

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE VIRUS
RESPIRATORIO SINCITAL HUMANO (VRSH) MEDIANTE
RT-PCR, EN MUESTRAS RESPIRATORIAS DE NIÑOS EN
EDAD ESCOLAR CON ASMA EN EL HOSPITAL BACA
ORTIZ DE QUITO-ECUADOR.

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

MARÍA JOSÉ GRIJALVA DÍAZ

SANGOLQUÍ, 2012

CERTIFICACIÓN

Doc. Marcelo Grijalva M. D.; Ph. D.

Ing. Paola Párraga

Certifican:

Que el trabajo titulado “IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO HUMANO (VRSH) MEDIANTE RT-PCR, EN MUESTRAS RESPIRATORIAS DE NIÑOS EN EDAD ESCOLAR CON ASMA EN EL HOSPITAL BACA ORTIZ DE QUITO-ECUADOR”, realizado por la Srta. GRIJALVA DÍAZ MARÍA JOSÉ, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a su importancia en medicina molecular, epidemiología y diagnóstico, se recomienda su publicación.

El mencionado trabajo consta de dos documentos empastados y dos discos compactos los cuales contienen en formato portátil de Acrobat (PDF); autorizan a GRIJALVA DÍAZ MARÍA JOSÉ que lo entregue a ING. TATIANA PÁEZ, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, 2012

Dr. Marcelo Grijalva M. D; Ph. D.

DIRECTOR DE TESIS

Ing. Paola Párraga

CODIRECTORA DE TESIS

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Grijalva Díaz María José

Declaro que:

El proyecto denominado “IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO HUMANO (VRSH) MEDIANTE RT-PCR, EN MUESTRAS RESPIRATORIAS DE NIÑOS EN EDAD ESCOLAR CON ASMA EN EL HOSPITAL BACA ORTIZ DE QUITO-ECUADOR”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 2012

GRIJALVA DÍAZ MARÍA JOSÉ

AUTORIZACIÓN

Yo, Grijalva Díaz María José

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución, del trabajo “IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO HUMANO (VRSH) MEDIANTE RT-PCR, EN MUESTRAS RESPIRATORIAS DE NIÑOS EN EDAD ESCOLAR CON ASMA EN EL HOSPITAL BACA ORTIZ DE QUITO-ECUADOR”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 2012

GRIJALVA DÍAZ MARÍA JOSÉ

DEDICATORIA

Todos mis esfuerzos, trabajo y dedicatoria, siempre son para Mi Padre Celestial, uno no debe trabajar para los hombres.

Dedico este trabajo a Mi familia, que me han dado su apoyo siempre, pero en especial, este trabajo está dedicado a mi mamá, quien siempre me ayuda, apoya y está conmigo amorosa e incondicionalmente.

María José Grijalva Díaz

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dr. Enrique Terán por brindarme la oportunidad de de hacer mi tesis en un tema tan interesante y en un lugar tan bueno como lo fue en Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador. Así como también a cada uno de sus miembros que siempre supieron darme su apoyo en todo lo que podían ayudar, como son: Lic. Sandrita Vivero, Doc. José Rivera y el Señor Segundo Vega.

También quisiera extenderle mis agradecimientos a todo el personal del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), en especial al Doc. Néstor Sosa, por permitirme ampliar mis conocimientos en detección viral, junto con la colaboración de Leyda Ábrego y el Doc. Juan Arbiza, investigadores que estuvieron conmigo durante mi pasantía en esta honorable institución.

A mi director Dr. Marcelo Grijalva y mi codirectora la Ing. Paola Párraga, por haberme brindado la dirección necesaria durante esta investigación, junto con el Ing. Pedro Romero, siempre estuvo presto para la ayuda estadística.

En especial agradezco a mis amigos que supieron apoyarme y ayudarme oportunamente, Lorena Vallejo, Luis Pipíales, Leonardo Beltrán, Diana Vaca, Cristian Cando.

En especial a Juan Andrés Saavedra, por su Amor y apoyo, una verdadera bendición.

María José Grijalva Díaz

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|------|
| CERTIFICACIÓN..... | i |
| DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD | ii |
| AUTORIZACIÓN..... | iii |
| DEDICATORIA..... | iv |
| AGRADECIMIENTOS..... | v |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS..... | vi |
| LISTADO DE TABLAS | ix |
| LISTADO DE FIGURAS..... | x |
| LISTADO DE ANEXOS | xii |
| NOMENCLATURA UTILIZADA | xiii |
| RESUMEN..... | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| 1 CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Formulación del problema | 1 |
| 1.1.1 Área de influencia..... | 1 |
| 1.1.2 Antecedentes..... | 1 |
| 1.1.3 Proyectos relacionados o complementarios..... | 5 |
| 1.2 Justificación del problema | 6 |
| 1.3 Objetivos del proyecto | 9 |
| 1.3.1 Objetivo general del proyecto | 9 |
| 1.3.2 Objetivos específicos..... | 9 |
| 1.4 Marco Teórico..... | 10 |
| 1.4.1 Virus Sincitial Respiratorio Humano | 10 |
| 1.4.1.1 Genoma del VRSH | 11 |
| 1.4.1.2 Proteínas del VRSH | 12 |
| 1.4.1.2.1 Núcleo proteína (N):..... | 13 |
| 1.4.1.2.2 Fosfoproteína (P):..... | 14 |
| 1.4.1.2.3 Proteína L: | 14 |
| 1.4.1.2.4 Proteína matriz (M): | 14 |
| 1.4.1.2.5 Proteína M2 ó 2K: | 15 |
| 1.4.1.2.6 Proteína M2-2:..... | 15 |
| 1.4.1.2.7 Proteínas no estructurales NS1 y NS2: | 15 |

| | | |
|------------|---|----|
| 1.4.1.2.8 | Proteína SH: | 16 |
| 1.4.1.2.9 | Glicoproteína F:..... | 16 |
| 1.4.1.2.10 | Glicoproteína G:..... | 16 |
| 1.4.1.3 | Variación Antigénica y Genética del VRSH | 17 |
| 1.4.1.3.1 | Variación antigénica..... | 18 |
| 1.4.1.3.2 | Variación genética..... | 18 |
| 1.4.1.3.3 | Caracterización molecular de la glicoproteína G. | 19 |
| 1.5 | Hipótesis | 21 |
| 2 | CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 2.1 | Participantes..... | 22 |
| 2.2 | Zona de estudio | 22 |
| 2.3 | Periodo de tiempo de investigación | 23 |
| 2.4 | Análisis estadístico..... | 23 |
| 2.5 | Procedimientos..... | 23 |
| 2.5.1 | Determinación del tamaño de muestra | 23 |
| 2.5.2 | Preparación del medio de transporte viral | 24 |
| 2.5.3 | Toma de la muestra nasofaríngea | 24 |
| 2.5.4 | Extracción del ARNv mediante el método del Trizol®, a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo..... | 24 |
| 2.5.5 | Obtención de controles positivos..... | 25 |
| 2.5.6 | Reconstitución de <i>primers</i> | 26 |
| 2.5.7 | Transcripción Reversa Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) | 26 |
| 2.5.8 | Amplificación del gen G..... | 28 |
| 2.5.9 | Genotipificación del ADN obtenido..... | 29 |
| 2.5.10 | Detección del producto amplificado por medio de la electroforesis en gel de agarosa | 30 |
| 2.5.11 | Análisis de datos | 31 |
| 3 | CAPÍTULO 3: RESULTADOS..... | 32 |
| 3.1 | Muestras biológicas | 32 |
| 3.2 | Obtención de los controles positivos | 33 |
| 3.2.1 | Visualización de gráfica de amplificación de PCR en tiempo real | 33 |
| 3.2.2 | Visualización de controles positivos en gel de agarosa de la PCR en tiempo real..... | 37 |
| 3.3 | Amplificación del gen G..... | 38 |

| | | |
|-----|---|--------------------------------------|
| 3.4 | Genotipificación del fragmento del gen G..... | 39 |
| 3.5 | Análisis Estadístico Descriptivo | 41 |
| 4 | CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN..... | 45 |
| 5 | CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES | 50 |
| | CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES | 51 |
| 6 | CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA..... | 52 |
| 7 | ANEXOS | ¡Error! Marcador no definido. |

LISTADO DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 2.1: Cebadores específicos utilizados en esta investigación, junto con sus respectivas secuencias; tomados de Arbiza y colaboradores en el 2003..... | 26 |
| Tabla 2.2: Condiciones, Volúmenes y Reactivos para la Transcripción Reversa de ARN de Virus Sincitial Respiratorio Humano perteneciente a la extracción mediante el método del Trizol ®..... | 27 |
| Tabla 2.3: Programa de Termociclado para condiciones volúmenes y reactivos pertenecientes a la Transcripción Reversa de ARN de Virus Sincitial Respiratorio Humano..... | 27 |
| Tabla 2.4: Condiciones, Volúmenes y Reactivos para la Amplificación de ADN complementario de Virus Sincitial Respiratorio Humano obtenido en la Transcripción Reversa..... | 28 |
| Tabla 2.5: Programa de Termociclado perteneciente a la Amplificación de ADN complementario de Virus Sincitial Respiratorio Humano..... | 29 |
| Tabla 2.6: Condiciones, Volúmenes y Reactivos para la PCR de VRSH tipo A mediante el método de primers específicos..... | 29 |
| Tabla 2.7: Programa de Termociclado empleado en este estudio para PCR de identificación de Virus Sincitial Respiratorio Humano de tipo A para el equipo <i>Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 2700</i> | 30 |
| Tabla 3.1: Afecciones respiratorias en niños asmáticos estudiados para la Identificación y Genotipificación de VRSH, a partir de su diagnóstico escrito en la historia clínica del Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador, en el periodo febrero a julio del año 2011..... | 43 |
| Tabla 3. 2: Afecciones respiratorias por género de niños asmáticos estudiados para la Identificación y Genotipificación de VRSH, a partir de su diagnóstico escrito en la historia clínica del Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador, en el periodo febrero a julio del año 2011..... | 44 |

LISTADO DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1: Mapa genético de la cepa Long del VRSH. En la parte superior se indica el nombre y la longitud (nucleótidos) de cada gen, incluyendo la serie de uridinas con las que finalizan. En la parte inferior se señalan las posiciones y longitudes de las secuencias intergénicas, la región de solapamiento entre los genes M2 y L y las secuencias leader y tráiler. La segunda fase de lectura del gen M2 (M2-II) se indica con un cuadro gris (Reyes, 2001; Ramírez, 2004)..... | 11 |
| Figura 1.2: Representación esquemática de la estructura de VRSH, en la cual se señala la localización de las distintas proteínas que componen el virión (Modificado de Ramírez, 2004)..... | 13 |
| Figura 3.1: Imagen en la que se observan los valores de Ct = ciclo umbral detectado para VRSH con una sonda CFR610, realizado con el equipo de PCR en Tiempo Real, con el <i>software Interated Cyclor Studio</i> versión 3.0.0.102, para prueba Simplexa™ Flu A/B & VRS (Frizonex)..... | 33 |
| Figura 3.2: Imagen en la que se observan los resultados de Detección Viral, obtenidos con el equipo de PCR en Tiempo Real, con el <i>software Interated Cyclor Studio</i> versión 3.0.0.102, para prueba Simplexa™ Flu A/B & VRS (Frizonex)..... | 34 |
| Figura 3.3: Gráfica de amplificación de PCR en tiempo real, de muestras de niños de 0 a 4 años cedidas en el hospital Baca Ortiz, muestras desde la 1 a la 7; obtenidas con el equipo de PCR en Tiempo Real, con el <i>software Interated Cyclor Studio</i> versión 3.0.0.102, para prueba Simplexa™ Flu A/B & VRS (Frizonex)..... | 35 |
| Figura 3.4: Gráfica de amplificación de PCR en tiempo real, de muestras de niños control cedidas en el hospital Baca Ortiz, muestras desde la 8 a la 14; obtenidas con el equipo de PCR en Tiempo Real, con el <i>software Interated Cyclor Studio</i> versión 3.0.0.102, para prueba Simplexa™ Flu A/B & VRS (Frizonex)..... | 36 |
| Figura 3.5: Parámetros de ciclado de Simplexa Flu A, B y VRS; obtenidos con el equipo de PCR en Tiempo Real, con el <i>software Interated Cyclor Studio</i> versión 3.0.0.102, para prueba Simplexa™ Flu A/B & VRS (Frizonex)..... | 37 |
| Figura 3.6: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y Buffer TBE al 1X, teñido con bromuro de etidio (10mg/mL), los pocillos del 1 al 9 son de ADNc amplificado a partir de las muestras positivas obtenidas con la prueba Simpleza™ Flu A/B & VRSH (Frizonex); M simboliza el marcador <i>Marker VIII</i> (Promega) de peso molecular de 100 a 1500 pb..... | 37 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.7 : Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y Buffer TBE al 1X, teñido con bromuro de etidio, los pocillos del 1 al 21 son de ADNc amplificado a partir de las muestras de niños con asma en edad escolar del Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador; el pocillo C+ corresponde al control positivo obtenido con la prueba Simpleza TM Flu A/B & VRSH (Frizonex) y el pocillo C- corresponde al control negativo; M simboliza el marcador <i>Marker VIII</i> (Promega) de peso molecular de 100 a 1500 pb. En esta figura la banda de 923pb en el control positivo y en el marcador no se observan a la misma altura, porque el marcador migró primero. | 38 |
| Figura 3.8: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y Buffer TBE al 1X, teñido con bromuro de etidio, Los pocillos del 1 al 21 son de ADNc amplificado y genotipado para GA fragmento de 480 pb, a partir de muestras de niños con asma en edad escolar. Marcador <i>Marker VIII</i> (Promega) de peso molecular de 100 a 1500 pb, controles positivos (C+) y controles negativos (C-), respectivamente..... | 39 |
| Figura 3.9: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y Buffer TBE al 1X, teñido con bromuro de etidio, Los pocillos del 1 al 21 son de ADNc amplificado y genotipado para GB fragmento de 496 pb, a partir de muestras de niños con asma en edad escolar. Marcador <i>Marker VIII</i> (Promega) de peso molecular de 100 a 1500 pb, controles positivos (C+) y controles negativos (C-), respectivamente..... | 40 |
| Figura 3.10: Porcentaje de muestras de niños asmáticos, recolectadas para Identificación y Genotipificación de VRSH; en el periodo febrero a julio del año 2011..... | 41 |
| Figura 3.11: Cantidad de muestras nasofaríngeas recolectadas para Identificación y Genotipificación de VRSH ubicadas por género y edad..... | 42 |
| Figura 3.12: Porcentaje de niños asmáticos por afección respiratoria, para la Identificación y Genotipificación de VRSH, a partir de su diagnóstico escrito en la historia clínica del Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador, en el periodo febrero a julio del año 2011..... | 43 |
| Figura 3.13: Afecciones respiratorias relacionadas con asma de niños y niñas asmáticos, estudiados para la Identificación y Genotipificación de VRSH, a partir de su diagnóstico escrito en la historia clínica del Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador, en el periodo febrero a julio del año 2011..... | 44 |

LISTADO DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| ANEXO A: Consentimiento Informado utilizado en esta investigación..... | 63 |
| ANEXO B: Procedimiento para realizar la prueba Simplexa TM Flu A/B & RSV de <i>Focus Diagnostic</i> | 69 |
| ANEXO C: Hoja Electrónica de los datos procesados..... | 72 |

NOMENCLATURA UTILIZADA

VRSH: Virus Respiratorio Sincitial Humano.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARN (-): Ácido Ribonucleico de cadena negativa.

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.

ARNc: Ácido Ribonucleico complementario.

ARNv: Ácido Ribonucleico viral.

A y B: principales grupos del VRSH.

Th1 y Th2: interleuquinas 1 y 2.

ARNasas: ribonucleasa.

AcMs: Anticuerpos Monoclonales.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

HBR: Hiperreactividad Bronquial Recurrente.

ts: termosensibles.

pf: pases en frío.

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa.

ORF: marcos de lectura abiertos.

GS: *gen start*.

GE: *gen end*.

CAP: *capping*

N: nucleoproteína.

P: fosfoproteína.

KDa: kilodalton.

PBS: *phosphate buffered saline*.

DECP: Dietilpirocarbonato

LG3 y LG5: *primers* 3 y 5 de la glicoproteína G de la cepa Long.

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario.

dNTP`s: desoxirribonucleótidos

DTT: ditioneitol.

Ct: ciclo umbral detectado.

Pb: pares de bases.

RESUMEN

76 muestras respiratorias de niños en edad escolar y con diagnóstico de asma bronquial fueron analizadas buscando la presencia de RSV mediante Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa con *primers* específicos. El ensayo fue optimizado para detección de RSV y para la genotipificación de glicoproteína G de RSV.

El ensayo optimizado en este estudio no detectó la presencia de RSV en ninguna de las muestras analizadas. Los datos obtenidos sugieren la influencia de otros factores diferentes a la infección por RSV en la etiopatogénesis del asma bronquial en población infantil. El análisis realizado con estadística descriptiva, muestra una mayor presencia de asma en el género masculino.

Palabras clave: Virus Sincitial Respiratorio Humano (VRSH) y Asma.

ABSTRACT

76 respiratory specimens of school age children with a diagnosis of bronchial asthma were analyzed to determine the presence of RSV by Reverse Transcription - Chain Reaction Polymerase using specific primers. The assay was optimized for RSV detection and RSV G glycoprotein genotyping.

The optimized assay in this study did not detect the presence of RSV in any of the samples analyzed. The data obtained suggest the influence of factors other than RSV infection in the etiopathogenesis of bronchial asthma in children. The analysis based on descriptive statistics show a greater presence of asthma in males.

