



***IDENTIFICACION MOLECULAR DE  
METAPNEUMOVIRUS HUMANO (hMPV)***

***TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE  
MAGISTER EN MICROBIOLOGÍA MOLECULAR***

***Universidad Nacional de San Martín  
A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbran”***

*Maestrando: Bioq. Marcela Andrea López*

*Director: Prof. Dr. Fabián E. Zalazar*

***- 2008 -***

## **Agradecimientos**

A mi Director de Tesis **Dr. Fabián E. Zalazar** por haber confiado en mi como su alumna, por su dedicación, por la lectura y corrección de esta Tesis, por su paciencia y participación desinteresada.

A mi co-director virtual , mi esposo, **Bioq. Fabián A. Tedeschi** por el apoyo moral, anímico, y espiritual brindado, mas allá de la relación que nos une.

Agradezco especialmente a la **Dra. Susana Imaz**, por haber sugerido el tema , por la orientación y por el apoyo incondicional brindado

A todo el personal del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias " Dr.Emilio Coni", en especial a su Directora **Msc. Elsa Zerbini** por haberme permitido realizar esta carrera, en el marco de las actividades que ahí se desarrollan.

A la **Dra. Cristina Videla** por facilitarme una muestra de células infectadas con el Metapneumovirus , de vital importancia para mi trabajo experimental y a la **Dra. Raquel Cociglio** por brindarme datos relevantes y las historias clínicas de los niños atendidos en el Hospital de Niños de Santa Fe "Dr. Orlando Alassia"

A mis hijos, Sofía y Lucio por.....  
.....

Y a todos aquellos que de una u otra manera aportaron algo para que este trabajo sea realizado

Y por sobretodo Gracias a **Dios**, por haberme guiado en este camino...

Gracias!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

*A mis AMORES:*

*Fabián, Sofía y Lucio*

*El mundo exige resultados.*

*No le cuentes a otros tus dolores del parto.*

*Muéstrales al niño.*

*Indira Gandhi (1917-1984)*

Resumen	8
Abreviaturas	9
<b>Introducción</b>	
1- Generalidades	12
2- Clasificación Taxonómica	13
3- Estructura del Metapneumovirus humano	13
4- Epidemiología	15
5- Respuesta Inmune	17
6- Manifestaciones Clínicas	18
7- Prevención y Tratamiento	21
8- Diagnóstico de Laboratorio	22
8.1- Selección de la muestra a procesar	22
8.2- Aislamiento en cultivo celular	23
8.3- Análisis Molecular	25
8.3.1- Técnicas Inmunoquímicas para detección de antígenos virales	25
8.3.2- Tecnologías de Análisis de Acidos Nucleicos (NATs) para la detección de virus respiratorios	27
<b>Objetivos</b>	
1- Objetivo General	29
2- Objetivo Particular	29
<b>Materiales y Métodos</b>	
1- Selección y Preparación de Muestras Clínicas	31
2- Detección de Virus Respiratorios	31
3- Cultivos Celulares	31
4- Purificación de Acido Ribonucleico Total	32
5- Ensayos de Transcripción Reversa	32
6- Amplificación <i>in Vitro</i> de ADN por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	33
7- Optimización de la PCR	33
8- Controles de Amplificación	34
9- Precauciones para evitar la contaminación en las reacciones de PCR	34
10- Clonado de secuencias de los genes N y F del hMPV	35
10.1- Cepas de <i>Escherichia coli</i>	35
10.2- Vector Plasmídico	35
10.3- Reacciones de Ligado	36
10.4- Transformación de bacterias	36

