia de la RT-PCR en la detección de diferentes virus donde otro tipo de análisis (cultivo celular e IF), resultan negativos. Ahora bien, en este estudio, las muestras clínicas 1333 y 4355 resultaron ser negativas en la técnica de RT-PCR, pero no así para los ensayos de IF, esto pudo deberse a que el par GB no pudo alinearse con su gen, debido a la variabilidad genética del hRSV en esas muestras clínicas, por ello se pueden realizar nuevos cebadores para el subtipo B en una región diferente. De manera similar esto sucedió con las muestras 1348, 3101, 4102, 3973, 4208 y 4510, donde si bien el cebador F1 pudo detectar la presencia del hRSV, los distintos cebadores de G no pudieron detectar el subtipo, pues probablemente dichas muestras tengan variaciones en las regiones de alineamiento de los cebadores de G.

El cebador GA3 en la amplificación de las muestras clínicas obtuvo fragmentos por encima del peso esperado (el peso esperado era de 370 pb y se obtuvieron fragmentos de 370 y de 430 pb aproximadamente). En el caso del cebador GA2, los fragmentos fueron de menor peso (peso esperado de 789 pb, peso obtenido 630 y 195 pb aproximadamente). Para cada una de las muestras se aprecian variaciones en los pesos en tanto el cebador de GA3 demuestra duplicaciones de bandas de distintos pesos pero cercanos; en GA2 obtuvimos diversos fragmentos que se consideran importantes. Respecto a la proteína G ésta es capaz de dar cambios drásticos en su estructura, lo que se ha observado en cultivos celulares y en modelos *in vivo*, en el escape de mutantes con varios anticuerpos monoclonales lo que ha originado nuevas variantes incluyendo una cepa de B con una duplicación de 60 nucleótidos, esta cepa fue reportada por primera vez en

Buenos Aires en 1999 y posteriormente en muestras de Madrid de 1998 [77], posteriormente ha circulado en todo el mundo indicando una ventaja selectiva de esta variante. Estos cambios son introducidos en la secuencia del gen G mientras el virus se replica en forma natural en su hospedero. Además, en otras investigaciones se ha demostrado la variación intrapaciente donde el hRSV presenta múltiples cambios en G en un solo hospedero. En ese trabajo Agoti y colaboradores en 2010, secuenciaron 100 muestras de pacientes, las cuales resultaron positivas a hRSV subtipo B, todas tenían la adición de 60 nucleótidos reportada en Buenos Aires, sin embargo en algunos de estos especímenes se encontraron variaciones de bases en algunas posiciones a 3 de las 100 muestras se les hizo un análisis más minucioso resultando que la proteína G tenía 310 aminoácidos, presentando una delección de 6 nucleótidos, además de ello se encontraron mutaciones (T-C) en el nucleótido 264 y duplicaciones (8 nucleótidos en la posición 599) [78]. Estos datos aportan una propuesta, para el caso de las muestras amplificadas con el par GA3, se determinaron duplicaciones de nucleótidos o variantes con incremento en su secuencia del gen G, en el caso de GA2 se pudiera considerar algo similar sin embargo esto pudiese tratarse de variantes truncas del virus. Por ello, se considera que es necesario un análisis en la secuencia de estos amplificados para saber qué tipo de variantes se están presentando en la población infantil mexicana.