Key words: Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) and Asthma.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

1.1.1 Área de influencia

Las infecciones respiratorias agudas constituyen la primera causa de morbi-mortalidad infantil en países en vías de desarrollo, como el Ecuador, así como también en otras poblaciones. Entre los virus responsables de este tipo de infecciones destaca el Virus Respiratorio Sincitial Humano (VRSH), el cual es el principal causante de asma y de enfermedades respiratorias en la infancia, ocasionando millones de muertes anuales.

Debido a que al momento no se dispone de terapias antivirales efectivas, ni de vacunas frente al VRSH, este proyecto busca aportar al campo de la salud con datos importantes que permitan a la comunidad conocer la situación actual de las infecciones causadas por este virus en el país. Este proyecto contribuirá al desarrollo de técnicas diagnósticas basadas en biología molecular, permitiendo así que a futuro se desarrollen sistemas diagnósticos tempranos y se provea de tratamiento oportuno a los pacientes portadores de la enfermedad.

1.1.2 Antecedentes

Tanto los estudios epidemiológicos como clínicos han relacionado las infecciones víricas con las exacerbaciones de los síntomas de asma. Los virus son desencadenantes de broncoespasmo, especialmente en niños y adultos normales. En niños pequeños y sanos, la infección por el Virus Sincitial Respiratorio Humano (VRSH) y el virus de parainfluenza causan episodios de sibilancias, que es el sonido que hace el aire al pasar por los conductos traqueobronqueales estrechos. Las sibilancias pueden ser recurrentes y usualmente dejan de ser un problema hacia el segundo año de vida. Un factor importante en los episodios inducidos por el VRSH es la característica que tienen las vías respiratorias de ser pequeñas y no completamente desarrolladas en

niños menores. En niños mayores y en adultos jóvenes, las infecciones respiratorias continúan siendo causa de estertor sibilante, pero el virus causal es diferente. En los niños menores de 2 años de edad, casi en el 70% de los casos que presentan obstrucciones en los conductos bronquiales torácicos, se ha encontrado crecimiento del VRSH en el cultivo de las secreciones de vías aéreas (Duff *et al.*, 1993). En contraste, en los niños mayores de dicha edad con estertor sibilante, se cultivó virus solamente en el 31% de estos episodios, y el virus respiratorio detectado con mayor frecuencia fue rinovirus (Minor *et al.*, 1993; Carlsen, 1994).

El VRSH fue identificado inicialmente en 1956 como el agente causal de un brote de infección respiratoria en una colonia de chimpancés, específicamente en un chimpancé que padecía coriza y presentaba síntomas semejantes a los del resfriado común (Morris y col., 1956). El virus fue aislado por primera vez en lactantes con bronquiolitis en 1957 y en 1975 se le asignó el nombre de “Virus Respiratorio Sincitial” por su capacidad de formar sincitios en cultivos celulares *in vitro* (Mejías *et al.*, 2004).

El VRSH es un virus de ARN (-) con dos subtipos serológicos (A y B) y con dos glicoproteínas de superficie, la G (que permite adherencia a la superficie de la célula) la cual estimula respuesta inmunitaria tipo Th2, y la F (que posibilita la fusión de las membranas del virus y de la célula anfitriona) que estimula una respuesta inmunitaria tipo Th1 (Lemanske, 2003).

En un estudio prospectivo de 1 246 niños, se observó que la infección por VRSH estaba relacionada con un riesgo incrementado de sibilancias a los 6 años, pero la presentación de este síntoma disminuyó con la edad y no fue significativo a los 11 años (Stein *et al.*, 1999).

Sin embargo, en otro estudio en el cual se analizó el padecimiento de asma y la sensibilización alérgica a los 7 años de edad se observó que los niños que habían padecido la infección por VRSH tenían mayor riesgo de padecer asma o sensibilización alérgica que los controles, independientemente del antecedente de historia familiar de asma. El riesgo fue aún mayor cuando existían dichos antecedentes, especulándose que podría haber un efecto sobre el sistema inmunitario inmaduro que favorecería la respuesta tipo Th2 (Sigurs *et al.*, 2000).

También se encontró que los niños que habían padecido la infección por VRSH presentaron significativamente un mayor número de episodios de bronquitis crónica y sibilancias hasta los 4 años de edad respecto a los controles, permaneciendo con un riesgo mayor de tos productiva crónica entre los 5 a 8 años de edad. Por ello, la prevención de la infección por el VRSH podría evitar la aparición de posteriores secuelas (Singleton *et al.*, 2003).

La relación entre la bronquiolitis causada por el VRSH con el subsiguiente desarrollo de sibilancias recurrentes y/o asma han dado lugar a especulaciones sobre el papel que desempeñan los factores genéticos, ambientales e inmunológicos. Recientemente se han realizado diversas publicaciones sobre el VRSH que se han centrado en la disregulación de las citocinas, con un desbalance en la respuesta de las células T (helper, Th) tipo 1/ tipo 2 en la producción de citocinas (Lemanske, 2003).

Podríamos concluir que respecto a la infección por el VRSH existen datos que demuestran que este virus propicia una respuesta inmunitaria tipo Th2 o un desbalance Th1/Th2, que favorecerían la aparición posterior de procesos alérgicos y asma. Por lo mencionado se están desarrollando diversas estrategias para prevenir la infección o modificar su curso. Sin embargo, a corto plazo no parece vislumbrarse una solución a este problema (Martínez, 2004).

En un estudio elaborado por Rodríguez y colaboradores, en el año 2000, se realizó una revisión de las infecciones relacionadas con el asma bronquial. La asociación asma-infección es un problema clínico frecuente. Al principio las infecciones son causantes de la aparición de la enfermedad, pero también pueden manifestarse en el transcurso de la misma (infecciones virales, bacterianas, por hongos, etc.). Existen evidencias que sostienen el criterio de que los procesos bacterianos no inducen crisis de asma bronquial. Uno de ellos se basa en que el uso de antibióticos no se ha visto que ejerza algún cambio en la evolución de las crisis de asma. Un segundo argumento consiste en que no se han asociado los episodios de sibilancias con infección por algún patógeno demostrado. Las infecciones virales más frecuentes en niños asmáticos son causadas por el VRSH y el virus de parainfluenza. En niños mayores de 2 años de edad,

los factores de riesgo asociados a sibilancias fueron alergias y la presencia de virus. Estos estudios revelan una evidente relación entre la edad y el virus infectante.

El asma bronquial muestra un preocupante incremento de casos en la actualidad y se estima que alrededor de 300 millones de personas la padecen en el mundo (OMS, 2007). En los últimos 20 años su incidencia ha aumentado considerablemente y más del 50% corresponde a la población pediátrica (Sociedad Ecuatoriana de Tisiología y Enfermedades del Tórax, 2010).

La prevalencia en América Latina es alta y según reportes del estudio ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*, por sus siglas en inglés), esta zona tiene una de las mayores tasas de asma infantil.

En el Ecuador, el estudio ISAAC realizado en la ciudad de Guayaquil en el 2002 evidenció que un 32% de la población encuestada (3082 estudiantes de entre 13 y 14 años) han presentado sibilancias alguna vez en su vida, de los cuales el 16% las han tenido durante los últimos doce meses. Un 9% de la población estudiada tenía diagnóstico de asma bronquial. Los datos de dicho estudio en la ciudad de Quito (2003) arrojaron que un 12% de la población encuestada ha presentado sibilancias durante el último año y 7.3% ha sido diagnosticado de asma bronquial, lo cual permite afirmar que existe un subdiagnóstico importante de esta enfermedad (Sociedad Ecuatoriana de Tisiología y Enfermedades del Tórax, 2010).

Como se ha descrito anteriormente, la variabilidad genética de los aislados del VRSH ha sido examinada a nivel antigénico y genético. Anderson y colaboradores, en 1985, mostraron que los subgrupos A y B han existido por más de 20 años, tienen una distribución mundial y pueden co-circular durante una misma epidemia. Los virus del subgrupo A han sido identificados más frecuentemente que los virus del subgrupo B (López *et al.*, 1988).

La variabilidad genética del VRSH fue primeramente examinada usando digestión con ARNasa A, permitiendo encontrar una serie de patrones diferentes para el subgrupo A (Cristina *et al.*, 1991). En Montevideo, Uruguay, la variabilidad antigénica y genética de la glicoproteína G de aislamientos obtenidos durante 6 períodos

epidémicos fue analizada por digestión con ARNasa A, reacción con AcMs (anticuerpos monoclonales) y secuenciación nucleotídica del gen de la glicoproteína G. Estos análisis ilustran la capacidad del virus para propagarse en todo el mundo, la cual influye en su modo de evolución y que la división de las cepas por análisis filogenético del gen G y por su reacción con AcMs específicos del gen G muestra una estrecha correlación. A su vez la acumulación de cambios aminoacídicos en una zona importante del antígeno de la glicoproteína G, sugieren que la selección inmune puede ser un factor que influye en la generación de la diversidad del VRSH (García *et al.*, 1994)

La glicoproteína G, que es el principal componente en la respuesta inmune protectora del virus, presenta un alto número de sustituciones nucleotídicas que conllevan a cambios aminoacídicos. Estos cambios producen alteraciones en los epítomos y por lo tanto permiten que el virus escape de la inmunidad pre-existente (Hall *et al.*, 1991; Sullender *et al.*, 1998).

Por todo lo anteriormente planteado, esta investigación se ha centrado en la glicoproteína G del VRSH, para realizar un análisis genético, utilizando nuevas herramientas aplicadas a esta enfermedad, como lo es la tecnología de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección y caracterización genética de cepas de VRSH que circulan en nuestro país. Se espera que el presente estudio sea un aporte al desarrollo de técnicas diagnósticas basadas en biología molecular, permitiendo así que a futuro se desarrollen sistemas diagnósticos tempranos y se provea de tratamiento oportuno a los pacientes portadores de asma bronquial así como también permitirá contar con las herramientas necesarias para realizar estudios de epidemiología y evolución Molecular de este virus en Ecuador.

1.1.3 Proyectos relacionados o complementarios

Para la realización de este proyecto se revisaron algunas fuentes bibliográficas, y se encontró que las de mayor importancia fueron:

Genetic characterization of respiratory syncytial viruses isolated from consecutive acute respiratory infections in a HIV infected child. 2006. Juan Arbiza,

Mabel Berois, Adriana Delfraro, Sandra Frabasile, Francisco Díaz Mitona, Rose Milk & José C. Russi. *Journal of Clinical Virology*. Jan; 35(1):41-5. Epub 2005 May 31

Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups A and B) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 – 2001). 2005. Monica C. Galiano, Concepcion Palomo, Cristina M. Videla, Juan Arbiza, José A. Melero & Guadalupe Carballal. *Journal of Clinical Microbiology*. May; 43(5): 2266-2273.

Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (Group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. 2003. Sandra Frabasile, Adriana Delfraro, Luján Facal, Cristina Videla, Mónica Galiano, María José de Sierra, Dora Ruchansky, Nathalia Vitoreira, Mabel Berois, Guadalupe Carballal, José C. Russi & Juan Arbiza. *Journal of Medical Virology*. Oct; 71(2):305-12.

Genetic Diversity of respiratory syncytial virus isolated during an epidemic period from children of northeastern Brazil. 2004. Fermanda Edna Araújo Moura, Andrea Blanc, Sandra Frabasile, Adriana Delfraro, María José de Sierra, Lorena Tome, Eduardo Antonio Goncalves Romanos, Marilda Mendonca Siqueira & Juan Arbiza. *Journal of Medical Virology*. Sep; 74(1): 156-60

1.2 Justificación del problema

En países en desarrollo, la primera causa de morbi-mortalidad infantil son las infecciones respiratorias agudas. Los virus son responsables de la mayoría de estas infecciones, donde el espectro clínico de estas enfermedades varía desde asintomáticos a infecciones fatales.

El Virus Respiratorio Sincitial Humano (VRSH) es la principal causa de asma, bronquiolitis, neumonía y enfermedades respiratorias en la infancia, ocasionando millones de muertes anuales. Las infecciones por este virus se presentan entre las 6 semanas y los 9 meses de edad y en el caso del desarrollo de asma a partir de los 2 años de edad afectando a más de 155 millones de personas en todo el mundo e influyendo en

la progresión y manifestación de esta enfermedad tan compleja caracterizada por conductos traqueobronqueales estrechados, inflamación e hiperreactividad bronquial recurrente (HBR) (Mejías *et al.*, 2004).

La infección por VRSB es muy contagiosa debido a la transmisión por secreciones respiratorias infectadas o por contacto de las manos con superficies contaminadas y subsiguiente inoculación de la mucosa conjuntiva o nasal (Vikerfors *et al.*, 1987).

El VRSB es un virus ARN perteneciente al género *Pneumovirus* y la familia *Paramixoviridae*. Este está constituido por 10 proteínas de diferentes pesos moleculares (Mejías *et al.*, 2004). Entre las proteínas estructurales más importantes desde el punto de vista inmunológico están las glucoproteínas G y F encargadas de la adhesión y fusión, respectivamente. Estas están asociadas a la envoltura y son responsables del mantenimiento y la replicación viral de una célula a otra. Estas constituyen los mayores determinantes antigénicos del virus induciendo a la formación de anticuerpos neutralizantes. Variaciones antigénicas y genéticas en la proteína G y también en las proteínas F, N, P, son responsables de que existan dos tipos distintos de VRSB el A y el B (Mejías *et al.*, 2004). Ambos grupos antigénicos pueden cocircular en la misma comunidad durante la misma epidemia variando la frecuencia relativa de su aislamiento de un año a otro, o en el mismo año si se consideran comunidades distintas, aunque en general el grupo A circula en mayor proporción (Anderson *et al.*, 1991; Cane *et al.*, 1994).

Cuando se produce una segunda infección en niños previamente infectados por virus del grupo A suele ser por un virus del grupo antigénico B (Mufson *et al.*, 1987). Cada año tienden a predominar virus de diferentes cepas (Cane *et al.*, 1994), sugiriendo que aunque la respuesta inmune frente a una estirpe viral no es de larga duración, puede estar limitando la propagación del virus y la selección de nuevas variantes.

A pesar de la necesidad de disponer de una vacuna frente al VRSB y de toda la investigación llevada a cabo en este campo, al momento no se dispone de terapias antivirales efectivas, ni de vacunas comercializadas frente al VRSB. Los intentos de

vacunación realizados en los años sesenta produjeron una enfermedad más grave que en los pacientes control sin vacunar (Kapikian *et al.*, 1969; Kim *et al.*, 1969).

La inmunidad natural tras la infección con el virus salvaje es sólo parcial y no permanente. Otro problema es que, aunque los anticuerpos séricos elevados protegen de la infección de vías respiratorias bajas, no protegen las vías superiores, para lo que se necesitan anticuerpos locales en las mucosas y esto solo se consigue tras varias infecciones, por lo que se requerirán varias dosis de vacuna para que la inmunidad se mantenga en el tiempo. Entre otros problemas, se encuentra el caso de los lactantes en donde la vacunación se realiza muy tempranamente, cuando el sistema inmunitario está todavía inmaduro y la respuesta inmune es débil y además persisten anticuerpos maternos que pueden interferir con la respuesta inmune del niño. Además, existen varios serotipos de virus que complican aún más el desarrollo de vacunas efectivas.

Actualmente no existe ninguna vacuna comercializada contra el VRSH, pero existen publicaciones sobre el desarrollo y evaluación de algunas formulaciones de vacunas que son utilizadas para la prevención de la enfermedad.

En el año 1960 se utilizó una vacuna VRSH inactivada con formol en lactantes y en niños desde los 2 meses hasta los 7 años de edad, con dosis administradas de 2 a 3 veces vía intramuscular. Esta vacuna no consiguió una protección frente al VRSH y además cuando fue administrada, existió la aparición frecuente de complicaciones de vías respiratorias bajas (neumonía, broncostricción), junto con un mayor número de hospitalizaciones y algunos casos de muerte en niños menores de 2 años de edad, que no habían sido infectados previamente por el virus salvaje.

Las vacunas desarrolladas mediante herramientas biotecnológicas se empezaron a ensayar a finales de los años 1960, con mutantes de virus vivos atenuados. Estos virus eran mutantes del VRSH A termo sensible (ts), incapaces de crecer a temperaturas altas o mutantes obtenidos mediante pases en frío (pf). Las vacunas usadas inicialmente, sirvieron para demostrar que los niños vacunados que fueron infectados posteriormente por el virus salvaje no presentaron sintomatología más intensa que los no vacunados y establecieron el modelo para evaluar en el futuro vacunas atenuadas con el VRSH. Estas vacunas son más estables y pueden ser atenuadas para que sean seguras

en niños pequeños. Al mismo tiempo son suficientemente inmunogénicas como para proteger de la infección.

Los avances de la biología molecular en el estudio de este virus son muy importantes para el desarrollo de una vacuna, así como para establecer estrategia de tratamiento o detección temprana. La utilización de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha permitido la detección de ARN de VRSH en el tracto respiratorio en fase crónica de HRB (Mejías *et al.*, 2004).

Con este tipo de estudio se pretende obtener información acerca de los genotipos del virus que circulan en nuestro país, así como también estimar la prevalencia de niños que tienen asma a causa del VRSH y nos proporcionará la estimación de la probabilidad de que un niño de nuestra población tenga la enfermedad en un momento determinado.

1.3 Objetivos del proyecto

1.3.1 Objetivo general del proyecto

Identificar y genotipificar al Virus Respiratorio Sincitial Humano (VRSH) mediante RT-PCR, en muestras respiratorias de niños en edad escolar con asma en el Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Extraer ARN (-) viral de muestras de tracto respiratorio superior pertenecientes a niños en edad escolar que han sido diagnosticados con asma, que acuden para atención en el Hospital Baca Ortiz de Quito durante el primer trimestre del año 2011.
2. Identificar la presencia de VRSH, mediante la técnica molecular RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa).