---

11- Extracción de ADN Plasmídico (Miniprep por lisis alcalina)	37
12- Confirmación de la identidad del inserto	37
13- Análisis con Enzimas de Restricción (PCR-RFLP)	37
14- Electroforesis en gel de agarosa	38
15- Análisis <i>In Silico</i>	38
<b>Resultados y Discusión</b>	
1- Optimización del ensayo de amplificación in vitro del genoma de hMPV	40
2- Aplicación de ensayo de RT-PCR en muestras clínicas	43
3- Aplicación de un ensayo de Multiplex-PCR en muestras clínicas	45
4- Detección de Metapneumovirus humano (hMPV) asociado a un caso de exacerbación de asma aguda bronquial severa	46
<b>Conclusiones</b>	49
<b>Bibliografía</b>	51
<b>Apéndice</b>	57
<b>Anexos</b>	
Anexo 1	
1.1- Genoma del hMPV y zona de apareo de Primers usados	61
1.2- Análisis mediante el uso de Programas Bioinformáticos (Análisis <i>in silico</i> )	63
Anexo 2	
2.1- Publicaciones	64
2.2- Asistencia Congresos con Presentación de Trabajos	64

**RESUMEN**

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son una causa importante de morbimortalidad en niños en todo el mundo. La mayoría de estas IRA son causadas por los virus respiratorios clásicamente conocidos, como los virus Sincicial Respiratorio, Influenza A y B, Parainfluenza 1, 2 y 3 y Adenovirus. Sin embargo, existe un porcentaje no despreciable de IRA, de probable etiología viral, en el que no se identifica el agente causal, y que representa entre 40 y 60% de las neumonías adquiridas en la comunidad.

En el año 2001 se describió en Holanda un nuevo agente causal de IRA, el hMPV. Los primeros reportes de la presencia de hMPV en nuestro país se han documentado en Buenos Aires el año 2004.

En el presente estudio se decidió evaluar la frecuencia de infección por hMPV en niños ( 3 meses - 5 años de edad) diagnosticados con IRA, atendidos en el Hospital de Niños de Santa Fe "Dr. Orlando Alassia" en el periodo 2005-2006, con resultados negativos para el grupo de virus respiratorios investigados de rutina. Para ello se evaluaron estrategias de análisis utilizando técnicas de biología molecular. Con estas se analizaron 118 muestras de aspirados nasofaríngeos por Trascricpción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) para la amplificación de secuencias específicas de los genes N y F del virus, confirmando por PCR-RFLP los resultados positivos y se aplicó una reacción de multiplex PCR para acortar tiempos en la búsqueda del agente viral.

Por otro lado describimos un caso de exacerbación de asma bronquial asociada a la infección por hMPV, detectado recientemente en nuestro laboratorio

En la población estudiada se pudo detectar la presencia del hMPV en el 4,2% de los pacientes. Este hallazgo concuerda con la literatura, donde se describe entre 4 y 17% de infección por hMPV en poblaciones similares. Estos resultados reafirmarían la importancia de la investigación del hMPV como agente causal de IRA, sobre todo en los casos en los que no se logra identificar ninguno de los virus respiratorios tradicionalmente estudiados.

**ABREVIATURAS**

A: adenina

ADN: ácido desoxi-ribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ATP: Adenosin trifosfato

BrEt: bromuro de etidio

C: citosina

CTP: citosin trifosfato

D.O.: densidad óptica

ADNsa: endonucleasa con capacidad para digerir ADN

dNTPs: mezcla de los cuatro nucleótidos, ATP, TTP, CTP y GTP

GTP: guanosin trifosfato

ECP: efecto citopático

H<sub>2</sub>O bd: agua bidestilada

IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido

IRA: infección respiratoria aguda

Kpb: kilo pares de bases

LB: medio Luria-Bertani

L.C.: línea celular

MEM: medio esencial mínimo

MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio

MgSO<sub>4</sub>: sulfato de magnesio

μM: micromolar

NaAc: acetato de sodio

NaCl: cloruro de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

p/v: peso en volumen

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RFLP: polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

r.p.m: revoluciones por minuto

ARNsa: endonucleasa con capacidad de digerir ARN

SDS: dodecilsulfato de sodio

S.V.: *shell-vial*

T: timina

TAE: buffer tris-ácido acético-EDTA

TE: buffer tris-EDTA

TTP : timina trifosfato

U: uracilo

UV: luz ultravioleta

v/v: volumen en volumen

V: voltios

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

$\lambda$ :longitud de onda



**Introducción**

## **1- Generalidades**

El metapneumovirus humano (hMPV) se ha descrito en Holanda en el 2001 y se lo relacionó como un nuevo agente causal de infección respiratoria aguda (IRA), tras su hallazgo en niños, jóvenes, adultos y ancianos.