## 8. CONCLUSIONES

- En base a la variación observada en cuanto al tamaño de los RNA mensajeros, se deduce que en la población infantil mexicana, existen variantes genéticas del hRSV, con respecto a los modelos de referencia (cepa Long).
- Las técnicas moleculares como el RT-PCR, si son bien diseñadas y estandarizadas, proporcionan resultados más confiables en comparación con las técnicas convencionales para detectar hRSV como técnicas de IF o la inducción de efecto citopático en líneas celulares.
- De los datos proporcionados acerca de la fecha de ingreso de los pacientes por cuadros respiratorios, en los años 2004, 2006 y del 2008-2010 en la mayoría de los casos el hRSV circula en México en estaciones de otoño, invierno y primavera.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields virology*. 5th ed 2007, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
2. Collins, P.L., M.G. Hill, and P.R. Johnson, *The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro*. J Gen Virol, 1990. **71 ( Pt 12)**: p. 3015-20.
3. Fodha, I., et al., *Molecular diversity of the aminoterminal region of the G protein gene of human respiratory syncytial virus subgroup B*. Pathol Biol (Paris), 2008. **56(2)**: p. 50-7.
4. Lundin, A., et al., *Two novel fusion inhibitors of human respiratory syncytial virus*. Antiviral Res, 2010. **88(3)**: p. 317-24.
5. Aguilar, H.C. and B. Lee, *Emerging paramyxoviruses: molecular mechanisms and antiviral strategies*. Expert Rev Mol Med, 2011. **13**: p. e6.
6. McGivern, D.R., P.L. Collins, and R. Fearn, *Identification of internal sequences in the 3' leader region of human respiratory syncytial virus that enhance transcription and confer replication processivity*. J Virol, 2005. **79(4)**: p. 2449-60.
7. Kuo, L., Grosfeld, H., Cristina, J., Hill, M.G., Collins, P.L, *Effect of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus*. J. Virol. . 1996. **70(10)**: p. 6892-6901.
8. Collins, P.L., Olmsted, R.A., Spriggs, M.K., Johnson, P.R., Buckler-White, A.J, *Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymeraseL gene of human respiratory syncytial virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 1987. **84(15)**: p. 5134-5138.
9. Fearn, R., Collins, P.L, *Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus*. J. Virol. , 1999. **73(1)**: p. 388-397.
10. Lamarre P, S.L., , Bordeleau E, Landry J, Rancourt S, Fazal J and B. Simoneau, *Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylylation by viral RNA-dependent RNA polymerase*. J. Virol. , 2005. **79(20)**: p. 13105-13115.
11. Collins PL, M.J., *Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years*. Virus Res. , 2011. **162(1-2)**: p. 80-99.
12. Tawar, R.G., et al., *Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus*. Science, 2009. **326(5957)**: p. 1279-83.
13. Coronel E, T.T., Murti K, Varich N, Portner A., *Nucleocapsid incorporation into parainfluenza virus is regulated by specific interaction with matrix protein*. J Virol. , 2001. **75(3)**: p. 1117-1123.
14. Megan S. Harrisona, T.S., and Anthony P. Schmitta, *Paramyxovirus Assembly and Budding: Building Particles that Transmit Infections*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42(9)**: p. 1416–1429.
15. Resch, B., S. Kurath, and P. Manzoni, *Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in preterm infants*. Open Microbiol J, 2011. **5**: p. 135-43.
16. Schmitt AP, H.B., Lamb RA., *Involvement of the cytoplasmic domain of the hemagglutininneuraminidase protein in assembly of the paramyxovirus simian virus 5*. J Virol., 1999. **73(10)**: p. 8703-8712.
17. Schmitt, A.P., et al., *Evidence for a new viral late-domain core sequence, FPIV, necessary for budding of a paramyxovirus*. J Virol, 2005. **79(5)**: p. 2988-97.