3. Implementar un ensayo de genotipificación para muestras positivas de VRSH mediante la utilización de una PCR con *primers* específicos.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Virus Sincitial Respiratorio Humano

El Virus Sincitial Respiratorio Humano (VRSH), después de su primer asilamiento en un lactante con neumonía en 1956, ha sido reconocido como el principal agente etiológico de la infección del tracto respiratorio bajo en lactantes y niños pequeños (Rivas, 1992).

Tanto los estudios epidemiológicos como clínicos han relacionado las infecciones víricas con las exacerbaciones de los síntomas del asma (Rodríguez, 2000).

Este virus está clasificado dentro del orden *Mononegavirales* (virus de ARN de banda negativa, no segmentados y con una nucleocápside helicoidal) y pertenecen a la familia *Paramyxoviridae* (Reyes, 2001).

En general, todos los paramixovirus poseen las siguientes características:

1. Su genoma está formado por una única cadena de ARN de polaridad negativa que se encuentra en el interior de una nucleocápside helicoidal (que contiene el complejo polimerasa), que le confiere resistencia a ARNasas.
2. Su genoma se transcribe secuencialmente por la polimerasa viral, mediante un mecanismo en el que para y reinicia la síntesis de ARN obedeciendo señales que actúan en *cis*, dando lugar a la formación de ARNm.
3. Su ciclo viral replicativo es citoplásmico.
4. Sus viriones adquieren una envoltura lipídica que procede de la membrana plasmática.
5. La entrada en la célula huésped está mediada por la fusión de las membranas viral y celular en una primera etapa de la infecciones.

1.4.1.1 Genoma del VRSH

El genoma del VRSH está constituido por una molécula de ARN monocatenario, de polaridad negativa y de aproximadamente 15 KDa, que codifica 10 ARNm. Cada uno de ellos contiene un ORF, a excepción del gen *M2* que contiene dos. Los ARNm tienen un *capping* (CAP) en el extremo 5' y están poliadenilados en el extremo 3'. Cada gen comienza con una secuencia de 10 nucleótidos denominada *gen start* (*GS*), que está altamente conservada a excepción del gen *L*, cuya función es controlar el inicio de la transcripción y la adición de CAP y acaba con una secuencia semi-conservada de 12-13 nucleótidos denominada *gen end* (*GE*), que dirige la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm. Los nueve primeros genes, están separados por regiones intergénicas que varían en longitud de 1-56 nucleótidos y carecen de secuencias consenso. Los dos últimos genes, *M2* y *L*, se solapan en 68 nucleótidos, por lo que la señal *GS* del gen *L* se localiza dentro del gen *M2*. Por este motivo, esta secuencia se transcribe dos veces con cada síntesis de ambos ARNm (Ramírez, 2004).

En cada extremo del ARNv se encuentran dos regiones no codificadas, un ARN *leader* de 44 nucleótidos en el extremo 3' y una región *trailer* de 159 nucleótidos en el extremo 5'. Veintiuno de los últimos 24 a 26 nucleótidos de ambos extremos son complementarios, lo que indica un alto grado de identidad entre los promotores de los extremos 3' del ARN genómico y antigenómico (Reyes, 2001).

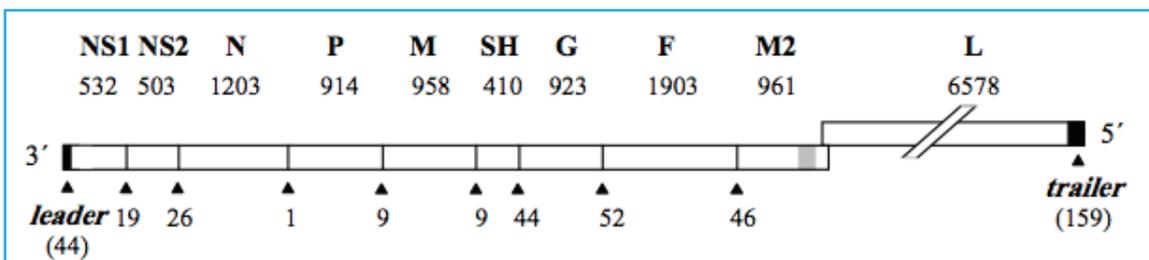


Figura1.1: Mapa genético de la cepa Long del VRSH. En la parte superior se indica el nombre y la longitud (nucleótidos) de cada gen, incluyendo la serie de uridinas con las que finalizan. En la parte inferior se señalan las posiciones y longitudes de las secuencias intergénicas, la región de solapamiento entre los genes *M2* y *L* y las secuencias *leader* y *trailer*. La segunda fase de lectura del gen *M2* (*M2-II*) se indica con un cuadro gris (Reyes, 2001; Ramírez, 2004).

La transcripción se produce de forma secuencial desde un único promotor situado en el extremo 3' (la región líder), como se pudo comprobar mediante estudios de cinética de inactivación de la transcripción por luz ultravioleta y experimentos con minigenomas dicistrónicos (caracterización de ARNm policistrónicos). En el modelo propuesto, la polimerasa viral para y reinicia la síntesis de ARNm en cada secuencia intergénica. En el caso concreto del gen L, todavía se desconoce cómo la polimerasa accede a la región GS que se encuentra dentro de la región solapante con el gen M2. Se ha propuesto un modelo en el que la polimerasa primero transcribiría el gen M2 y luego retrocedería para transcribir el gen L. Como en todos los mononegavirus, existe un gradiente transcripcional en el cual los genes más próximos al promotor son transcritos con más frecuencia. Este mecanismo, junto con el que supone la presencia de regiones intergénicas, actúa como regulador de la transcripción, aunque también se ha comprobado que la longitud de los genes interviene en la regulación transcripcional (Ramírez, 2004). Adicionalmente, la transcripción también depende de proteínas celulares como actina y profilina (Reyes, 2001).

La replicación implica la síntesis del antígenoma (ARNc), un intermediario replicativo encapsidado de polaridad positiva que es una copia exacta del genoma viral completo. Este último se sintetiza empleando como molde el antígenoma. Ambos se encuentran siempre en forma de nucleocápsides y su síntesis se inhibe cuando la nucleoproteína es limitante (Collins *et al.*, 2001).

1.4.1.2 Proteínas del VRSH

Su genoma está formado por una cadena lineal no segmentada que codifica 10 proteínas y se replica dentro del citoplasma del huésped. En su membrana existen 3 proteínas (Callejón, 2004):

- **G:** Responsable de la unión o adhesión del virus a la membrana celular del receptor.
- **F:** Encargada de la penetración en la célula, la fusión con la membrana celular y la formación de sincitios.
- **SH:** cuya función aún hoy no es conocida.

Las glicoproteínas están organizadas por separado en espículas virales que se visualizan como proyecciones cortas (11-20 nm) y poco separadas entre sí (6-10 nm). La nucleocápside es una hélice simétrica en la que está el ácido ribonucléico viral (ARNv) asociado con la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), un factor antiterminador de la transcripción (M2 ó 22K), y la polimerasa (L) (Collins *et al.*, 2001).

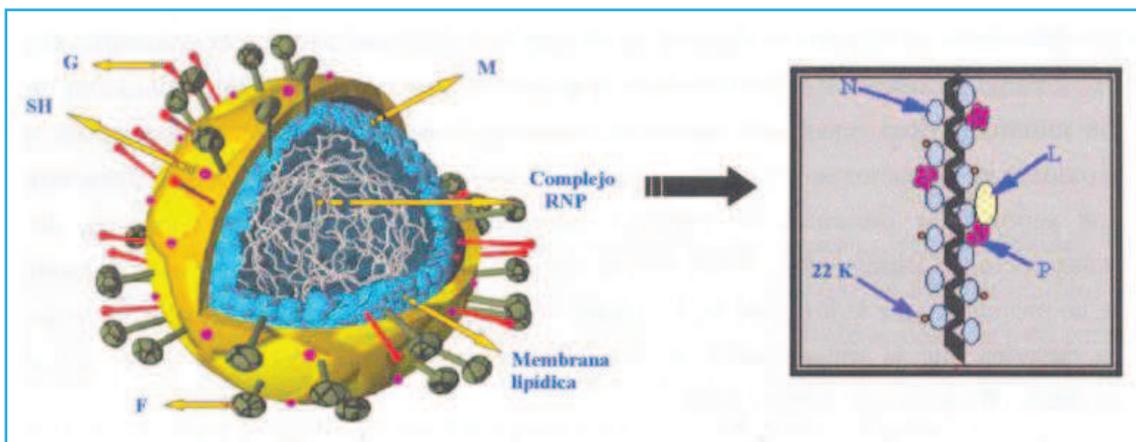


Figura1.2: Representación esquemática de la estructura de VRSH, en la cual se señala la localización de las distintas proteínas que componen el virión (Modificado de Ramírez, 2004).

A continuación se indican brevemente las características principales de las diez proteínas codificadas por el genoma del VRSH.

1.4.1.2.1 Núcleo proteína (N):

Es la proteína principal de la nucleocápside y es ligeramente básica. Se localiza con las proteínas P y M2 (22K) y probablemente L, en inclusiones citoplasmáticas presentes en células infectadas con el virus o transfectadas con plásmidos que expresan los genes correspondientes. El complejo N-ARN es el molde funcional para la transcriptasa y replicasa viral (García *et al.*, 1993; García-Barreno *et al.*, 1996). El complejo N-RNA es el molde funcional para la polimerasa viral (Reyes, 2001).

1.4.1.2.2 Fosfoproteína (P):

Es ácida e hidrofílica y está fosforilada en residuos de serina (Ser) localizados principalmente en las zonas central y C-terminal de la molécula. El extremo C-terminal de la proteína P es esencial para la interacción con la proteína N. La fosfoproteína es un cofactor esencial de la ARN polimerasa viral (Ramírez, 2004).

1.4.1.2.3 Proteína L:

A esta proteína se le atribuye la actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN del VRSH. Esta es muy similar en longitud a las polimerasas de otros virus de ARN de genoma no segmentado y polaridad negativa. El alineamiento de aminoácidos pone de manifiesto una alta homología en las secuencias de las polimerasas de otros paramixovirus y rabdovirus. Esta proteína tiene seis regiones altamente conservadas entre las RNA polimerasas de distintas familias de virus que posiblemente corresponden a distintos dominios funcionales de la proteína (Stec *et al.*, 1991). Es básica y relativamente hidrofóbica con un alto contenido de leucina e isoleucina (Collins *et al.*, 2001).

1.4.1.2.4 Proteína matriz (M):

Esta es una proteína no glicosilada que se localiza en la cara interna de la envoltura viral. Es relativamente básica y posee un dominio hidrofóbico en el tercio C-terminal de la molécula que mediaría la interacción con la membrana (Collins *et al.*, 2001). Se piensa que tiene dos funciones generales. La primera es mantener la nucleocápside transcripcionalmente inactiva antes del empaquetamiento y la segunda mediar la asociación de la nucleocápside con la envoltura naciente durante la morfogénesis del virus (Ramírez, 2004).

1.4.1.2.5 Proteína M2 ó 2K:

Esta proteína es muy básica y relativamente hidrofílica. Se localiza con las proteínas N y P en los cuerpos de inclusión citoplasmáticos presentes en las células infectadas por el VRSH (Gracia *et al.*, 1993).

El gen M2 contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF) que se solapan en 32 nucleótidos. El producto del primer marco de lectura, denominado 22K (ORF-1), da lugar a un polipéptido de 22KDa de peso molecular.

1.4.1.2.6 Proteína M2-2:

La fase de lectura M2-2 (ORF-2) codifica para una proteína más pequeña que recientemente se ha encontrado en extractos de células infectadas, aunque no se sabe todavía si se incorpora al virión (Ahmandian. *et al.*, 2000).

La proteína 22K es un antiterminador de la transcripción y es esencial para la viabilidad del virus, mientras que la M2-2 parece actuar como factor regulador implicado en el equilibrio entre la replicación y la transcripción de ARN (Ramírez, 2004).

1.4.1.2.7 Proteínas no estructurales NS1 y NS2:

Son tan pequeñas que se consideran no estructurales porque no se han encontrado en virus maduros, aunque abundan en células infectadas (Collins *et al.*, 2001). La NS1 coprecipita con la proteína M, mientras que la NS2 se localiza en las células con la proteína N pero no coprecipita con ninguna proteína viral, a pesar de que ambas parecen formar homo-oligonucleótidos. La NS1 es un inhibidor de la síntesis de ARN_v, aunque esa inhibición no es específica sólo del VRSH por lo cual se desconoce cuál es su verdadera función. La proteína NS2 no es esencial para la replicación viral, aunque en su ausencia los virus son atenuados (Teng & Collins, 1999). Estas dos proteínas han sido recientemente identificadas como antagonistas del interferón α/β (Ramírez, 2004).

1.4.1.2.8 Proteína SH:

Es una proteína de membrana ligeramente básica, con una larga región hidrofóbica central y dos sitios potenciales de glicosilación, uno a cada extremo de la proteína. Se acumula en células infectadas en cuatro formas diferentes (SH₀, SH_t, SH_g y SH_p), dos de ellas glicosiladas (SH_g y SH_p), pero solo se incorpora en pequeñas cantidades en los virones. La función de esta proteína es todavía desconocida. Algunos trabajos implican a la proteína SH junto con las glicoproteínas F y G en la formación de sincitios en las células infectadas, a pesar de que la delección de este gen no afecta a la viabilidad del virus en cultivo. En experimentos donde se expresaba la proteína SH en bacterias se evidenció que estas aumentaban la permeabilidad de la membrana bacteriana a compuestos de bajo peso molecular. Este resultado sugiere que la proteína SH podría estar implicada en la desestabilización de la membrana de la célula infectada (Pérez *et al.*, 1997).

1.4.1.2.9 Glicoproteína F:

Media la penetración del virus en la célula por fusión de sus membranas permitiendo la entrada de la nucleocápside en el citoplasma de la célula huésped. F es una glicoproteína tipo I, que se inserta en la membrana por la región hidrofóbica C-terminal. Así mismo, la glicoproteína F media la fusión de la membrana de la célula infectada con las células adyacentes, dando lugar a la propagación del virus y la formación de sincitios (Walsh & Hruska, 1983). Esta proteína se caracteriza como un precursor inactivo F₀, el mismo es procesado proteolíticamente por una proteasa celular, dando lugar a dos subunidades F1 y F2 que quedan unidas covalentemente por puentes disulfuro, antes de alcanzar la superficie celular (Collins *et al.*, 2001).

1.4.1.2.10 Glicoproteína G:

Es la responsable de la unión del virus al receptor celular en las primeras etapas del ciclo infeccioso. Se ha propuesto que el receptor está constituido por los proteoglicanos sulfatados presentes en la superficie. No comparte homologías de secuencia con otros paramixovirus y carece de actividades hemaglutinina y

neuraminidasa. La secuencia de nucleótidos del gen de la glicoproteína G predice un polipéptido de 292 a 299 aminoácidos dependiendo de la cepa. Está altamente glicosilada y tiene una estructura no globular, cuyo ectodominio tiene similitud con las mucinas (glicoproteínas que forman una barrera protectora en los tractos respiratorio, reproductor y gastrointestinal) (Ramírez, 2004).

Es una glicoproteína transmembrana tipo II, con una región hidrofóbica cerca del extremo N-terminal, que le sirve tanto de péptido señal como de anclaje de membrana, dejando en el exterior C-terminal dos terceras partes de la molécula orientadas hacia el exterior. Es en este último dominio donde se localizan cuatro residuos de Cys conservados en todas las cepas de virus secuenciadas y que forman parte de un motivo estructural que se ha propuesto como el sitio de unión al receptor (Johson *et al.*, 1987). La glicoproteína G también se sintetiza como forma soluble debido a la iniciación de la traducción en un segundo codón de iniciación, que está en fase con el primero situado en el aminoácido 48, el cual se encuentra dentro de la región hidrofóbica (Ramírez, 2004). Aproximadamente, del 16 a 20% del total de la estructura de la forma soluble de la glicoproteína G es todavía desconocida (Reyes, 2001).

El precursor de la proteína se sintetiza como un polipéptido de 32KDa que se modifica durante su síntesis por la adición mediante enlaces *N*-glicosídicos a residuos de asparagina de cadenas de azúcares con alto contenido de manosa, dando lugar a una proteína intermedia de 45 KDa. Este paso es seguido por la conversión de estas cadenas de azúcares al tipo complejo y la adición de cadenas de carbohidratos unidos por enlaces *O*-glicosídicos a residuos de serina o treonina, alcanzándose así la forma madura de 80-90 KDa. La gran contribución de la *O*-glicosilación a la masa de la proteína madura está relacionada probablemente con su alto contenido de sitios potenciales (serina y treonina) para este tipo de modificación (Wathen *et al.*, 1991).

1.4.1.3 Variación Antigénica y Genética del VRSH

El VRSH puede ser dividido en dos grupos antigénicos principales: A y B, cada uno de ellos con varios subgrupos cuyas diferencias antigénicas se basan en las

diferencias de aminoácidos de las glicoproteínas de superficie, fundamentalmente en la proteína G.

1.4.1.3.1 Variación antigénica.

La variación antigénica del VRSH ha sido demostrada mediante la utilización de anticuerpos monoclonales preparados contra las diferentes proteínas del virus como: G, F, N, P y M. Todos los estudios han demostrado que existe una variación antigénica entre los dos subgrupos y dentro de cada subgrupo. Esta variabilidad fue demostrada por reactividad con anticuerpos monoclonales, lo cual reveló que la glicoproteína G fue la más variable (Ramírez, 2004).