Este virus se asocia a cuadros de bronquiolitis, obstrucción y neumonía, entre otras manifestaciones, y su espectro clínico aún no se encuentra totalmente definido.

Posee un período de incubación que se supone entre cinco y seis días y una excreción viral que duraría entre una y cuatro semanas por lo que puede ser diseminado en el ambiente nosocomial, y debe ser considerado para evitar contagios y propagación en salas de pediatría (Van den Hoogen y cols., 2001).

Análisis serológicos retrospectivos revelaron que niños menores de 5 años de edad han sido infectados por este virus y que el mismo ha estado circulando por más de 43 años en algunas poblaciones (Van den Hoogen y cols., 2001; Van den Hoogen y cols., 2004).

Se ha visto fuertemente asociado a exacerbaciones asmáticas agudas, lo que supone que sería uno de los responsables agentes virales que gatillarían los episodios de broncoespasmo tanto en niños como en adultos.

Desde su primera comunicación en el 2001 se ha reportado además en otros países como Australia, Canadá, Estados Unidos, Francia, Reino Unido, España, Japón y Latinoamérica lo que habla de una distribución mundial de este microorganismo. (Peret y cols., 2002; Mackay y cols., 2003; Peiris y cols., 2003; García García y cols., 2004; Williams y cols., 2005; Luchsinger y cols., 2005; Mirazo y cols., 2005; Noyola y cols., 2005)

En nuestro país, se reportaron las primeras evidencias de la presencia de hMPV en Buenos Aires, en niños con infecciones respiratorias agudas bajas (Galiano y cols., 2004).

En este contexto, parece fundamental, como ya reconocen algunos autores, incorporar la detección del metapneumovirus humano en el abordaje diagnóstico de los lactantes y niños con infección respiratoria (Van den Hoogen y cols., 2001; Williams y cols., 2004). Si bien en la actualidad no se dispone de una herramienta terapéutica específica, sí parece al menos evidente la utilidad de identificar el agente etiológico de esta patología, para evitar tratamientos antibióticos innecesarios en el caso de aparición de bronquiolitis con infiltrados radiológicos y para conocer a largo plazo la evolución de estos niños (Ulloa-Gutierrez y cols., 2003).

## **2 -Clasificación Taxonómica**

Basándose en estudios moleculares y de microscopia electrónica, este virus se ha clasificado como perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*, sub-familia *Pneumovirinae*, género *Metapneumovirus*.

Recientemente se han identificado, por análisis filogenéticos, dos serotipos: A y B, los cuales a su vez se subdividen en dos subtipos cada uno (A1–A2 y B1-B2, respectivamente) (Fig. 1)

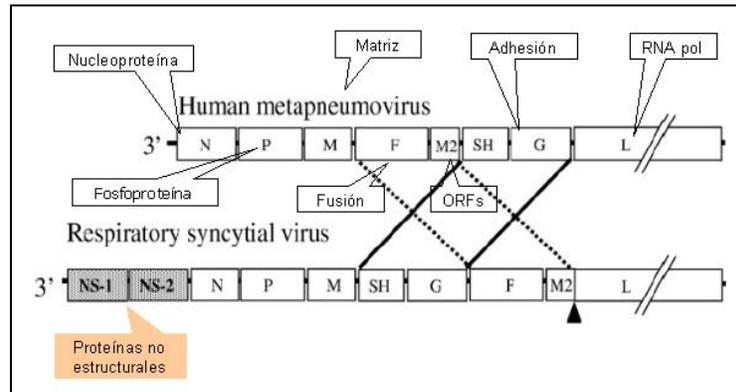
El mismo posee características propias muy similares al Virus Respiratorio Sincicial humano (VSR), como su epidemiología, su distribución estacional y sus manifestaciones clínicas, entre otras (Van den Hoogen y cols, 2002; Van den Hoogen y cols., 2003 ; McIntosh y cols., 2004; Schildgen y cols., 2004; Williams y cols., 2004).