18. Ghildyal R, L.D., Peroulis I, Shields B, Bardin PG, Teng MN, Collins PL, Meanger J, Mills J., *Interaction between the respiratory syncytial virus G glycoprotein cytoplasmic domain and the matrix protein.* J Gen Virol, 2005. **86**(7): p. 1879-1884.
19. Markwell MA, F.C., *Protein-protein interactions within paramyxoviruses identified by native disulfide bonding or reversible chemical cross-linking.* J Virol. , 1980. **33**(1): p. 152-166.
20. Iwasaki, M., et al., *The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein.* J Virol, 2009. **83**(20): p. 10374-83.
21. Mitra R, B.P., Duncan-Decocq RR, Patel D, Oomens AG., *The Human Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Required for Maturation of Viral Filaments.* J Virol. , 2012.
22. Tripp, R.A., *Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection.* Viral Immunol, 2004. **17**(2): p. 165-81.
23. Griese, M., *Respiratory syncytial virus and pulmonary surfactant.* Viral Immunol, 2002. **15**(2): p. 357-63.
24. Sano, H., et al., *Lactoferrin and surfactant protein A exhibit distinct binding specificity to F protein and differently modulate respiratory syncytial virus infection.* Eur J Immunol, 2003. **33**(10): p. 2894-902.
25. Fainboim L, G.J., *Introducción a la Inmunología Humana.* 6ª2011, Argentina: Panamericana.
26. Ghildyal, R., et al., *Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion infectivity.* J Infect Dis, 1999. **180**(6): p. 2009-13.
27. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition in the innate immune response.* Biochem J, 2009. **420**(1): p. 1-16.
28. Schlender, J., et al., *Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus.* J Virol, 2005. **79**(9): p. 5507-15.
29. Abbas A, L.A., Pillai S. , *Inmunología celular y molecular*, ed. 62008, España: Elsevier.
30. Haeberle, H.A., et al., *Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways.* J Infect Dis, 2002. **186**(9): p. 1199-206.
31. Zhang, Y., et al., *Expression of respiratory syncytial virus-induced chemokine gene networks in lower airway epithelial cells revealed by cDNA microarrays.* J Virol, 2001. **75**(19): p. 9044-58.
32. Domachowske, J.B., C.A. Bonville, and H.F. Rosenberg, *Gene expression in epithelial cells in response to pneumovirus infection.* Respir Res, 2001. **2**(4): p. 225-33.
33. Popow-Kraupp T, L.E., Kellner G, Kunz C, *Immunoglobulin-class-specific immune response to respiratory syncytial virus structural proteins in infants, children, and adults.* J Med Virol 1989. **27**(3): p. 215-223.
34. Falsey A, S.H., Walsh E, *Serum antibody decay in adults following natural respiratory syncytial virus infection.* J Med Virol 2006. **78**(11): p. 1493-1497.
35. Mills J, V.K.J., Wright P, Chanock R, *Experimental respiratory syncytial virus infection of adults. Possible mechanisms of resistance to infection and illness.* J Immunol 1971. **107**(1): p. 123-130.
36. Crowe, J.E., Jr., et al., *Genetic and structural determinants of virus neutralizing antibodies.* Immunol Res, 2001. **23**(2-3): p. 135-45.

37. Falsey A, W.E., Looney R, Kolassa J, Formica M, Criddle M, , *Comparison of respiratory syncytial virus humoral immunity and response to infection in young and elderly adults.* J Med Virol 1999. **59**(2): p. 221-226.
38. Walsh, E.E. and A.R. Falsey, *Age related differences in humoral immune response to respiratory syncytial virus infection in adults.* J Med Virol, 2004. **73**(2): p. 295-9.
39. Gardner, E.M. and D.M. Murasko, *Age-related changes in Type 1 and Type 2 cytokine production in humans.* Biogerontology, 2002. **3**(5): p. 271-90.
40. Chiba, Y., et al., *Development of cell-mediated cytotoxic immunity to respiratory syncytial virus in human infants following naturally acquired infection.* J Med Virol, 1989. **28**(3): p. 133-9.
41. Isaacs, D., C.R. Bangham, and A.J. McMichael, *Cell-mediated cytotoxic response to respiratory syncytial virus in infants with bronchiolitis.* Lancet, 1987. **2**(8562): p. 769-71.
42. Bangham C, O.L., *Human and murine cytotoxic T cells specific to respiratory syncytial virus recognize the viral nucleoprotein (N), but not the major glycoprotein (G), expressed by vaccinia virus recombinants.* J. Immunol. , 1986. **137**: p. 3973-3977.
43. Cherrie, A.H., et al., *Human cytotoxic T cells stimulated by antigen on dendritic cells recognize the N, SH, F, M, 22K, and 1b proteins of respiratory syncytial virus.* J Virol, 1992. **66**(4): p. 2102-10.
44. Nicholas, J.A., et al., *Cytolytic T-lymphocyte responses to respiratory syncytial virus: effector cell phenotype and target proteins.* J Virol, 1990. **64**(9): p. 4232-41.
45. Boelen, A., et al., *Effect of lack of interleukin-4, interleukin-12, interleukin-18, or the interferon-gamma receptor on virus replication, cytokine response, and lung pathology during respiratory syncytial virus infection in mice.* J Med Virol, 2002. **66**(4): p. 552-560.
46. Durbin, J.E., et al., *The role of IFN in respiratory syncytial virus pathogenesis.* J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2944-52.
47. Hussell, T., et al., *CD8+ T cells control Th2-driven pathology during pulmonary respiratory syncytial virus infection.* Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3341-9.
48. Shay DK, H.R., Roosevelt GE, Clarke MJ, Anderson LJ., *Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus-associated deaths among US children, 1979-1997.* J Infect Dis, 2001. **183**(1): p. 16-22.
49. Bueno, S.M., et al., *Host immunity during RSV pathogenesis.* Int Immunopharmacol, 2008. **8**(10): p. 1320-9.
50. Glezen, W.P., et al., *Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus.* Am J Dis Child, 1986. **140**(6): p. 543-6.
51. Simoes, E.A., *Respiratory syncytial virus infection.* Lancet, 1999. **354**(9181): p. 847-52.
52. Arnold, S.R., et al., *Variable morbidity of respiratory syncytial virus infection in patients with underlying lung disease: a review of the PICNIC RSV database.* Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada. Pediatr Infect Dis J, 1999. **18**(10): p. 866-9.
53. Wilkesmann A, A.R., Schildgen O, Eis-Hübinger AM, Müller A, Seidenberg J, Stephan V, Rieger C, Herting E, Wygold T, Hornschuh F, Groothuis JR, Simon A., *Hospitalized children with respiratory syncytial virus infection and neuromuscular impairment face an increased risk of a complicated course.* Pediatr Infect Dis J. , 2007. **26**(6): p. 485-491.
54. Resch B, G.W., Müller WD, Haas J., *Observational study of respiratory syncytial virus-associated hospitalizations and use of palivizumab in premature infants aged 29-32 weeks.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2006. **25**: p. 120-122.
55. Weber, M.W., et al., *The clinical spectrum of respiratory syncytial virus disease in The Gambia.* Pediatr Infect Dis J, 1998. **17**(3): p. 224-30.