Se han identificado tres tipos de epítomos en la molécula G del VRSH (García-Barreno, 1994), los cuales son:

- Epítomos específicos de cepas, que solo estuvieron en el virus que se empleó para obtener el anticuerpo monoclonal o epítomos variables, existentes solamente en algunos virus del mismo subgrupo.
- Epítomos específicos de subgrupos, presentes en todas las cepas del mismo subgrupo antigénico.
- Epítomos conservados, presentes en todos los aislamientos de VRSH.

Los epítomos específicos de cepa han sido mapeados dentro del tercio C-terminal del ectodominio de la glicoproteína G. Los epítomos de las otras dos clases, han sido localizados cerca de la zona conservada del ectodominio donde están las cuatro cisteínas.

1.4.1.3.2 Variación genética.

Para estudios de la variación genética entre cepas del subgrupo A y B, primeramente fueron usados ensayos de protección con ARNs_a y sondas correspondientes a los genes P, M2, N, F y G. Estos ensayos pudieron ser usados para

diferenciar ambos subgrupos virales, así la variabilidad genética dentro de cada subgrupo fue evidente (Cristina *et al.*, 1991).

Ha sido reportado que el porcentaje de homología aminoacídica entre cepas de distintos subgrupos en la glicoproteína G es de un 53%, mientras en las otras proteínas es mucho mayor (SH 76%, F 89%, N 96%). Cuando se comparan cepas del mismo subgrupo la variación que se observa es menor, 80% de identidad de aminoácidos para la glicoproteína G, 97 a 98% para la glicoproteína F, 96 a 98% para la proteína SH y 98 a 99% para la fosfoproteína. Así, la glicoproteína G es la que presenta un mayor grado de variabilidad antigénica y una menor homología a nivel aminoacídico entre las distintas cepas (Cane, 2001).

La secuenciación nucleotídica del gen de la glicoproteína G, mostró que la variabilidad aminoacídica fue de un 20% dentro del subgrupo A y de un 9% dentro del subgrupo B.

1.4.1.3.3 Caracterización molecular de la glicoproteína G.

Los estudios de variabilidad genética se han focalizado en la glicoproteína G, debido a su elevada capacidad para diferenciar cepas que pudieran ser idénticas en otros productos génicos. También se ha visto que virus aislados en lugares geográficamente distantes y en diferentes años, pueden estar genéticamente más relacionados que virus aislados en un mismo lugar durante dos días consecutivos (Melero *et al.*, 1997).

Aproximadamente un 50% de los cambios de nucleótidos dan lugar a cambios de aminoácidos entre los distintos virus, además la mayoría de estas diferencias se encuentran en el ectodominio de la proteína, lo que sugiere un efecto selectivo de la respuesta inmune del huésped. La variabilidad de la glicoproteína G pudiera ser una adaptación evolutiva para el virus, que de alguna forma facilita las frecuentes infecciones (Cane, 2001).

Como fue descrito anteriormente, la glicoproteína G del VRSH es el componente estructural del virus que presenta el mayor grado de heterogeneidad

antigénica y genética inter e intra subgrupos. Esto lo señala como el mejor candidato para realizar estudios de variabilidad entre los diferentes aislamientos de este virus que pueden diferenciarse en su glicoproteína G aunque tengan idénticos otros productos génicos (Odalys, 2004).

Además de los cambios nucleotídicos que dan lugar a sustituciones de aminoácidos, también se ha observado entre los aislamientos del VRSH, cambios de nucleótidos que generan codones de terminación alternativos, produciendo proteínas de diferentes longitudes. En el subgrupo A, la longitud de la proteína G oscila entre 295 a 298 aminoácidos (García, 1994). En el subgrupo B, la posición de los codones de terminación da lugar a mayores variaciones, fluctuando entre 292 a 299 aminoácidos (Sullender *et al.*, 1991).

En las variaciones genéticas de los virus ARN, las mutaciones se producen como consecuencia de incorporaciones erróneas de nucleótidos por la ARN polimerasa durante la replicación del genoma viral debido a que la misma carece de actividad editora 3'--- 5' (DeFilippis, 2001). Recientemente ha sido estimado que la frecuencia de mutación de la ARN polimerasa para el subgrupo A del VRSH es de $1,83 \times 10^{-3}$ sustituciones nucleotídicas/sitio/año (Zlateva *et al.*, 2004).

El uso de la Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), constituyen técnicas rápidas que permiten conocer la variabilidad genética de cepas en una epidemia en un gran número de muestras. Las regiones del genoma seleccionadas para este análisis, han sido una parte del gen N, el extremo 5' del gen SH y una parte de la glicoproteína G. El análisis de restricción de una parte del gen N, permitió identificar varios genotipos dentro de un mismo subgrupo, así se identificaron 3 genotipos para el subgrupo A (NP2, 4, y 5) y 3 para el subgrupo B (NP1, 3 y 6). La secuenciación nucleotídica de una parte del gen SH arrojó 6 genotipos para el subgrupo antigénico A, designados SHL1-SHL6 (Ramírez, 2004).

Como se describió previamente, la variabilidad en la glicoproteína G no está igualmente distribuida en la molécula. Los dominios transmembrana y citoplasmático están más conservados que el dominio extracelular. Dentro de éste, existen dos regiones hipervariables, una se localiza entre los residuos 101 a 133 y la segunda es más extensa

y abarca el tercio C-terminal de la proteína. Estas regiones están separadas por un dominio muy conservado que engloba el único segmento idéntico entre los dos subgrupos (residuos 164 a 176), el cual es un posible sitio de unión al receptor (Jonson *et al.*, 1987).

Aproximadamente un 50% de los cambios de nucleótidos dan lugar a cambios de aminoácidos entre los distintos virus. La mayoría de estas diferencias se encuentran en el ectodominio de la proteína, lo que sugiere un efecto selectivo de la respuesta inmune del huésped. La variabilidad de la glicoproteína G pudiera ser una adaptación evolutiva para el virus, que de alguna forma facilite las frecuentes infecciones (Cane, 2001).

1.5 Hipótesis

Las técnicas de análisis de ácidos nucleicos permiten la rápida detección y tipificación de Virus Sincitial Respiratorio (VRS), en muestras respiratorias de niños con diagnóstico de asma y con sospecha de infección respiratoria subyacente.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La unidad académica responsable del presente proyecto fue la Carrera de Ingeniería en Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), bajo la dirección del Dr. Marcelo Grijalva y la codirección de la Ing. Paola Párraga.

Además, para la ejecución de este estudio se contó con la colaboración de la Dra. Gilda Salgado y el Dr. Osvaldo Moineda del Hospital de niños “Baca Ortiz” de la ciudad de Quito, la Lcda. Sandra Vivero del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador y el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) de la ciudad de Panamá.

2.2 Zona de estudio

El desarrollo del presente proyecto fue realizado por partes y en diferentes entidades.

La toma y recolección de muestras respiratorias se realizó en el Hospital Pediátrico “Baca Ortiz” de la ciudad de Quito, ubicado en la Av. Colón y Av. Seis de Diciembre (esquina), dentro del Cantón Quito, las mismas que comprendieron de hisopados nasofaríngeos.

La extracción del material genético se la realizó en los Laboratorios del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, ubicado en el sector de “El Dorado” dentro del Cantón Quito.

El análisis molecular del material genético obtenido fue llevado a cabo en el Laboratorio de Virología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), ubicado en la Av. Justo Arosemena y Calle 35 en la ciudad de Panamá.

2.3 Período de tiempo de investigación

El presente estudio se llevó a cabo en un periodo de aproximadamente 10 meses. El inicio de la investigación fue el 10 de febrero del 2011 y su fecha de finalización el viernes 9 de diciembre del mismo año.

2.4 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos a través de los consentimientos informados y el análisis molecular de la muestra de cada paciente, se procedió a ingresar los datos en una hoja electrónica desarrollada en Microsoft Excel (Anexo C), a partir de la cual se realizó un análisis exploratorio de datos o estadística descriptiva de las variables cualitativas y cuantitativas el cual está basado en la expresión de los resultados en forma de tablas y cuadros descriptivos.

2.5 Procedimientos

2.5.1 Determinación del tamaño de muestra

Primero se realizó el cálculo de tamaño de muestra necesario para esta investigación, para el cual se utilizó la fórmula de estimación de proporciones poblacionales, tomando en cuenta una precisión del 95% y un poder del 80%.

$$n = \frac{N * p * q * z^2}{(N - 1) * e^2 + p * q * z^2}$$

Donde:

N = población de niños en edad escolar en el Ecuador (n=600000)

p = proporción poblacional estimada de niños en edad escolar con infecciones respiratorias tipo asma (5%)

$$q = 1 - p$$

z = nivel de confianza (1,96)

e = error máximo (5%)

2.5.2 Preparación del medio de transporte viral

Se preparó PBS con agua DEPC a una concentración 1X y se esterilizó el medio posteriormente en un autoclave a 125°C y 1.5 - 2.0 psi de presión. Luego, se dispensaron 2mL de este medio de transporte en tubos de 15mL, los cuales se almacenaron a 4°C.

2.5.3 Toma de la muestra nasofaríngea

Para obtener las muestras necesarias para este estudio se realizó un hisopado de la pared interna de la fosal nasal. Luego, el hisopo fue introducido en el tubo con medio de transporte previamente preparado y almacenado en un *cooler* a aproximadamente 4°C.

2.5.4 Extracción del ARNv mediante el método del Trizol®, a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo.

- a. Se homogenizó el medio que estuvo previamente en contacto con el hisopado nasofaríngeo con la ayuda de una pipeta Pasteur.
- b. Se tomaron 1.5mL de la mezcla y se colocaron en un microtubo de 1.5mL con la ayuda de una pipeta Pasteur.
- c. Se centrifugaron los microtubos a 1200 rpm durante 5 minutos.
- d. Se retiró el sobrenadante con ayuda de una micropipeta sin alterar el *pellet*.
- e. Se lavó el *pellet* de células agregando 1 mL de PBS estéril y se lo resuspendió con la ayuda de una pipeta Pasteur.
- f. Se centrifugó la mezcla a 1000 rpm durante 5 minutos.
- g. Se retiró el sobrenadante con ayuda de una micropipeta sin alterar el *pellet*.

- h. Se agregaron 500µL de Trizol® al pellet previamente obtenido y se lo resuspendió empleando una micropipeta y un vórtex.
- i. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- j. Se agregaron 50µL de cloroformo y se agitó la mezcla en un vórtex durante 15 segundos.
- k. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- l. Se centrifugó la mezcla a 14000 rpm durante 10 minutos.
- m. Se transfirió la fase acuosa (capa superior) a un nuevo tubo y se agregaron 250µL de isopropanol.
- n. Se mezcló e incubó la solución a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- o. Se centrifugó la solución a 14000 rpm durante 10 minutos.
- p. Se descartó el sobrenadante.
- q. Se lavó el *pellet* de ARMv con 500µL de etanol al 75%.
- r. Se centrifugó la mezcla a 1400 rpm durante 2 minutos.
- s. Se descartó el etanol mediante volteo y se dejó secar el restante durante 10 minutos.
- t. Se resuspendió el *pellet* obtenido en 20µL de agua destilada estéril.

2.5.5 Obtención de controles positivos

Para la obtención de los controles positivos utilizados en el presente estudio se utilizó la prueba Simplexa™ Flu A/B & RSV de *Focus Diagnostic* (Anexo B), la cual se ha diseñado para su uso en el termociclador 3M *Integrated Cycler*; para la detección cualitativa y la diferenciación *in vitro* de ARN de virus influenza A, B y Virus Respiratorio Sincitial (VRS) en frotis nasofaríngeos de pacientes con signos y síntomas de infección viral y que presentan factores de riesgo clínicos y epidemiológicos.

La prueba consiste en un ensayo de amplificación por RT-PCR en tiempo real y un sistema de detección que utiliza un cebador-sonda fluorescente bifuncional.

Como prueba adicional se realizó la secuenciación para corroborar los resultados obtenidos con la prueba Simplexa™ Flu A/B & RSV de *Focus Diagnostic* y el método de *primers* específicos; para la tipificación de grupos VRSH a y B.

2.5.6 Reconstitución de *primers*

Para la reconstitución de *primers*, se trabajó dentro de la cámara de flujo laminar, siguiendo los siguientes pasos:

- a. Se centrifugó cada frasco del *primer* liofilizado antes de abrir el frasco.
- b. Se resuspendió con el volumen de agua (grado biología molecular) adecuadamente calculado para cada *primer*.
- c. Se dejó hidratar durante 5 minutos y se mezcla mediante vórtex por 5 minutos.
- d. Se dispensó en alícuotas de 50µL en tubos de PCR.
- e. Se almacenó a -20° C.

2.5.7 Transcripción Reversa Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Las técnicas de Transcripción Reversa y genotipificación para las muestras positivas de VRSH mediante la utilización de una PCR con *primers* específicos, que se realizó en este estudio se basaron en el estudio de Arbiza y colaboradores en el 2003.

Las secuencias de los cebadores utilizados tanto para la retrotranscripción, amplificación y genotipificación del fragmento G, en esta técnica son tomados de la parte conservada del gen G desde los 4 690 pb hasta los 5 589 pb; que codifican un total de 923 pb para el gen G, 480 pb para el VRSH tipo A y 496 pb para el VRSH tipo B.

Tabla 2.1: Cebadores específicos utilizados en esta investigación, junto con sus respectivas secuencias; tomados de Arbiza y colaboradores en el 2003.

| Nombre del Cebador | Secuencia |
|----------------------|------------------------------------|
| LG3 (-) anti sentido | 5'- GGCCCGGGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTT-3 |
| LG5 (+) sentido | 5'-GGATCCCGGGGCAAATGCAAACATGTCC-3' |
| 480 (+) sentido | 5'-ACAAACCACCAAACAAACCC-3' |
| 496 (+) sentido | 5'-GATGATTACCATTTTGAAGTGTTCA-3' |

Por tratarse de un virus de ARN es necesaria una etapa previa de obtención de un ADNc por medio de una reacción con Transcriptasa Reversa (RT). A partir de este ADNc se realizó la amplificación mediante la técnica de PCR.

Para esto se tomaron los siguientes reactivos y concentraciones:

Tabla 2.2: Condiciones, Volúmenes y Reactivos para la Transcripción Reversa de ARN de Virus Sincitial Respiratorio Humano perteneciente a la extracción mediante el método del Trizol®.

| Condiciones y Volúmenes | | | | |
|-------------------------|------|-------|------------|--------------|
| Reactivo | []o | []f | Unidad | 1X / μ L |
| Agua | | | | 9 |
| Buffer FS | 5 | 1 | X | 4 |
| dNTP's mix | 10 | 0,2 | mM | 2 |
| Primer LG3 (-) | 20 | 0,8 | μ M | 1 |
| Super Script III | 200 | 10 | U/ μ L | 1 |
| Buffer DTT | 0,1 | 0,005 | M | 1 |
| RNasa OUT | 40 | 2 | U/ μ L | 1 |
| Muestra de ARN (-) | | | | 3 |
| VOLUMEN TOTAL | | | | 22 |

La mezcla se colocó en un Termociclador (*Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 2700*), con las siguientes condiciones:

Tabla 2.3: Programa de Termociclado para condiciones volúmenes y reactivos pertenecientes a la Transcripción Reversa de ARN de Virus Sincitial Respiratorio Humano.

| Fase | Temperatura (°C) | Tiempo | Numero de Ciclos |
|----------------------------------|------------------|--------|------------------|
| Activación de la enzima | 70 | 5 min | 1 |
| Ubicación de los <i>primers</i> | 37 | 5 min | 1 |
| Eliminación de restos de ARN (-) | 42 | 60 min | 1 |
| Eliminación total de ARN (-) | 70 | 10 min | 1 |

2.5.8 Amplificación del gen G.

Se amplificó un fragmento del gen G, el cual codifica para la proteína de adsorción G, del Virus Sincitial Respiratorio Humano.

Para esto se tomaron los siguientes reactivos y concentraciones:

Tabla 2.4: Condiciones, Volúmenes y Reactivos para la Amplificación de ADN complementario de Virus Sincitial Respiratorio Humano obtenido en la Transcripción Reversa.

| Condiciones y Volúmenes | | | | |
|-------------------------|------|------|------------|--------------|
| Reactivo | []o | []f | Unidad | 1X / μ L |
| Agua | | | | 14,75 |
| Buffer | 10 | 1 | X | 5 |
| MgCl ₂ | 50 | 1,5 | mM | 1,5 |
| dNTP's mix | 10 | 0,2 | mM | 0,5 |
| Primer LG3 (-) | 20 | 0,8 | μ M | 0,5 |
| Primer LG5 (+) | 20 | 0,8 | μ M | 0,5 |
| Taq Polimerasa | 5 | 1,5 | U/ μ L | 0,25 |
| ADNc | | | | 2 |
| VOLUMEN TOTAL | | | | 25 |

Esta mezcla se colocó en un Termociclador (Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 2700) con el siguiente programa:

Tabla 2.5: Programa de Termociclado perteneciente a la Amplificación de ADN complementario de Virus Sincitial Respiratorio Humano.

| Fase | Temperatura (°C) | Tiempo | Numero de Ciclos |
|-------------------------|------------------|--------------|------------------|
| Activación de la enzima | 95 | 5 min | 1 |
| Denaturación | 94 | 1 min 30 seg | 35 |
| Hibridación | 54 | 40 seg | |
| Elongación | 72 | 1 min | |
| Extensión final | 72 | 10 min | 1 |

2.5.9 Genotipificación del ADN obtenido

Utilizando el método de *primers* específicos, se empleó el protocolo tomado de Arbiza y colaboradores en el 2003 para la genotipificación del Virus Sincitial Respiratorio Humano Tipo A. Para esto se tomaron los siguientes reactivos y concentraciones:

Tabla 2.6: Condiciones, Volúmenes y Reactivos para la PCR de VRSH tipo A mediante el método de *primers* específicos.

| Condiciones y Volúmenes | | | | |
|-----------------------------------|------|------|--------|--------|
| Reactivo | []o | []f | Unidad | 1X /μL |
| Agua | | | | 14,75 |
| Flexi buffer | 10 | 1 | X | 5 |
| MgCl ₂ | 50 | 1,5 | mM | 1,5 |
| dNTP's mix | 10 | 0,2 | mM | 0,5 |
| Primer LG3 (-) | 20 | 0,8 | μM | 0,5 |
| Primer 480 (+) | 20 | 0,8 | μM | 0,5 |
| Taq Polimerasa | 5 | 1,5 | U/μL | 0,25 |
| ADN del producto de amplificación | | | | 2 |
| VOLUMEN TOTAL | | | | 25 |

La mezcla de la PCR anidada se colocó en un termociclador (*Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 2700*) con el siguiente programa:

Tabla 2.7: Programa de Termociclado empleado en este estudio para PCR de identificación de Virus Sincitial Respiratorio Humano de tipo A para el equipo *Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 2700*.

| Fase | Temperatura (°C) | Tiempo | Numero de Ciclos |
|-------------------------|------------------|--------------|------------------|
| Activación de la enzima | 95 | 5 min | 1 |
| Denaturación | 94 | 1 min 30 seg | 35 |
| Hibridación | 54 | 40 seg | |
| Elongación | 72 | 1 min | |
| Extensión final | 72 | 10 min | 1 |

Para la Tipificación del grupo B se empleó el mismo protocolo, con la diferencia de que el *primer* 480(+) es sustituido por el *primer* 496(+) para obtener un fragmento de 496 pares de bases.