**Figura 1.** Clasificación taxonómica del Metapneumovirus humano (Modificado de Khan, 2006)

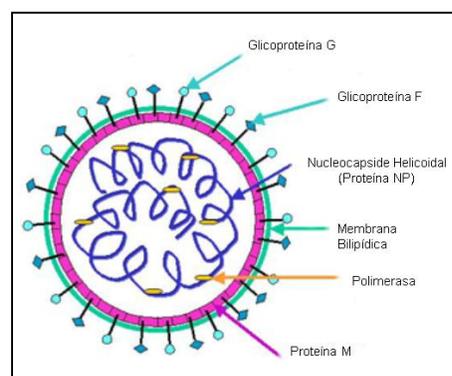
## **3 -Estructura del Metapneumovirus humano**

Como todos los virus de la familia *Paramyxoviridae*, tiene características pleomórficas. Es de mayor tamaño que los ortomixovirus, y posee una envoltura en doble capa muy frágil cubierta de proyecciones. Este virus posee un ARN de simple cadena negativa no segmentada, cuya organización es diferente a la del VSR (Fig. 2) y carece de los genes que codifican para las proteínas no estructurales, NS1 y NS2 .



**Figura 2:** Mapa Genómico de los *Pneumovirinae*. Gráfico comparativo entre el VSR y el hMPV (Modificado de Khan, 2006)

El genoma asociado a las proteínas N (nucleoproteína), P (fosfoproteína) y L (large), conforman la nucleocápside helicoidal que está envuelta por un manto, constituido por una bicapa de lípidos derivada de la membrana plasmática de la célula huésped, en la cual se encuentran insertas tres glicoproteínas (gp): la Proteína G de adhesión, la Proteína F de fusión, que participa en la formación de sincicios en los cultivos celulares, y una pequeña con características hidrofóbas denominada Proteína SH. Tanto la proteína G como la F constituyen las espículas que se encuentran en la superficie del virión. En la cara interna de la membrana estas glicoproteínas interactúan con la Proteína M de la matriz. La Proteína L es considerada la ARN polimerasa viral y para su funcionamiento requiere de la presencia de las proteínas N y P (Fig.3).



**Figura 3:** Estructura del Virion (tomado de <http://www.academicos.cualtos.udg.mx>)

En nuestro país se estudió la variabilidad genética de los genes G y F y se halló que los virus circulantes pertenecen a los dos linajes genéticos principales A y B, dentro de los cuales se agruparon en dos sublinajes A1 y A2 para A. Para B sólo se

agruparon en un solo sublinaje B1 en concordancia con un trabajo publicado en Europa. Por otro lado se halló que la proteína F es la más altamente conservada, mientras que la G mostró extensa variabilidad entre los grupos A y B. (Van den Hoogen y cols., 2001; Van den Hoogen y cols., 2002; Biacchesi y cols., 2003; Galiano y cols., 2006; Huck y cols., 2006)