56. White, D.O. and F. Fenner, *Medical virology*. 4th ed 1994, San Diego: Academic Press. xvii, 603 p.
57. Murray P, R.K., Pfaller M., *Microbiología Médica*. 6 ed 2009, España: Elsevier Mosby.
58. Cabello C, M.M., Olvera R, Villalba J, Valle L, Paramo I, *Frequency of viruses associated with acute respiratory infections in children younger than five years of age at a locality of Mexico City*. Mem Inst Oswaldo Cruz. , 2006. **101**(1): p. 21-24.
59. Lopez Perez, G., et al., *Identification of influenza, parainfluenza, adenovirus and respiratory syncytial virus during rhinopharyngitis in a group of Mexican children with asthma and wheezing*. Rev Alerg Mex, 2009. **56**(3): p. 86-91.
60. Noyola D, Z.A., Castro J, Ochoa J. , *Impact of respiratory syncytial virus on hospital admissions in children younger than 3 years of age*. J Infect. , 2007. **54**(2): p. 180-184.
61. Wong-Chew, R.M., et al., *[Frequency of respiratory viruses and clinical characteristics in children attending a care center in Mexico City]*. Salud Publica Mex, 2010. **52**(6): p. 528-32.
62. Lovato-Salas, F., et al., *Pandemic influenza A(H1N1) 2009 and respiratory syncytial virus associated hospitalizations*. J Infect, 2010. **61**(5): p. 382-90.
63. Tirado, R., et al., *Occurrence of respiratory syncytial virus subtypes in Mexican infants with acute lower respiratory tract disease*. Arch Med Res, 1995. **26**(2): p. 121-6.
64. Chang, J., *Current progress on development of respiratory syncytial virus vaccine*. BMB Rep, 2011. **44**(4): p. 232-7.
65. Kapikian, A.Z., et al., *An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine*. Am J Epidemiol, 1969. **89**(4): p. 405-21.
66. Pringle, C.R., et al., *Immunogenicity and pathogenicity of a triple temperature-sensitive modified respiratory syncytial virus in adult volunteers*. Vaccine, 1993. **11**(4): p. 473-8.
67. Wright, P.F., et al., *Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy*. J Infect Dis, 2000. **182**(5): p. 1331-42.
68. Johnson, T.R., et al., *Priming with secreted glycoprotein G of respiratory syncytial virus (RSV) augments interleukin-5 production and tissue eosinophilia after RSV challenge*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 2871-80.
69. Prince, G.A., et al., *Monophosphoryl lipid A adjuvant reverses a principal histologic parameter of formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine-induced disease*. Vaccine, 2001. **19**(15-16): p. 2048-54.
70. Hancock, G.E., et al., *Adjuvants recognized by toll-like receptors inhibit the induction of polarized type 2 T cell responses by natural attachment (G) protein of respiratory syncytial virus*. Vaccine, 2003. **21**(27-30): p. 4348-58.
71. Sambrook J, F.E., Maniatis T, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 ed. Vol. 1. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
72. Li L, Y.Y., Xu H, Qu T, Wang B., *Selection of reference genes for gene expression studies in ultraviolet B-irradiated human skin fibroblasts using quantitative real-time PCR*. BMC Mol Biol., 2011. **17**(12): p. 8.
73. Schlender J, H.V., Finke S, Günthner-Biller M, Marozin S, Brzózka K, Moghim S, Endres S, Hartmann G, Conzelmann KK., *Inhibition of toll-like receptor 7-and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus*. J Virol., 2005. **79**(9): p. 5507-5515.
74. Villenave, R., et al., *Differential cytopathogenesis of respiratory syncytial virus prototypic and clinical isolates in primary pediatric bronchial epithelial cells*. Virol J, 2011. **8**: p. 43.