2.5.10 Detección del producto amplificado por medio de la electroforesis en gel de agarosa

Una vez concluida la PCR anidada, estos productos fueron detectados en geles de agarosa al 1.5% con bufer TBE 1X (Tris 0.089M, ácido bórico 0.089M, EDTA 0.002M), el cual se tiñó con bromuro de etidio (10mg/ml). La corrida se realizó a 90V durante 40 minutos, empleando como marcador de peso molecular el *Marker VIII* (Promega), con un rango entre 100 y 1500 pares de bases (pb). La visualización de las bandas se realizó por exposición de gel a la luz ultravioleta en un transiluminador. El tamaño de fragmento amplificado que se esperaba para el gen GA era de 480 pb y para el GB era de 496 pb.

2.5.11 Análisis de datos

Con los datos de los consentimientos informados y los resultados obtenidos de cada niño, se realizó un análisis estadístico descriptivo.

Para la prueba con Simplexa™ Flu A/B & VRS (Frizonex) de PCR en Tiempo Real se tomó en cuenta el criterio de positividad para el algoritmo considerado, donde el ensayo se reportó como positivo cuando hubo una detección de las sondas con valores de Ct para VRS comprendidas en un rango de 14,4 a 35,3. Se reportó como negativo la ausencia de detección de la fluorescencia o una detección que supera los 35,3 ciclos.

Para el protocolo que empleó *primers* específicos, cedido por Arbiza y colaboradores en el 2003; se tomó en cuenta el criterio de positividad, donde el ensayo se reportó como positivo cuando hubo detección de bandas de 480 y 496 pb. y reportándose como negativo la ausencia de bandas en la corrida del gel de agarosa.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Muestras biológicas

3.1.1 Resultados del cálculo de muestra

Se recolectaron un total de 73 muestras de niños con asma, en edades comprendidas desde los 6 hasta los 12 años en sus episodios asmáticos, en el periodo de Febrero a Julio del 2011.

$$n = \frac{600000 * 0.05 * 0.95 * 1.96^2}{600000 - 1 * 0.05^2 + 0.05 * 0.95 * 1.96^2} = 72.98$$

$$n = 73$$

Donde:

N = población de niños en edad escolar en el Ecuador igual a 600000

p = proporción poblacional estimada de niños en edad escolar con infecciones respiratorias tipo asma equivalente a 5%

$$q = 1 - p$$

z = nivel de confianza de 1,96

e = error máximo del 5%

Se logró recolectar un total de 18 muestras adicionales de pacientes con las características requeridas en este estudio.

3.2 Obtención de los controles positivos

3.2.1 Visualización de gráfica de amplificación de PCR en tiempo real

Mediante el uso de la Prueba Simplexa™ Flu A/B & VRS (Frizonex) de RT-PCR en Tiempo Real para detección cualitativa y la diferenciación del ARN viral de los virus influenza A, B y del VRS *in vitro*; se obtuvieron los controles de VRSH para esta investigación. Con valores desde los 14,4 hasta los 35,3 de Ct ciclo umbral detectado, como se muestra en la siguiente figura 3.1 y en la figura 3.2 se muestra la presencia o ausencia del VRS en las muestras de los niños control cedidas por el Hospital Baca Ortiz.

| Well | Sample Id | FLU A (FAM) | FLU B (JOE) | RSV (CFR610) | RNA IC (Q670) | QC Statement | Notes |
|------|-----------|-------------|-------------|--------------|---------------|--------------------------------|----------------------------|
| 1A | Pos_Ctrl | 0 | 17 | 0 | 0 | FLU A, FLU B, RSV - QC Failure | FLU B:EC500 - Data Quality |
| 1B | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | RNA IC - QC Failure | |
| 1C | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | RNA IC - QC Failure | |
| 1D | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | RNA IC - QC Failure | |
| 1E | 4 | 0 | 0 | 39 | 0 | | |
| 1F | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | RNA IC - QC Failure | |
| 1G | 6 | 0 | 0 | 21.1 | 0 | | |
| 1H | 7 | 0 | 0 | 18.3 | 0 | | |
| 2A | 8 | 36.9 | 0 | 23.1 | 0 | | |
| 2B | 9 | 0 | 0 | 25.6 | 0 | | |
| 2C | 10 | 0 | 0 | 32.1 | 0 | | |
| 2D | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | RNA IC - QC Failure | |
| 2E | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | RNA IC - QC Failure | |
| 2F | 13 | 0 | 0 | 24.4 | 0 | | |
| 2G | 14 | 0 | 0 | 38.3 | 0 | | |
| 2H | NTC | 0 | 0 | 39 | 0 | RSV - QC Failure | |

Figura 3.1: Imagen en la que se observan los valores de Ct = ciclo umbral detectado para VRSH con una sonda CFR610, realizado con el equipo de PCR en Tiempo Real, con el software *Interated Cyler Studio* versión 3.0.0.102, para prueba Simplexa™ Flu A/B & VRS (Frizonex).

| Well | Sample Id | FLU A (FAM) | FLU B (JOE) | RSV (CFR610) | RNA IC (Q670) | Interpretation | QC Statement /Notes |
|------|-----------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------------|--|
| 1A | Pos_Ctrl | Not Detected | Detected | Not Detected | Not Detected | Invalid | FLU A, FLU B, RSV - QC Failure FLU B:EC500 - Data Quality |
| 1B | 1 | Not Detected | Not Detected | Not Detected | Not Detected | ----- | RNA IC - QC Failure |
| 1C | 2 | Not Detected | Not Detected | Not Detected | Not Detected | ----- | RNA IC - QC Failure |
| 1D | 3 | Not Detected | Not Detected | Not Detected | Not Detected | ----- | RNA IC - QC Failure |
| 1E | 4 | Not Detected | Not Detected | Detected | Not Detected | ----- | |
| 1F | 5 | Not Detected | Not Detected | Not Detected | Not Detected | ----- | RNA IC - QC Failure |
| 1G | 6 | Not Detected | Not Detected | Detected | Not Detected | ----- | |
| 1H | 7 | Not Detected | Not Detected | Detected | Not Detected | ----- | |
| 2A | 8 | Detected | Not Detected | Detected | Not Detected | ----- | |
| 2B | 9 | Not Detected | Not Detected | Detected | Not Detected | ----- | |
| 2C | 10 | Not Detected | Not Detected | Detected | Not Detected | ----- | |
| 2D | 11 | Not Detected | Not Detected | Not Detected | Not Detected | ----- | RNA IC - QC Failure |
| 2E | 12 | Not Detected | Not Detected | Not Detected | Not Detected | ----- | RNA IC - QC Failure |
| 2F | 13 | Not Detected | Not Detected | Detected | Not Detected | ----- | |
| 2G | 14 | Not Detected | Not Detected | Detected | Not Detected | ----- | |
| 2H | NTC | Not Detected | Not Detected | Detected | Not Detected | Invalid | RSV - QC Failure |

Figura 3.2: Imagen en la que se observan los resultados de Detección Viral, obtenidos con el equipo de PCR en Tiempo Real, con el *software Interated Cyclor Studio* versión 3.0.0.102, para prueba Simplexa™ Flu A/B & VRS (Frizonex).

En las figuras 3.3 y 3.4 se observan las gráficas de amplificación de PCR en tiempo real para las muestras de los niños control cedidas por el Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador, en las cuales se muestran los 9 controles positivos obtenidos para esta investigación. Los colores de la parte superior representan las sondas colorimétricas para la detección cualitativa y la diferenciación del ARN viral *in vitro* de los virus influenza A para el color verde, del virus influenza B para el color azul y del VRS para el color rojo y el control interno de ARN para el color púrpura.

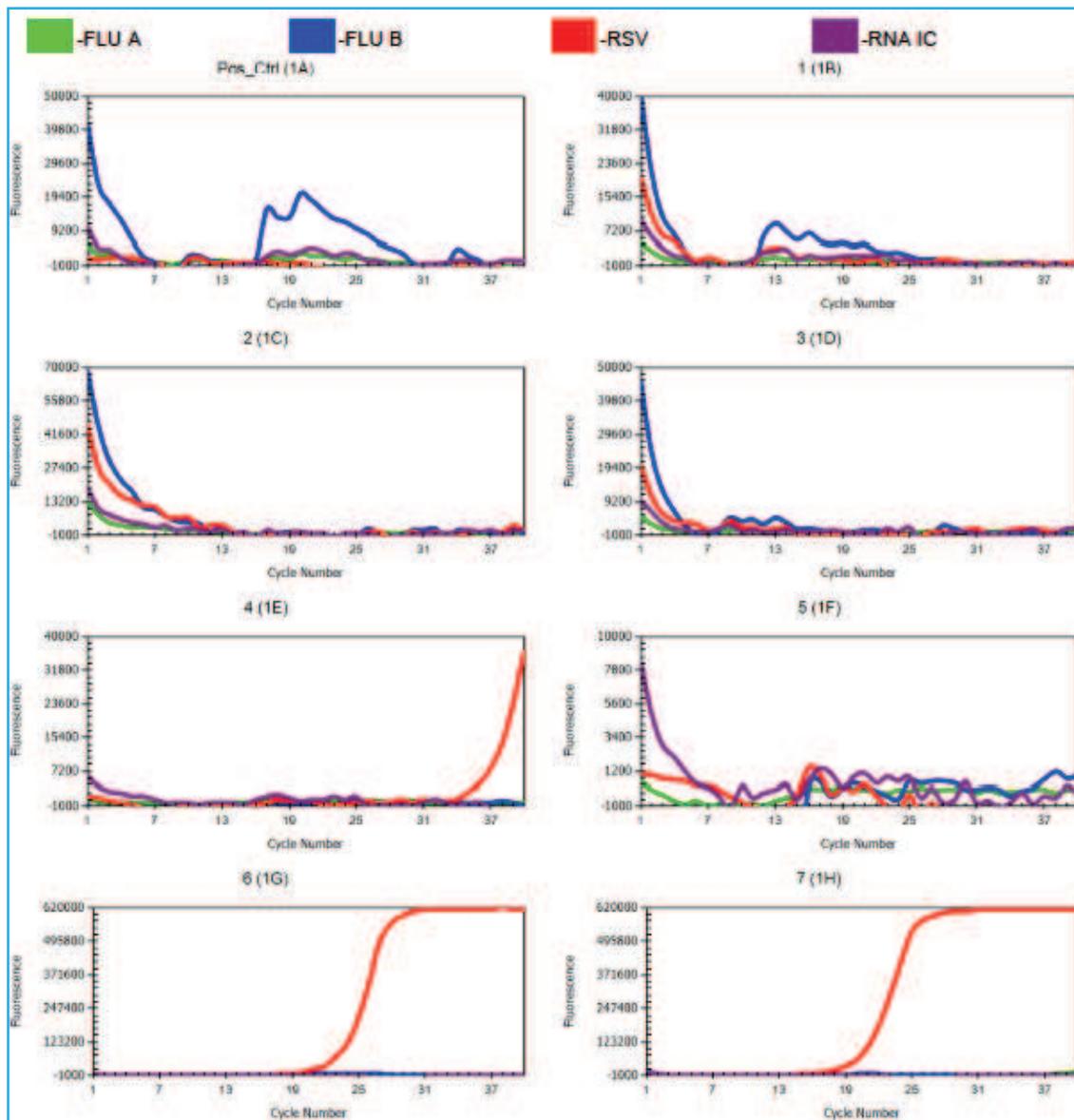


Figura 3.3: Gráfica de amplificación de PCR en tiempo real, de muestras de niños de 0 a 4 años cedidas en el hospital Baca Ortiz, muestras desde la 1 a la 7; obtenidas con el equipo de PCR en Tiempo Real, con el software *Interated Cycler Studio* versión 3.0.0.102, para prueba Simplexa™ Flu A/B & VRS (Frizonex).

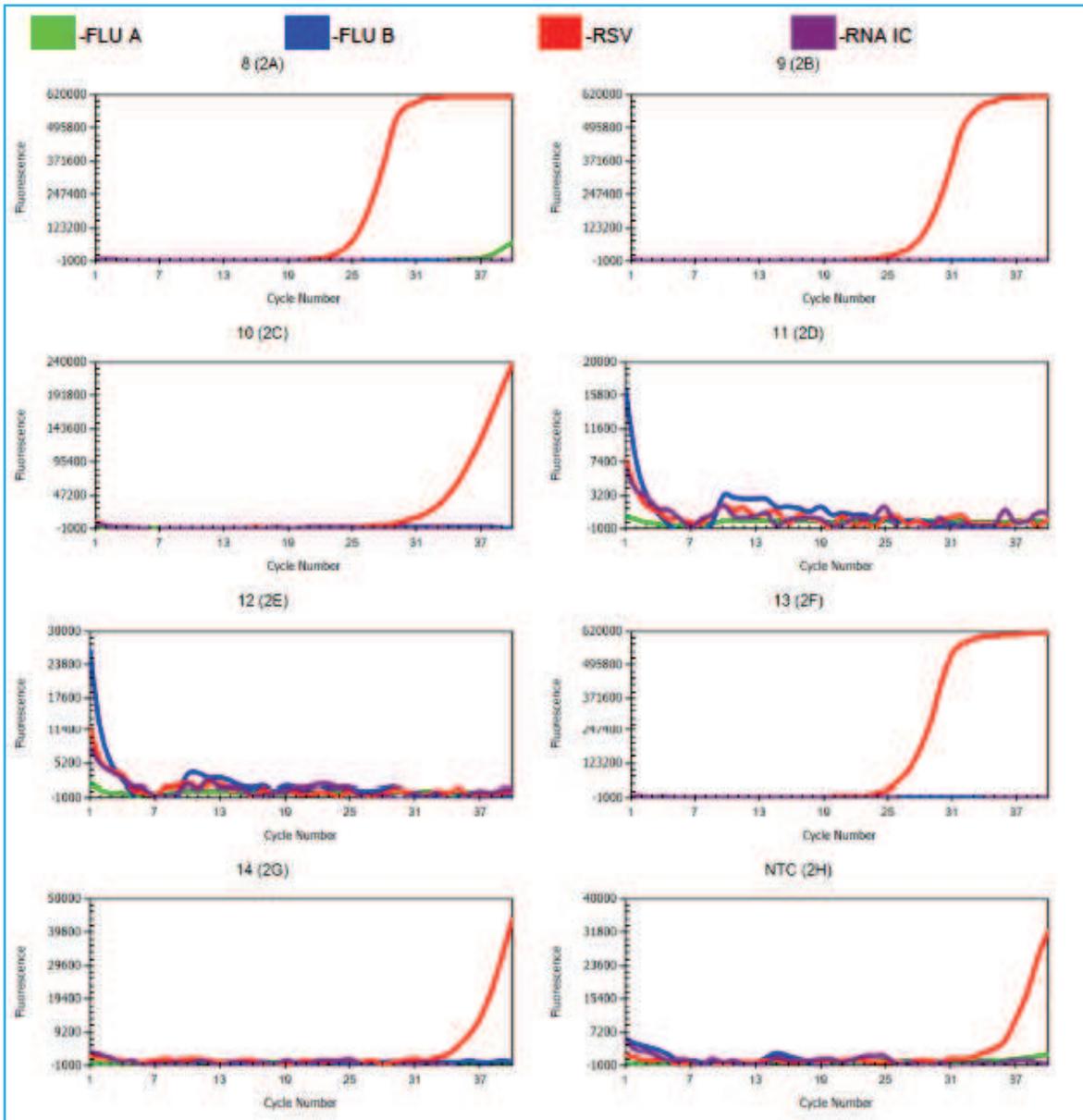


Figura 3.4: Gráfica de amplificación de PCR en tiempo real, de muestras de niños control cedidas en el hospital Baca Ortiz, muestras desde la 8 a la 14; obtenidas con el equipo de PCR en Tiempo Real, con el software *Interated Cyclor Studio* versión 3.0.0.102, para prueba Simplexa™ Flu A/B & VRS (Frizonex).

La figura 3.5 muestra los parámetros de ciclado usados en con el equipo de PCR en tiempo real para la prueba de Simplexa™ Flu A/B & VRS (Frizonex) de RT-PCR para esta investigación.

| Initial Cycles | Time(s) | Temperature(C) | Ramp Rate(C/s) | |
|----------------|----------|----------------|----------------|---------|
| Hold 1 Cycle | 600.0 | 47.0 | 10.0 | |
| Hold 2 Cycle | 120.0 | 97.0 | 10.0 | |
| | | | | |
| Main Cycles | Time(s) | Temperature(C) | Ramp Rate(C/s) | Capture |
| Denaturation | 5.0 | 97.0 | 10.0 | |
| Anneal | 30.0 | 58.0 | 10.0 | Yes |
| Extend 1 | Not Used | | | |
| Extend 2 | Not Used | | | |
| | | | | |
| Final Cycles | Time(s) | Temperature(C) | Ramp Rate(C/s) | |
| Final Hold | Not Used | | | |

Figura 3.5: Parámetros de ciclado de Simplexa Flu A, B y VRS; obtenidos con el equipo de PCR en Tiempo Real, con el *software Interated Cyclor Studio* versión 3.0.0.102, para prueba Simplexa™ Flu A/B & VRS (Frizonex).

El resultado de la secuenciación no pudo ser visualizado debido a un daño efectuado en el equipo y por ello se tomaron los resultados obtenidos en los geles de agarosa por el método de *primers* específicos; los cuales son viables para su determinación entre grupo A y B del VRSH.

3.2.2 Visualización de controles positivos en gel de agarosa de la PCR en tiempo real.

La visualización de amplicones del Virus Sincitial Respiratorio Humano, por tratarse de un virus monocatenario y de ARN (-), solo pueden visualizarse en el gel de agarosa después de la amplificación con los *primers* LG3 (-) LG5 (+) como se puede apreciar en el gel de la siguiente figura:

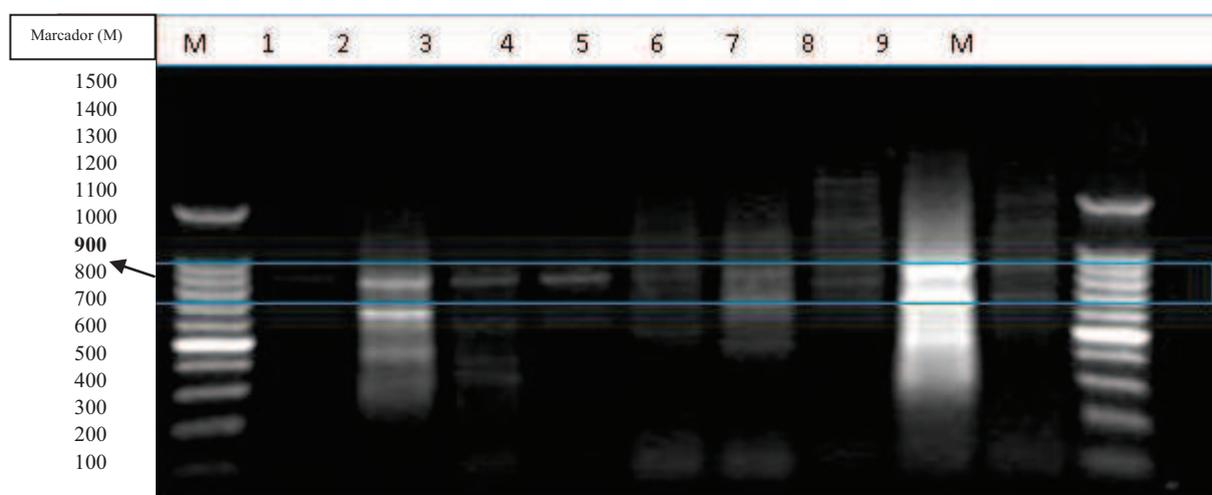


Figura 3.6: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y Buffer TBE al 1X, teñido con bromuro de etidio (10mg/mL), los pocillos del 1 al 9 son de ADNc amplificado a partir de las muestras positivas obtenidas con la prueba Simplexa™ Flu A/B & VRSH (Frizonex); M simboliza el marcador *Marker VIII* (Promega) de peso molecular de 100 a 1500 pb.

3.3 Amplificación del gen G.

En la siguiente figura no se observa la banda de 923pb en las muestras de niños en edad escolar pertenecientes a esta investigación, únicamente se puede apreciarse la banda de 923pb en el control positivo.

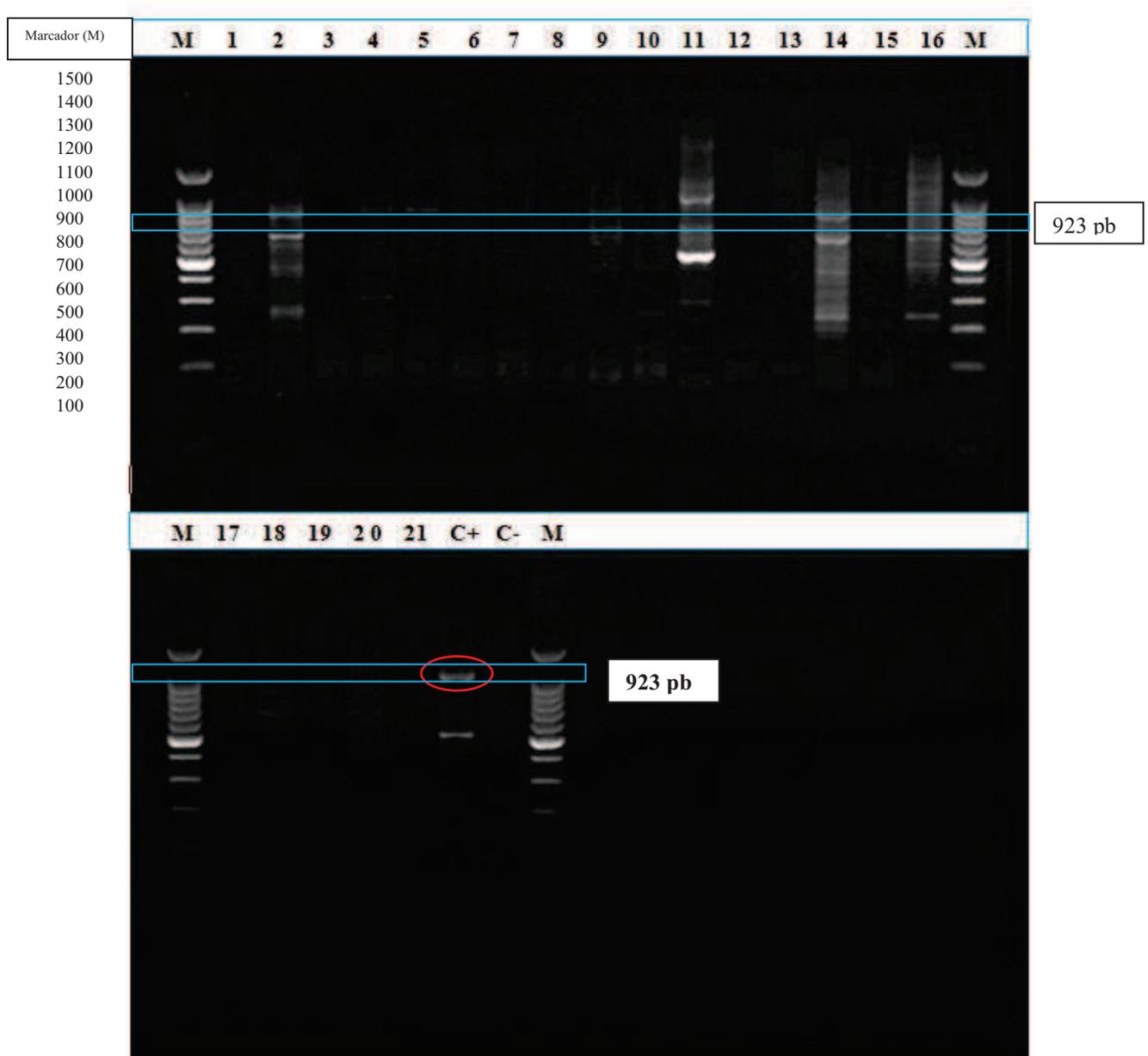


Figura 3.7 : Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y Buffer TBE al 1X, teñido con bromuro de etidio, los pocillos del 1 al 21 son de ADNc amplificado a partir de las muestras de niños con asma en edad escolar del Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador; el pocillo C+ corresponde al control positivo obtenido con la prueba Simpleza™ Flu A/B & VRSH (Frizonex) y el pocillo C- corresponde al control negativo; M simboliza el marcador *Marker VIII* (Promega) de peso molecular de 100 a 1500 pb. En esta figura la banda de 923pb en el control positivo y en el marcador no se observan a la misma altura, porque el marcador migró primero.

3.4 Genotipificación del fragmento del gen G

En las siguientes figuras no se observan las bandas correspondientes a 480pb para el gen A y 496 pb para el gen B:

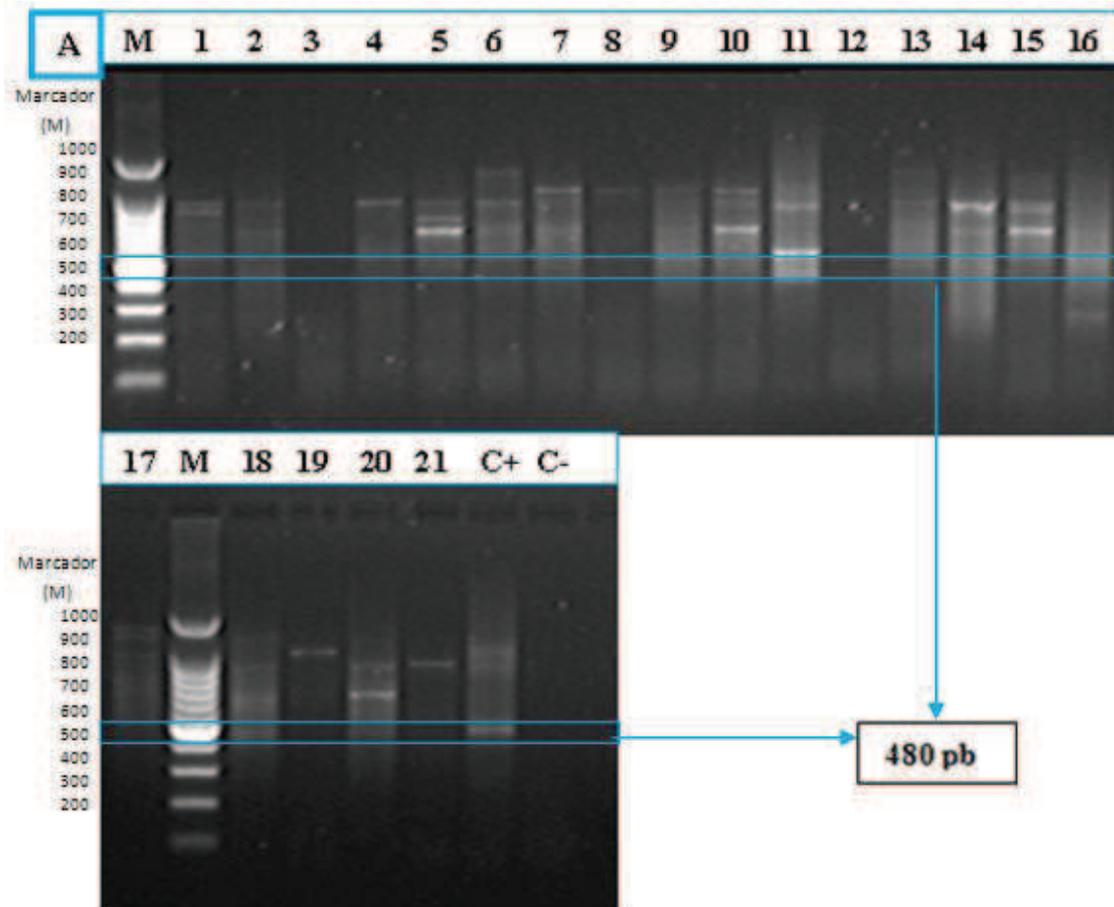


Figura 3.8: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y Buffer TBE al 1X, teñido con bromuro de etidio, Los pocillos del 1 al 21 son de ADNc amplificado y genotipado para GA fragmento de 480 pb, a partir de muestras de niños con asma en edad escolar. Marcador *Marker VIII* (Promega) de peso molecular de 100 a 1500 pb, controles positivos (C+) y controles negativos (C-), respectivamente.

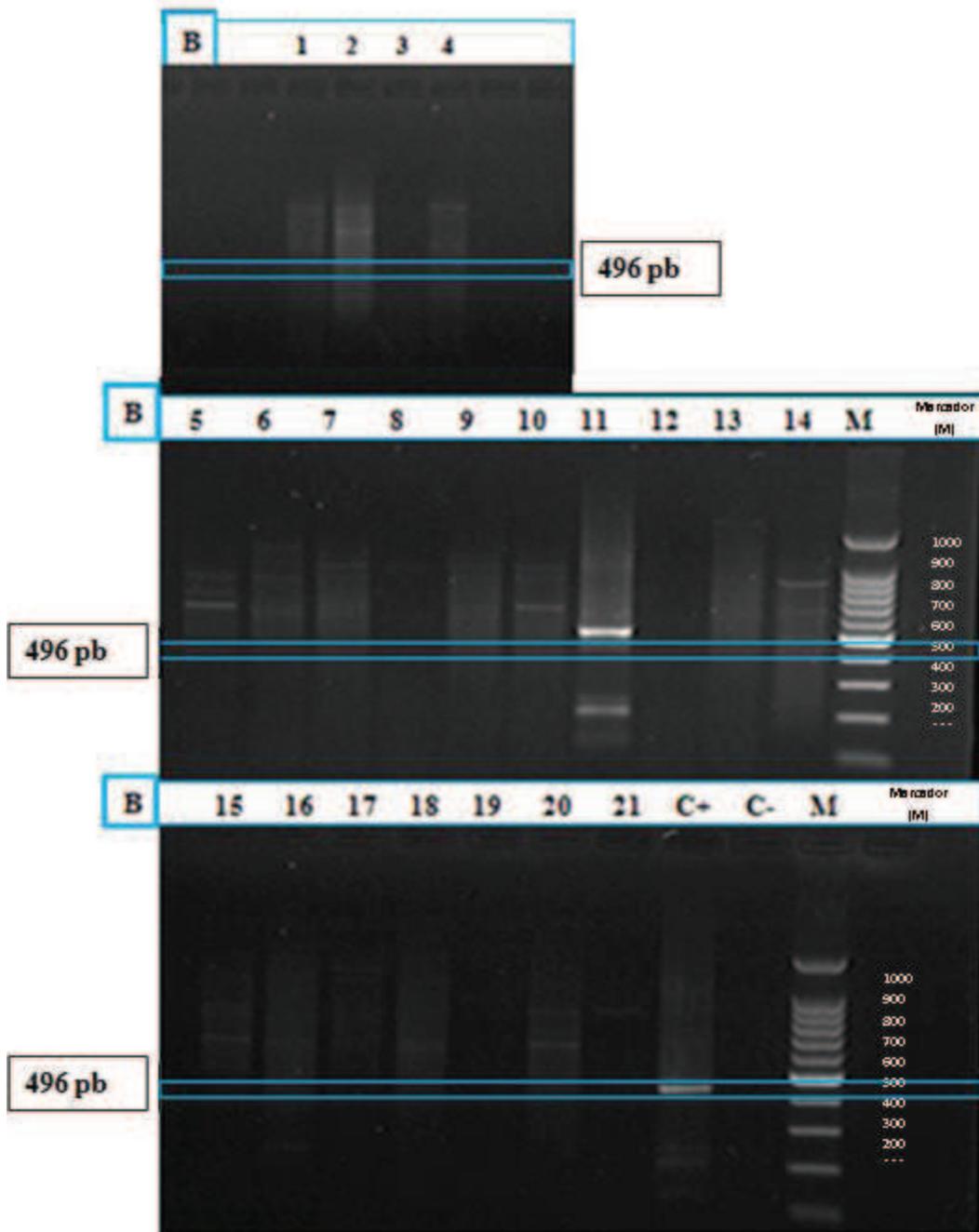


Figura 3.9: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y Buffer TBE al 1X, teñido con bromuro de etidio, Los pocillos del 1 al 21 son de ADNc amplificado y genotipado para GB fragmento de 496 pb, a partir de muestras de niños con asma en edad escolar. Marcador *Marker VIII* (Promega) de peso molecular de 100 a 1500 pb, controles positivos (C+) y controles negativos (C-), respectivamente.

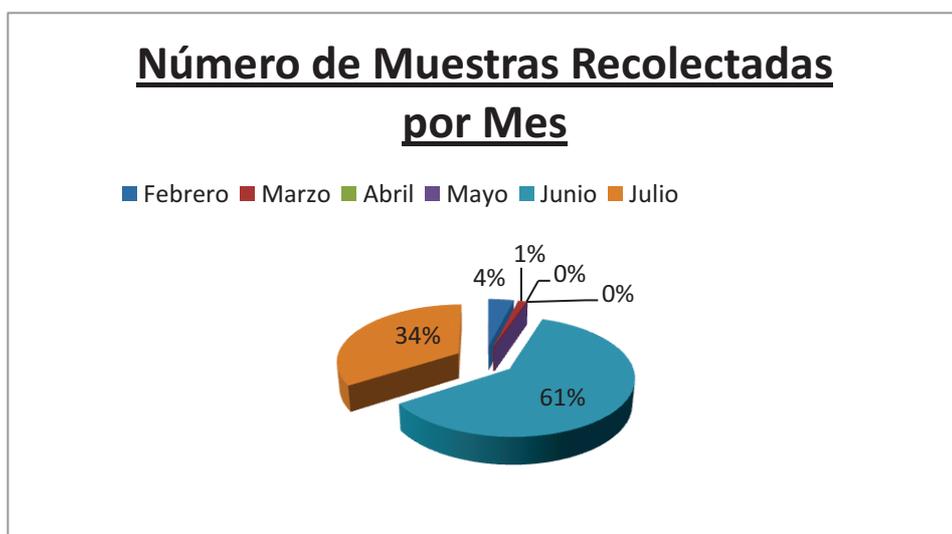
Como se observa en las figuras 3.8 y 3.9, existe ausencia de bandas de 480pb y 496pb, correspondientes a la tipificación del gen de la glicoproteína G tanto para el tipo A, como para el tipo B del VRSH, lo cual se analizó y comprobó en las 73 muestras de niños con asma, en edades comprendidas desde los 6 hasta los 12 años en sus episodios asmáticos, en el periodo de Febrero a Julio del 2011.

3.5 Análisis Estadístico Descriptivo

Los datos de los consentimientos informados (ANEXO A), procesados en una hoja electrónica desarrollada en Microsoft Excel (ANEXO C), dieron los siguientes resultados:

De las 76 muestras recolectadas, la mayor cantidad corresponde al mes de junio, como se puede observar en la siguiente figura:

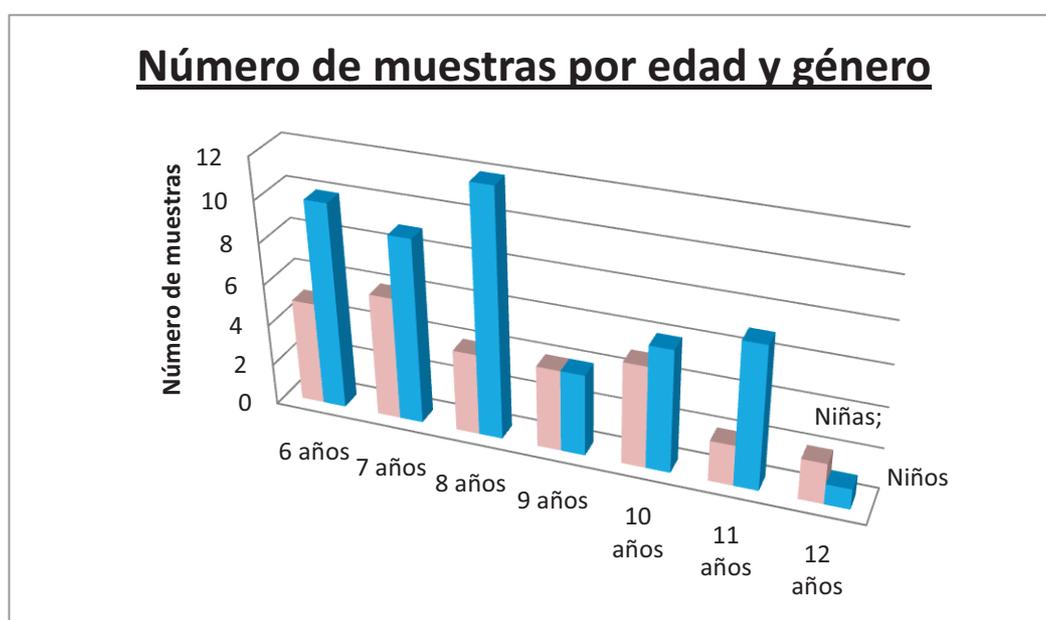
Figura 3.10: Porcentaje de muestras de niños asmáticos, recolectadas para Identificación y Genotipificación de VRSH; en el periodo febrero a julio del año 2011.



En cuanto al análisis por género se observa un total de 28 niñas y 48 niños, siendo los niños los mayormente afectados por afecciones respiratorias asociadas con asma.

El número de niñas con episodios asmáticos se encuentra con una mayor frecuencia a los 7 años de edad; mientras que en los niños se encuentra con mayor frecuencia a los 8 años de edad.

Figura 3.11: Cantidad de muestras nasofaríngeas recolectadas para Identificación y Genotipificación de VRSB ubicadas por género y edad.

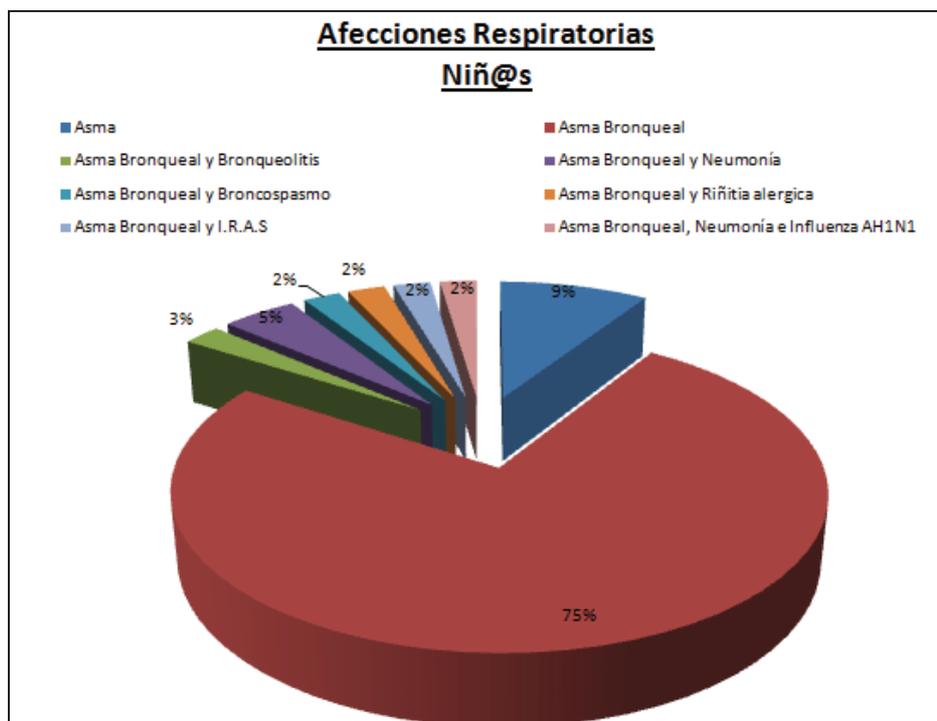


En la tabla 3.1 y la figura 3.12, se encontró que entre los niños analizados según su diagnóstico escrito en la historia clínica, solo el 58% alguna vez presentaron diversas afecciones respiratorias asociadas con asma a lo largo de su vida. Un total de 44 niños presentó alguna de estas afecciones respiratorias asociadas con asma desde los 0 años de edad. Y como se puede observar en la tabla 3.1, se tienen una constante aparición de Asma Bronquial en los niños estudiados.

Tabla 3.1: Afecciones respiratorias en niños asmáticos estudiados para la Identificación y Genotipificación de VRSH, a partir de su diagnóstico escrito en la historia clínica del Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador, en el periodo febrero a julio del año 2011.

| Tipo de Afección Respiratoria | Niños y Niñas |
|--|---------------|
| Asma | 4 |
| Asma Bronquial | 33 |
| Asma Bronquial y Bronqueolitis | 1 |
| Asma Bronquial y Neumonía | 2 |
| Asma Bronquial y Broncospasmo | 1 |
| Asma Bronquial y Rinitis alérgica | 1 |
| Asma Bronquial y I.R.A.S | 1 |
| Asma Bronquial, Neumonía e Influenza AH1N1 | 1 |

Figura 3.12: Porcentaje de niños asmáticos por afección respiratoria, para la Identificación y Genotipificación de VRSH, a partir de su diagnóstico escrito en la historia clínica del Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador, en el periodo febrero a julio del año 2011.

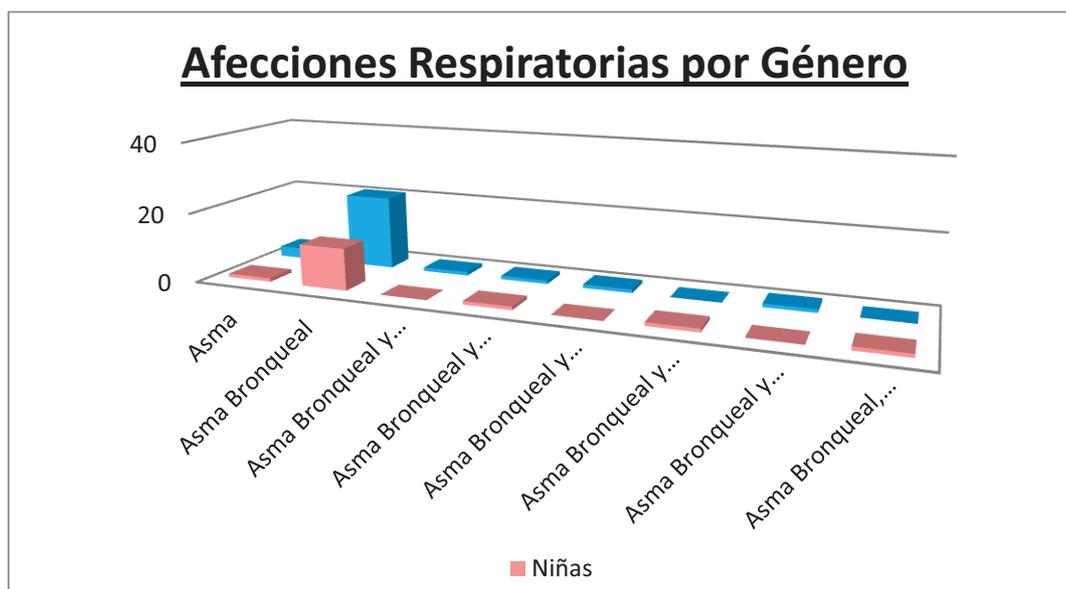


Se observa que el diagnóstico de asma bronquial exclusivo fue más frecuente que la asociación con I.R.A.S. e infecciones bajas, afectando mas a los niños de género masculino en nuestra comunidad, cabe recalcar que esto se presentó en la población estudiada y no es extrapolable a la comunidad.

Tabla 3. 2: Afecciones respiratorias por género de niños asmáticos estudiados para la Identificación y Genotipificación de VRSH, a partir de su diagnóstico escrito en la historia clínica del Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador, en el periodo febrero a julio del año 2011.

| Tipo de Afección Respiratoria | Niñas | Niños |
|--|-------|-------|
| Asma | 1 | 3 |
| Asma Bronquial | 12 | 21 |
| Asma Bronquial y Bronqueolitis | 0 | 1 |
| Asma Bronquial y Neumonía | 1 | 1 |
| Asma Bronquial y Broncospasmo | 0 | 1 |
| Asma Bronquial y Rinitis alérgica | 1 | 0 |
| Asma Bronquial y I.R.A.S | 0 | 1 |
| Asma Bronquial, Neumonía e Influenza AH1N1 | 1 | 0 |

Figura 3.13: Afecciones respiratorias relacionadas con asma de niños y niñas asmáticos, estudiados para la Identificación y Genotipificación de VRSH, a partir de su diagnóstico escrito en la historia clínica del Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador, en el periodo febrero a julio del año 2011.



CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Los resultados de la detección molecular empleando el protocolo tomado de Arbiza y colaboradores en el 2003, revelan que el Virus Sincitial Respiratorio, en este caso y para este estudio, no es el responsable del asma en los niños en edad escolar diagnosticados en el Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador en el periodo anual de febrero a julio del 2011.

Según Arbiza 2011, en la visualización de los geles correspondientes a muestras respiratorias; siempre se tienen varias bandas arriba y debajo de las que se esté buscando, esto se debe a que las muestras respiratorias siempre tienen muchos microorganismos entre virus y bacterias; por esto se debe hacer la debida secuenciación de la banda requerida en el estudio.

Al realizar la PCR en tiempo real para la detección de los controles positivos en las gráficas de amplificación de las figuras 3.3 y 3.4, se puede observar que en cuatro de los nueve controles positivos, la curva colorimétrica correspondiente al VRSH (rojo), se encuentra más allá de los 35.5 Ct; esto se debe a que los niños ya estaban culminando la etapa de infección viral, pero aún así son considerados como buenas referencias para controles positivos, por la sensibilidad de la técnica molecular de PCR.

La visualización del ARVv del VRSH, no puede hacerse después de la retrotranscripción, sino únicamente después de haber hecho la amplificación del fragmento G. Según Arbiza 2011, esto se debe al comportamiento viral, ya que por ser un ARN monocatenario negativo, es mucho más sensible a las ARNasas del ambiente, lo que puede provocar su degradación con mayor facilidad, motivo por el cual al momento de realizar la amplificación en la cámara de flujo laminar, se debe trabajar con las muestras de ARN viral mientras estas siguen descongelándose para evitar afectar su integridad.

Arbiza 2003, realizó el estudio de Variabilidad dominante de Virus Sincitial Respiratorio en los grupos A y B en Uruguay durante catorce años consecutivos; en el cual se realizó la amplificación del gen G para visualizar las bandas de 923 pb, pero en

varios de los casos los amplicones no se observaban en el gel, a pesar de ello se realizaba posteriormente una genotipificación con primers específicos y así lograron sesgar los falsos negativos. Por ello en este estudio, aún teniendo una ausencia de banda de 923pb como se observa en la figura 3.7, también se realizó la genotipificación para descartar falsos negativos y se lo puede observar en las figuras 3.8 y 3.9 correspondientes a la visualización de bandas de 480pb y 496pb para el grupo A y B respectivamente.

La estacionalidad es una de las características epidemiológicas que caracterizan a las infecciones respiratorias virales. En poblaciones asentadas en climas fríos, cabe destacar su mayor frecuencia en los niños y la presentación frecuente de ellas como infección inaparente. Estas enfermedades se presentan en las épocas frías del año, en forma de brotes epidémicos con duración e intensidad variable. A este respecto se ha observado que los distintos virus se alternan en forma sucesiva y en raras ocasiones coinciden agentes distintos en una epidemia (Stensballe *et al.*, 2003).

Las infecciones del tracto respiratorio inferior causadas por el VRSH, ocurren de forma epidémica y la aparición de éstas, varía con la altitud, latitud y clima del lugar. La estacionalidad, en la cual la epidemia de VRSH ocurre, depende de la localización geográfica y de la altitud. Durante las estaciones del año, las epidemias tienden a aparecer en cúmulos sin embargo los patrones de aparición de estas epidemias varían de un continente a otro y usualmente empiezan en las áreas costeras (Goldman, 2001).

En países cerca del Ecuador, con lluvias frecuentes como Colombia la situación no es clara. En estos sitios hay un patrón distinto de transmisión del VRSH, donde la mayoría de los casos aparecen en una mitad del año, pero no en la otra (Revista Mexicana de Pediatría, 2005).

El presente estudio fue realizado en los meses de febrero a julio del año 2011 como se puede observar en la figura 3.10, en el Hospital Baca Ortiz de Quito, y el periodo de aparición del VRSH es desde septiembre a abril; esa puede haber sido una

razón para que no se haya encontrado una presencia viral en las muestras de los niños con asma en edades desde los 6 años hasta los 12 años.

Puede decirse que el VRSH es un virus estacional, que infecta con mayor frecuencia en el invierno en los países de climas templados y en países tropicales durante los meses lluviosos del año. Como por ejemplo en el estudio de frecuencia y estacionalidad de los virus respiratorios identificados en los niños que ameritaron ser internados por tener un episodio de la infección respiratoria en México, se pudo observar un aumento considerable de casos a partir del mes de octubre en el que el Virus Sincitial Respiratorio (VSRH) fue el de mayor frecuencia. Se observó que el VRSH estuvo presente todo el año registrando un pico máximo en el mes de octubre. La vigilancia epidemiológica continua permite conocer la estabilidad de los brotes y permite relacionar la morbilidad y mortalidad de las infecciones asociadas a VRSH. Las medidas preventivas incluyen un riguroso control de la infección y la administración de inmunoglobulina policlonal y anticuerpos monoclonales contra el VRSH. Estas medidas por ser de un costo muy elevado se recomiendan solo en pacientes de alto riesgo (Revista Mexicana de Pediatría, 2005).

Todos los niños estudiados en esta investigación, padecían de asma, por esta razón se quería determinar si su enfermedad era causada por el Virus Sincitial Respiratorio Humano; debido a que las causas del asma son de diversa índole y uno de los exacerbantes descritos, es este virus (Sigurs *et al.*, 2000). Pero ya que la presencia de este virus no fue encontrada en los niños estudiados, la causa del asma puede deberse a otras razones. Como por ejemplo en los tiempos actuales conforme avanza la industrialización, se van cambiando los hábitos de vida, se van dando las migraciones a las grandes ciudades y se incrementan los factores de riesgo para padecer esta enfermedad.

Para el diagnóstico de asma se requiere investigar la historia laboral en los adultos y en los niños investigar exposición a agentes sensibilizantes e infecciones. Los síntomas pueden agravarse por el uso de fármacos usados para patologías asociadas como aspirina, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), antiinflamatorio de uso

tópico (oftalmológicos), el uso de medicación sistémica tipo betabloqueantes (Munayco *et al.*, 2009).

Así como lo menciona Munayco y colaboradores en el 2009; en esta investigación se observa que en los niños estudiados, muchos de ellos tienden a presentar un periodo de aparición de episodios asmáticos en el mes de junio, lo cual puede ser debido a agentes sensibilizantes y al mismo tiempo es una época del año en el que algunos de los niños en estudiados salían de vacaciones, modificando así sus hábitos o rutina normal, lo cual también incrementa la aparición de episodios asmáticos.