75. Gueudin, M., et al., *Quantitation of respiratory syncytial virus RNA in nasal aspirates of children by real-time RT-PCR assay*. J Virol Methods, 2003. **109**(1): p. 39-45.
76. David, D., et al., *Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains*. Vet Microbiol, 2002. **87**(2): p. 111-8.
77. Trento, A., *Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides*. Journal of General Virology, 2003. **84**(11): p. 3115-3120.
78. Agoti, C.N., et al., *Intrapatient variation of the respiratory syncytial virus attachment protein gene*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 10425-8.

### **Referencias electrónicas**

- I) (<http://viralzone.expasy.org/>)
- II) [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/ari/en/index.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index.html)

# ANEXO

## ANEXO I-A

El siguiente cuadro presenta información valiosa del paciente como que fue proporcionada por:

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

No. muestra	Fecha de toma de muestra	Edad	Sexo	Diagnóstico	Hospitalización	Motivo egreso	Enfermedad subyacente
1344	11/12/2004	5 meses	Masculino	Neumonía	Si	Mejoría	Ninguna
1348	14/12/2004	5 meses	Masculino	Neumonía	Si	Mejoría	Ninguna
1162	30/08/2004	10 meses	Masculino	Neumonía	Si	Mejoría	Ninguna
1202	08/10/2004	1 mes	Masculino	Neumonía	Si	Mejoría	Ninguna
1222	21/10/2004	9 meses	Masculino	Neumonía	Si	Mejoría	Ninguna
3101	12/11/2006		Masculino	Bronquiolitis			
3102	11/11/2006		Masculino	Bronquiolitis			
3112	13/11/2006		Masculino	Bronquiolitis			
3114	14/11/2006		Femenino	Bronquiolitis			
3115	14/11/2006		Femenino	Bronquiolitis			
3152	21/11/2006		Masculino	Bronquiolitis			

INSTITUTO NACIONAL DE REFERENCIA EPIDEMIOLOGICA

	ID	Edad	Sexo	Tipo de muestra	Fecha de inicio de síntomas	Fecha de toma de muestra	Fecha de ingreso	Dx presuntivo	Estado del paciente
1	4130	11m	M	EFAR	10/12/2008	13/10/2008	13/10/2009	INFLUENZA	-
2	4514	2a	F	EFAR	26/10/2008	28/10/2008	28/10/2009	INFLUENZA	-
3	4102	5a	F	EFAR	10/07/2008	10/08/2008	10/10/2008	INFLUENZA	-
4	4468	2a	M	EFAR	18/10/2008	20/10/2008	24/10/2008	INFLUENZA	-
5	4406	2a	M	EFAR	20/10/2008	22/10/2008	23/10/2008	INFLUENZA	-
6	4520	3a	F	EFAR	18/10/2008	22/10/2008	29/10/2008	INFLUENZA	-
7	4310	3a	F	EFAR	14/10/2008	16/10/2008	17/10/2008	INFLUENZA	-
8	3973	1a	F	EFAR	29/09/2008	30/09/2008	10/02/2008	INFLUENZA	-
9	4355	24a	F	EFAR	19/10/2008	20/10/2008	21/10/2008	INFLUENZA	-
10	4208	3a	F	EFAR	10/12/2008	13/10/2008	16/10/2008	INFLUENZA	-
11	4510	3a	M	EFAR	22/10/2008	24/10/2008	28/10/2008	INFLUENZA	-
12	4112	8a	M	EFAR	10/06/2008	10/09/2008	10/10/2008	INFLUENZA	-
13	4593	1m	F	EFAR	26/10/2008	29/10/2008	30/10/2008	INFLUENZA	-
14	1589	1m	F	EFAR	20/02/2010	22/02/2010	23/02/2010	ETI	HOSPITALIZADO
15	1326	5m	M	ENASO	04/01/2010	08/01/2010	10/02/2010	ETI	HOSPITALIZADO
16	1905	11a	F	ENASO	16/02/2010	19/02/2010	04/03/2010	ETI	CASO NO GRAVE
17	1661	10m	F	EFAR	07/02/2010	10/02/2010	25/02/2010	ETI	HOSPITALIZADO
18	1099	5m	M	ENASO	20/01/2010	25/01/2010	05/02/2010	IRAG	CASO GRAVE
19	1032	1a	F	EFAR	01/02/2010	08/02/2010	08/02/2010	PVR	HOSPITALIZADO
20	2187	1a	F	EFAR	23/02/2010	26/02/2010	11/03/2010	ETI	HOSPITALIZADO