Numerosos estudios han descrito la asociación entre la infección por Virus Respiratorio Sincitial Humano (VRSH), en la infancia y el desarrollo posterior de hiperreactividad bronquial (HRB). Además de la respuesta inmunitaria exagerada y las alteraciones de los mecanismos neuronales, estudios recientes han relacionado la posible “presencia” del VRSH en el tracto respiratorio inferior con la patogenia de la HRB, por ello se presume que pueda existir una persistencia de este virus en el niño. Varios investigadores han analizado si el tratamiento de la bronquiolitis con fármacos antivirales o inmunosupresores podría disminuir las secuelas pulmonares, ocasionadas por el VRSH, pero aun así muchos niños siguen acudiendo a su doctor en su adolescencia (Mejías, 2004).

En niños mayores y adultos jóvenes, las infecciones respiratorias continúan siendo causa de sibilancias, pero el virus causal es diferente. Duff AL y colaboradores, de la Universidad de Virginia, estudiaron niños que llegaron al servicio de urgencias con episodios agudos de sibilancias. En los niños, casi en el 70% de los que presentaron sibilancias se encontró crecimiento del virus en el cultivo de las secreciones de las vías aéreas. El VRSH fue la infección principal asociada a sibilancias en estos pacientes. Sin embargo, en los mayores de dicha edad, los factores de riesgo asociados a sibilancias fueron alergias y la presencia de virus. Estos estudios demuestran una evidente relación entre la edad y el virus infectante (Rodríguez *et al.*, 2000). Lo cual nos indica otra razón por la que no se encontró la presencia del VRSH en este estudio en niños de 6 a 12 años de edad.

Kraner y col, realizaron un estudio transversal en el que se evaluaron 2 411 niños en edades comprendidas entre los 5 hasta los 14 años, de los cuales se observó que en 664 niños la prevalencia de alergia iniciaba cuando los niños empezaban a asistir a la guardería; mientras aumentaba la edad, disminuía la vulnerabilidad de contagio.

En esta investigación se obtuvo que los niños estudiados tienden a presentar episodios asmáticos con mayor frecuencia desde los 6 años hasta los 8 años de edad, sin embargo Sigurs y colaboradores en el año 2000, analizando el padecimiento de asma y la sensibilización alérgica a los 7 años de edad, observaron que los niños que habían padecido infección por VRSH tenían un mayor riesgo de padecer asma o sensibilización alérgica que los niños sin infección por VRSH, independiente mente del antecedente de historia familiar de asma, siendo el riesgo aún mayor cuando existían dichos antecedentes, especulando que podría haber un efecto sobre el sistema inmunitario inmaduro.

Singleton y colaboradores en el año 2003, también hallaron que los niños que habían padecido la infección por VRSH presentaron un mayor número de episodios de bronquitis crónica y sibilancias hasta los 4 años de edad, respecto a los controles, permaneciendo con un riesgo mayor de tos productiva crónica desde los 5 años hasta los 8 años de edad, por lo que la prevención de la infección por el VRSH, podría prevenir de la aparición de posteriores exacerbaciones en cuanto a la aparición de episodios asmáticos.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- Se recolectaron un total de 76 muestras de niños con asma, en edades comprendidas desde los 6 hasta los 12 años en sus episodios asmáticos, en el periodo de Febrero a Julio del 2011 en el Hospital de niños Baca Ortiz de Quito-Ecuador.
- De 76 muestras analizadas, 37% fueron pertenecientes al género femenino y 63% al género masculino.
- El 43,4% de los niños analizados sufren de asma bronquial.
- Los niños del género masculino son los que más sufren de asma o de alguna asociación a esta enfermedad, en este estudio.
- Dentro de la población estudiada la mayor cantidad de niños con asma se presentan desde los 6 años de edad hasta los 8 años de edad.
- Las afecciones respiratorias aparecen desde los 0 años de edad y van disminuyendo conforme avanzan los años.
- La mayoría de las muestras analizadas con SimplexTM Flu A/B & VRS de Frizonex para PCR en Tiempo Real, presentaron valores de Ct menores de 53 en todas las dianas.
- Los resultados empleando el protocolo tomado de Arbiza y colaboradores en el 2003, revela que el Virus Sincitial Respiratorio, en este caso y para este estudio, no es el responsable del asma en los niños en edad escolar en el periodo anual de febrero a julio del 2011.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- En este estudio se realizó la recolección de muestras por hisopado nasofaríngeo, se recomienda utilizar el método de aspirado nasofaríngeo, para tener una mayor cantidad celular.
- El mejor momento para hacer la toma de muestras nasofaríngeas, es cuando los niños están pasando por sus episodios ó algún tipo de gripe o alergia. Ya que el virus tiene diferentes temporadas de aparición y por lo general son épocas frías.
- En este estudio la extracción de ARNv se realizó mediante el método del Trizol ® y se recomienda para mejores resultados, un kit comercial de extracción.
- En esta investigación la genotipificación se realizó mediante el método de *primers* específicos, para evitar errores visuales del operador propone realizar la tipificación mediante secuenciación.
- Extender el periodo de investigación y enfatizar en los meses que son de mayor prevalencia de este virus.
- Se puede realizar esta investigación en pacientes de otras edades como en adultos mayores ó en niños desde los cero años de edad hasta los 12 años aproximadamente.
- Los niños o pacientes que sean estudiados, deben tener en su historial clínico el diagnóstico de las enfermedades relacionadas con el VRSH; esto se toma en cuenta debido a que al tener alguna vez en su vida en VRSH, los pacientes tienden a ser más propensos a desarrollar sensibilizaciones respiratorias.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Ahmadian, G., Randhawa, J. S. And Easton, A. J. (2000). Expresión of the ORF-2 protein of the human respiratory syncytial virus M2 gene is initiated by a ribosomal termination-dependent reinitiation mechanism. *Embo J* 19, 2681-9.

Anderson, L., Hierholzer, J. C., Tsou, C., Hendry, R. M., Fernie, B., F., Stone, Y., McIntsh, K. (1985). Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 151, 626-633.

Arbiza, J.; , Delfraro A, Frabasile S, Ruchansky D, Vitureria N; De Sierra MJ, Berois M, Blanca A; Facal L, Negro C, Colina R, Hortal M y Russi JC.(2033) Variable dominance of respiratory syncytial virus groups A and B in Uruguay during fourteen consecutive years (1988-2001). *Virus Reviews and Research*, v. 08 , p. 35-41.

Becerril Morales Illán (2003), Electroforesis, http://depa.pquim.unam.mx/amyd/archivero/Exposicion_electroforesis_5087.pdf

Callejón Callejón A., C. Oliva Hernández, G. Callejón Callejón, C. Marrero Pérez, E. Rodríguez Carrasco (2004). Infección Respiratoria por Virus Respiratorio Sincitial. Bronquiolitis. Unidad de Neumología Pediátrica, Departamento de Pediatría y Farmacia, Hospital Universitario Ntra. Sra. De Candelaria. Tenerife. 28-nº2 y 3.

Carlsen KH, Orstavik Y (1994). Bronchopulmonar and obstruction in children with respiratory virus infection. *Eur J Respiratory Diseases*. 65:92-8.

Cane, P. A., Matthewr, D. A., Pringle, C. R. (1994). Análisis of respiratory synsytial virus strain variation in successive epidemics in one city. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1-4.

Cane, P. A. (2001). Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 11, 103-16.

Chanock, R. M., Riozman, B., Myers, R. (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpazee coryza agent (CCA). I. Isolation properties and characterization. *Am. J. Hyg.* 66, 281-290.

Cristina, J., Moya, A., Rabiza, J. Russi, J., Hortal, M., Albo, C., Garcia-Barreno, B., Garcia, O., Melero, J. A. And Portela, A. (1991). Evolution of the G and P genes of human respiratory syncytial virus (subgroup A) studied by the RNAase A mismatch cleavage method. *Virology* 184, 210-8.

Collins, P. L., Chanock, R. M. And Murphy, B. R. (2001). Section 2 Chapter 45: Respiratory Syncytial Virus. In: B. N. Fields, D. M. Kinipe and P. M. Howley. (Eds), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Pa.

Frabasile S, Delfaro A, Facal L, Videla C,; Galiano M, De Sierra MJ, Ruchansky D, Vitureira N,; Berois M, Carballal G, Russi J; *Arbiza, J. (2003)*.

Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (Group A) isolated in Uruguay and Argentina:1993-2001. *Journal of Medical Virology*, v. 71 , p. 305-312.

Delfilippis, V. R. and Villarreal, L. P. (2001) Section 1 Chapter 13: Virus Evolution. In: B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley. (Eds), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Pa.

Duff AL, Pomeranz ES, Geber LE (1993). Risk factor for acute wheezing in infants and children: virus, passive smoke, and IgE antibodies to inhalant allergens. *Pediatrics*; 92: 535-40.

Falsey, A. R., Cunningham, C. K., Barker, W. H., Kouides, R. W., Yuen, J. B., Menegus, M., Weiner, L. B., Bonville, C. A., Betts, R. F. (1995). Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. *J. Infect. Dis.* 172, 389-94.

Garcia, J., Garcia-Barreno, B., Vivo, A. And Melero, J. A. (1993). Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* 195, 243-7.

Garcia, O., Martín, M., Dopazo, J., Rabiza, J., Frabasile, S., Russi, J., Hortal, M., Perez-Brena, P., Martinez, I., Garcia-Barreno, B and et al. (1994). Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A):

cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol* 68, 5448-59.

García-Barreno, B., Palomo, C., Peñas, C., Delgado, T., Pérez-Breña, P., Melero, J. A. (1989). Marker differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J. Virol.* 63, 925-932.

García-Barreno, B., Delgado, T. And Melero, J. A. (1996). Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *J Virol* 70, 801-8.

Goldman D. Epidemiology and Prevention of Pediatric Viral Respiratory Infections in Health-Care Institutions. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(2), 2001.

González A. Carlos (2009), Reacción en Cadena de la Polimerasa, <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/Dibulgeneral/PCR/PCR.htm>

Hall, C. B., Walsh, E. E., Long, C. E. And Schnabel, K. C. (1991) Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 163, 693-8.

Jonson, P. R., Springgs, M. K., Olmsted, R. A., Collins, P. L. (1987). The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B:

extensive séquence divergence between antigenically related proteins. PNAS 84, 5625-5629.

Kapikian, A. Z., Mitchell, R. H., Chanock, R. A., Stewart, C. E. (1969). An epidemiologia study of altered clinical reativity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. Am. J. Epidemiol. 89, 405-421.

Kim, H. W., Canchola, J. G., Brandt, C. D., Pyles, G., Chanock, R. M., Jensen, K., Parrott, R. H. (1969). Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. Am. J. Epidemiol. 89, 422-434.

Lemanske RF (2003). Does respiratory syncytial viral-induced bronchiolitis result from helper T cell type 1/ type 2 cytokine imbalance. Am J Respir Crit Care Med.; 168: 625-627.

Lopez, J. A., Bustos, R., Orvell, C., Berois, M., Rabiza, J., Garcia-Barreno, B and Melero, J. A. (1998). Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glucoprotein. J Virol 72, 6922-8.

Martínez E. Doménech (2004). Virus Sincitial Respiratorio (VSR) y Asma. Universidad de la Laguna (Tenerife), Hospital Universitario de Canarias (Telerife), BSCP Can Ped; 28 – nº1.

Mejías, A., Chávez, S., A. M.^a Ríos, M. Fonseca-Aten, A.M.^a Gómez, HS. Jafri y O. Ramilo (2004); ASMA Y VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL. NUEVAS OPORTUNIDADES DE INTERVENCIÓN TERAPÉUTICA; División of Infectious Diseases. Depastament of Pediatrics and Departament of Pathology. The University of Texas Southwestern Medical Center and Children`s Medical Center. Dallas. Texas. Estados Unidos; Junio.

Melero, J. A., Garcia-Barreno, B., Martinez, I., Pringle, C. R. and Cane. P. A. (1997) Antigenic structure, evolution and immunology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol* 78 (Pf 10), 2411-8.

Minor TE, Dick EC, Demo AN, Oullentte JJ, Cohen M, Read CE (1993). Viruses as precipitants of asthma attacks in children. *JAMA*; 227:292-8.

Morris, J. A. Jr., Blount, R. E., Savage, R. E. (1956). Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees. *Pros. Soc. Exp. Biol. Med.* 92, 544-550.

Mufson, M. A. Orvell, C., Rafnar, B., Norrby, E. (1985). Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 66, 2111-2124.

Munayco C. V., Arana J., Torres-Chang J., Saravia L., Soto-Cabezas M. G. (2009); Prevalencia y Factores Asociados al Asma en niños de 5 a 14 años de un Área rural de Sur del Perú; República del Perú Ministerio de Salud Pública; Artículo 26(3): 307-13.

Norrby, E., Mufson, M A., Sheshberadanran, H. (1986). Structural differences between Subtype A and B strains of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 67, 2721-2729.

Odalys Valdés Ramírez Lic, MSc. (2004). Caracterización Antigénica y Molecular del Virus Sincitial Respiratorio Humano. Instituto Tropical “Pedro Kourí” Subdirección de Microbiología, Departamento de Virología. Habana Cuba.

Perez, M., Garcia-Barreno, B., Melero, J. A., Carrasco, L. and Guinea, R. (1997). Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of Human Respiratory Syncytial Virus. *Virology* 235, 342-51.

Picazo Juan J., González Romo Fernando (2010), 10 FUTURAS VACUNAS, 10.5.6 Vacunas Frente al VRS; 10 (5): 749-753

PGR y Comell University (2003), Tecnologías de Marcadores Moleculares para estudios de Diversidad Genética de Plantas: Módulo de Aprendizaje, Tecnologías basadas en el ADN Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción;

http://www2.bioversityinternational.org/Publications/Molecular_Markers_Volume_1_es/PDF/III_2.pdf

Ramírez Valdés Odalys (2004). Caracterización Genética y Molecular del Virus Sincitial Respiratorio Humano, Cuba 1994-2000; Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” Subdirección de Microbiología, Departamento de Virología, Habana-Cuba.

Revista Mexicana de Pediatría, Art. Variación estacional de infecciones respiratorias virales en niños hospitalizados; Sociedad Mexicana de Pediatría, AC; Volumen 72; Número 1; Enero-Febrero 2005

Reyes Gonzáles Luis. (2001). Estructura, Procesamiento Proteolítico y Activación de la Proteína F de Virus Respiratorio Sincitial Humano. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de CC. Químicas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Mayo, Madrid.

Rivas M, Lafeté J, Alberti E, Rosario D, Gonzáles G (1992). Algunas aplicaciones del sistema ultramicroanalítico al diagnóstico de enfermedades infecciosas. Rev Cubana Med Trop; 44(3): 226-7.

Rodríguez Vásquez Juan Carlos, Pedro Pablo Pino Alfonso, Carlos Gassiot Nuño, Isidoro Páez Prats, Alici Cid Guedes y Roxana Reyes León (2000); Asma Infecciones, Acta Médica; 9(1-2):29-33.

Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjelman B (2000). Respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. Am J Respir Crit Care Med; 161: 1501-1507.

Singleton RJ, Redding GJ, Lewis TC, Martínez P, Buljow L et al (2003).
Sequelae of severe respiratory syncytial virus infection in infancy and early
childhood among Alaska native children. *Pediatrics*; 112: 285-290.

SOCIEDAD ECUATORIANA DE TISIOLOGÍA Y ENFERMEDADES DEL
TORAX (SETET), Consenso Ecuatoriano de Asma Bronquial; Consenso
Ecuatoriano para el Manejo del Asma Bronquial, 2010;
http://www.medicosecuador.com/setet/taller_asma.htm

Spence, L., Barratt, N. (1986). Respiratory syncytial virus associated with acute
respiratory infections in Trinidadian patients. *Am. J. Epidemiol.* 88, 257-266.

Stec, D. S., Hill, M. G. D., Collins, P. L. (1991). Séquense análisis of the
polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted
phylogeny of nonsegmented negative.strand viruses. *Virology* 183, 273-287.

Stein RT, Sherill D, Morgan J, Holberg CJ et al (1999). Respiratory syncytial
virus in early life risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet*; 354: 541-
545.

Stensballe LG, Devasundaram JK. Respiratory syncytial virus epidemics: the
ups and downs of a seasonal virus. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22(Suppl. 2): S21-
S22.

Sullender, W. M., Mufson, M. A., Anderson, L. J. and Wertz, G. W. (1991) Genetic Diversity of the attachment protein of subgroup B Respiratory Syncytial Virus. *J Virol* 65, 5425-34.

Sullender, W. M., Mufson, M. A., Prince, G. A., Anderson, L. J. And Wertz, G. W. (1998) Antigenic and genetic diversity among the attachment proteins group A respiratory syncytial viruses that have caused repeat infections in children. *J Infect Dis* 178, 925-32.

Teng, M. N., Collins, P. L. (1999). Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial virus which do not produce NS2 protein. *J. Virol.* 73, 466-473.

Vikerfors, T., Grandien, M., Olcen, P. (1987). Respiratory syncytial virus infections in adults. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, 561-564.

Walsh, E. E. And Hruska, J. F. (1983). Identification of the virus-specific proteins of respiratory syncytial virus temperature-sensitive mutants by immunoprecipitation. *Proc Soc Exp Biol. Med* 172, 202-6.

Wathen, M. W., Aeed, P. A. And Elhammer, A. P. (1991). Characterization of oligosaccharide structures on a chimeric respiratory syncytial virus protein expressed in insect cell line Sft9. *Biochemistry* 30, 2863-8.

Zlateva, K. T., Lemey, P., Vandamme, A. M. and Van Ranst, M. (2004)
Molecular Evolution and Circulation Patterns of Human Respiratory Syncytial
Virus Subgroup A: Positively Selected Sites in the attachment G Glycoprotein. *J*
Virology 78, 4675-83.