21	1325	2m	M	EFAR	03/01/2010	07/01/2010	10/02/2010	ETI	HOSPITALIZADO
22	1335	3a	M	EFAR	17/01/2010	18/01/2010	10/02/2010	IRAG	HOSPITALIZADO
23	671	92a	M	ENASO	24/12/2009	26/12/2009	26/01/2010	IRAG	DEFUNCIÓN
24	2652	1m	M	EFAR	23/03/2010	26/03/2010	30/03/2010	IRAG	NO GRAVE
25	1207	19a	F	EFAR	07/02/2010	09/02/2010	12/02/2010	IRAG	HOSPITALIZADO
26	1432	10m	F	EFAR	01/02/2010	02/02/2010	12/02/2010	ETI	HOSPITALIZADO
27	2431	1a	M	EFAR	07/03/2010	14/03/2010	23/03/2010	ETI	CASO GRAVE
28	1333	3m	M	EFAR	13/01/2010	18/01/2010	10/02/2010	IRAG	HOSPITALIZADO

EFAR: Exudado faríngeo

ENASO: Exudado nasofaríngeo

El número de muestra en el recuadro sombreado, salió del rango de población infantil.

## ANEXO I-B

El siguiente cuadro presenta los resultados de cada cebador usado para cada tipo de muestra

No. Muestra	Oligo F1	Oligo F2	Oligo GA 1	Oligo GA 3	Oligo GA2	Oligo GB2	β-Actina	IF	E.citopatico
1344	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo (muy intenso) por debajo de los 789	negativo	positivo	positivo	positivo
1348	positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	positivo	positivo	negativo
1162	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo pero en bandas inferiores (190pb)	negativo	positivo	positivo	positivo
1202	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo pero en bandas inferiores (190pb)	negativo	positivo	positivo	negativo
1222	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo	negativo	positivo	positivo	negativo
3101	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
3102	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo banda superior por debajo de los 789	negativo	positivo	positivo	negativo
3112	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo banda superior muy tenue por debajo de los 789	negativo	positivo	positivo	negativo
3114	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo banda superior muy tenue por debajo de los 789	negativo	positivo	positivo	negativo
3115	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo
3152	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo banda superior muy tenue y la inferior más fuerte (190pb)	negativo	positivo	positivo	negativo
Instituto nacional de referencia epidemiológica (INDRE)									
4130	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo banda superior muy tenue y la inferior más fuerte (190pb)	negativo	positivo	positivo	positivo
4514	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo banda superior muy tenue y la inferior más fuerte (190pb)	negativo	positivo	positivo	negativo
4102	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
4468	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo banda superior muy tenue y la inferior más fuerte (190pb)	negativo	positivo	negativo	negativo
4406	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo banda superior muy tenue y la inferior más fuerte (190pb)	negativo	positivo	negativo	negativo
4520	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo banda superior muy tenue y la inferior más fuerte (190pb)	negativo	positivo	negativo	negativo
4310	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo banda superior muy tenue y la inferior más fuerte (190pb)	negativo	positivo	negativo	negativo
3973	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo