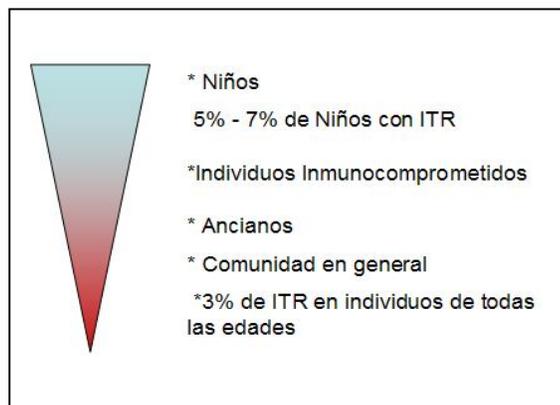
#### **4 -Epidemiología**

La infección por hMPV tiene un período de incubación de 5-6 días, su mecanismo de propagación es el común a todos los virus respiratorios y se realiza por aerosoles producidos con la tos y el estornudo. También, y no menos importante desde el punto de vista epidemiológico, se puede transmitir a través de las manos o utensilios de uso común contaminados lo que permite que el virus acceda a través de las vías aéreas, boca o conjuntivas. La eliminación del virus se extiende entre dos a cuatro semanas en niños y un período menor en adultos (Abara y cols., 2006).

En algunas ocasiones se han reportado casos aislados de reinfección por hMPV como también se ha descrito coinfección con otros patógenos. Además se ha observado que se puede presentar en brotes que parecen coincidir con el VSR. Se han publicado coinfecciones no sólo con VSR sino también con Adenovirus aunque se estima que esto no produce un aumento de la severidad de la infección (Williams y cols., 2004; Kaida y cols., 2007).

Las infecciones debidas al hMPV, como todas las asociadas a IRA baja, ocurren preferentemente en invierno y primavera. En zonas templadas, el pico estacional de infecciones por este agente aparece al final del invierno y comienzos de primavera y se ve solapado con el pico de aparición de las infecciones con VSR. Además, se ha demostrado -en muy baja frecuencia- la presencia del virus en individuos asintomáticos. En cuanto a la infección primaria, suele presentarse -en la mayoría de los casos- en niños en el primer año de vida, hospitalizados con enfermedad respiratoria aguda. La infección puede repetirse pues no deja inmunidad completa debido a la heterogenicidad del genoma (Boivin y cols., 2003; Williams y cols., 2004).

El hMPV no es un patógeno estrictamente de niños, sino también de sujetos con condiciones de inmunosupresión y de ancianos en los que puede predisponer a manifestaciones graves de infección (Falsey y cols, 2003)(Fig. 4).



**Figura 4:** Prevalencia de hMPV en distintas poblaciones (Modificado de Van den Hoogen y cols., 2004).

En el hemisferio norte, el hMPV estaría asociado como causal de enfermedad respiratoria aguda entre el 6% al 40 % de los casos (Boivin y cols, 2003; Mc Adam y cols, 2004; Mullins y cols, 2004; Bosis y cols, 2005 ).

En un estudio retrospectivo, Williams y cols. analizaron 72 muestras de suero de niños mayores y adultos guardadas desde 1958, encontrándose serología positiva para hMPV en el 100% de las mismas. Por otro lado se demostró que en lactantes de 6 meses a 1 año la seroprevalencia era del 25%.

La mayoría de los estudios epidemiológicos realizados correspondieron a pacientes hospitalizados (30% - 50%). En estos trabajos, la mayor parte de los pacientes pediátricos estudiados cursaban con una enfermedad crónica de base como asma, enfermedad pulmonar crónica, enfermedad cardíaca o cáncer (Abara y cols, 2006).

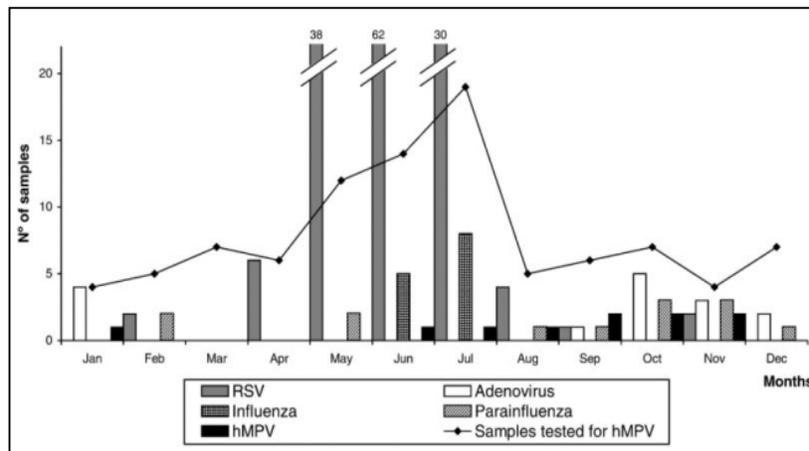
En algunos casos se presenta como apnea, situación que es más frecuente en prematuros que en ocasiones llega a requerir conexión a ventilación mecánica y tratamiento en una unidad de cuidados intensivos (Jofré y cols, 2007).

En los adultos la infección por hMPV ha sido asociada con enfermedad respiratoria aguda y las hospitalizaciones de los mismos se atribuyen a pacientes con las mismas patologías que los niños sumándose la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Stockton y cols., 2002).

Debido a que la aparición estacional del hMPV y la del VSR son similares, se han descrito casos de coinfección, hallándose en un rango del 5 al 17 %. Aunque es discutida la sinergia de ambos virus en la severidad de la enfermedad en pacientes pediátricos, en muchos de los casos estos pacientes debieron ser hospitalizados para

su atención. Si bien hay discordancia en opiniones entre algunos autores con esta afirmación, estos conflictos son atribuibles a diferencias metodológicas o a la variabilidad geográfica en cepas circulantes. (Cuevas y cols., 2003; Greensill y cols., 2003; Lazar y cols., 2004; Falsey y cols., 2006). Por otro lado, se ha reportado que la carga viral y los distintos subgrupos de metapneumovirus se relacionarían con diferentes grados de gravedad, sobre todo en niños hospitalizados y en aquellos que poseen una enfermedad crónica de base (Bosis y cols., 2008).

En Argentina, Galiano y cols. reportaron en el año 2004 las primeras evidencias de la presencia de hMPV en niños con infecciones respiratorias agudas (IRA) bajas. En este trabajo, 11 de 100 muestras de aspirados nasofaríngeos fueron positivas para este virus. El pico de aparición del virus fue observado en los meses de primavera en concordancia con lo publicado por un grupo de Vanderbilt, Nashville, USA. (Williams y cols., 2004) (Fig.5). Poco tiempo después, otras comunicaciones fueron realizadas en La Plata (Laham y cols., 2004) y Ushuaia (Mallimaci y cols., 2006).



**Figura 5:** Cocirculación de hMPV con otros virus respiratorios hallados en niños menores a cinco años en la Ciudad de Buenos Aires durante el período 1998 – 2002 (Tomado de Galiano y cols., 2004)

## 5 -Respuesta Inmune

Teniendo en cuenta la clínica, la epidemiología y además por estar incluido en una misma subfamilia en la clasificación taxonómica, el virus VSR y el hMPV compartirían semejanzas en cuanto a la forma de infección y propagación en huéspedes susceptibles. En función de esto, se puede deducir que la respuesta inmune

puede relacionarse en varios aspectos. Usando el modelo propuesto para VSR, en principio, la proteína de fusión estimularía la respuesta inmune innata al ligar el antígeno con el receptor CD4 + en macrófagos y promoviendo la producción de citoquinas inflamatorias. Este proceso incrementa en primer lugar la producción de citoquinas, incluyendo interleuquina (IL-8), IL-1b y TNF- $\alpha$ , que se asocian con la activación de neutrófilos y migración hacia los pulmones. Estudios recientes demostraron que existen polimorfismos presentes en genes inmunomoduladores de la IL-4 y la IL-8 que pueden estar asociados con una predisposición genética a una enfermedad mas severa. En las exacerbaciones asmáticas se observó que el proceso inflamatorio mediado por células T CD4 +, se caracterizada por una expresión elevada de IL-4, IL-5 y IL-13. También se ha visto que el perfil de la IL-8 y RANTES en secreciones nasales fue diferente al perfil observado en la infección por VSR (Jarti, 2002; Martín, 2006 y cols.).

Este incremento en la actividad inflamatoria ha sido hipotetizada como común al mecanismo de infección viral del tracto respiratorio bajo, mediada por la obstrucción inflamatoria del lumen en los pequeños bronquiolos. Se ha encontrado que los niveles de citoquinas inflamatorias en secreciones respiratorias de niños infectados con hMPV fue de 2 a 6 veces más bajos que en los niños infectados con VSR (Laham y cols., 2004).

Las reinfecciones virales en humanos con estos virus, son muy comunes ya que generalmente no se desarrolla inmunidad permanente. Los niños poseen una respuesta inmune limitada a la mayoría de los virus; solo los anticuerpos adquiridos de la madre aparecen protegiendo enfermedades severas en los primeros meses de la vida. Además se ha descrito que los niños poseen respuesta mucho menor en cuanto a la afinidad de anticuerpos neutralizantes hacia los virus en comparación con los adultos. El rol de la inmunidad mediada por células y el *clearance* de infecciones virales aún no está demasiado claro en niños, por lo tanto éstos estarían en riesgo en adquirir enfermedades más severas debido a la inmunidad inmadura que poseen (Crowe y cols., 2003; Martín y cols., 2006).

## **6 -Manifestaciones Clínicas**

Las manifestaciones clínicas en niños son indistinguibles de aquellas provocadas por los virus respiratorios clásicamente conocidos, y varían desde infección asintomática hasta neumonía complicada

La mayoría de los pacientes pediátricos son infectados a la edad de 5 años y la reinfección puede ocurrir en el primer año de vida. La duración de los síntomas antes de la atención médica es usualmente menor a una semana y la mayoría de los niños disemina el virus por al menos dos semanas (Boivin y cols., 2002; Peret y cols., 2002; Van den Hoogen y cols., 2003; Williams y cols., 2004; Ebihara y cols., 2004)

Los porcentajes hallados en cuanto a la sintomatología causada por este agente en niños se describen en la Tabla 1:

Síntomas	Porcentaje	Signos	Porcentaje
Tos	90	Rinitis	77
Rinitis aguda	88	Sibilancias	52
Fiebre	52	Otitis	51
Irritabilidad	43	Faringitis	39
Ronquidos	22	Roncus	20
Diarrea	17	Estertores	8
Vómitos	10		

**Tabla 1:** Signos y síntomas de 49 niños con diagnóstico de IRA, en los cuales se detectó la presencia de hMPV (Modificado de Williams y cols., 2004)

Los hallazgos más comunes se manifiestan en la infección primaria como un resfriado común. Primeramente se observa una destrucción del epitelio respiratorio por el virus, seguida por una producción inicial de líquido claro en los primeros días post-infección, lo que lleva a una activación de las defensas inmunitarias del huésped con una mayor destrucción del epitelio respiratorio como parte de la respuesta inmune. Esto predispone a que pueda existir un crecimiento de las bacterias oportunistas presentes en el tracto respiratorio con secreción de líquido purulento en los estadios finales de la infección. Si hay una buena resolución por parte del huésped hacia el virus, se produce una regeneración del epitelio y aclaramiento de la infección viral.

Además se puede observar, irritabilidad, rechazo alimentario, rinorrea, congestión nasal, eritema faríngeo, mialgia, tos y fiebre. Otras veces, la infección por hMPV afecta las vías respiratorias bajas (IRAB), ocasionando cuadros graves con dificultad respiratoria, bronquiolitis, neumonía, síndrome bronquial obstructivo y falla respiratoria (Díaz-Rubio y col., 1994; Peret y cols., 2002; Peiris y cols., 2003).

Una de las características clínicas principales causadas por el hMPV, es la bronquiolitis que se caracteriza por presentarse como un síndrome agudo que afecta a

los niños durante los dos primeros años de vida (mayor tasa de ataque entre 1 y 6 meses de edad) y se observa una inflamación del epitelio que reviste los pequeños bronquios y los bronquiolos. A medida que la inflamación progresa, la infiltración peribronquiolar y el edema de la submucosa y la adventicia conducen a la necrosis y pérdida del epitelio bronquiolar y, en consecuencia, al estrechamiento y obstrucción de la luz de las vías aéreas. La progresión del proceso conduce a la neumonitis intersticial. Además dentro de la sintomatología se incluyen unos prodromos de las vías aéreas altas y un comienzo agudo con respiración sibilante, distensión torácica, tos, disnea, apnea y síndrome de dificultad respiratoria aguda lo que conlleva a la mayoría de los niños a una hospitalización (Calvo y cols., 2007).

Los síntomas no respiratorios como conjuntivitis, vómitos, diarrea y eritema son reportados ocasionalmente y no son predominantes en la mayoría de los estudios.

Radiológicamente los pacientes que sufren una enfermedad a causa del hMPV pueden mostrar un infiltrado perihiliar difuso, zonas de hiperinsuflación de localización irregular, atelectasia, consolidación e imágenes intersticiales (Williams y cols., 2004; Schildgen y cols., 2004).

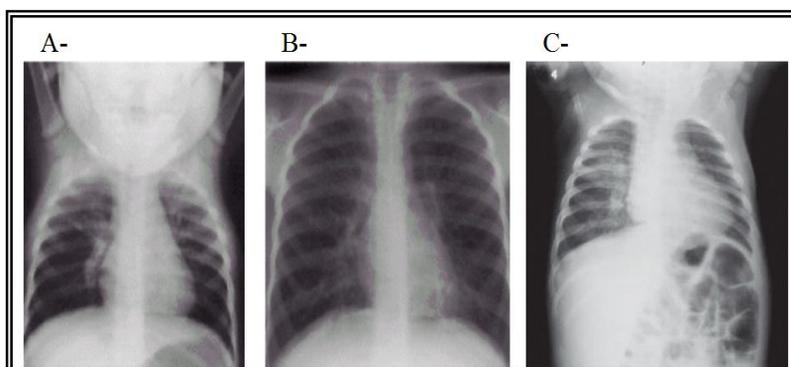


Figura 6: (A) Radiografía de tórax de un niño de seis meses que presentó un cuadro de bronquiolitis a causa del hMPV. (Tomado de Williams y cols, 2004) (B) Imagen radiológica típica de una niña de seis años con asma bronquial aguda asociada a una infección con hMPV (Tomado de Schildgen y cols, 2004) (C) A. Paciente de 6 meses presentando Atelectasia segmentaria de lóbulo superior derecho (Tomado de Mallimaci y cols, 2006)

Diversos agentes bacterianos como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* asociados a una coinfección por hMPV pueden provocar otitis media (Williams y cols., 2006).

A semejanza de lo que ocurre con el VSR, el hMPV también se ha asociado a casos de exacerbación asmática aguda en niños (Schildgen y cols., 2004; Williams y cols, 2005; Williams y cols, 2006) y en adultos asmáticos la infección por este virus juega un rol decisivo, obligando la hospitalización de los pacientes afectados (Boivin cols., 2005;

Boivin y cols., 2002; Maertzdorf y cols., 2004; Rawlinson y cols., 2003; Van den Hoogen y cols., 2003).

Los casos fatales a causa de una infección por este virus, en adultos jóvenes generalmente se asocian a otras enfermedades de base; se han descrito casos de pacientes con leucemia que complican su enfermedad luego de un trasplante de médula ósea (Cane y cols., 2003; Pelletier y cols., 2002). Además, se describió un caso fatal de edema cerebral en un niño causado por una encefalitis. Estas manifestaciones neurológicas podrían estar vinculadas con los hallazgos del ARN del hMPV en los tejidos del cerebro y pulmón post-mortem (Schildgen y cols., 2005).

En huéspedes inmunocomprometidos todavía se desconoce la incidencia y la severidad de la enfermedad causada por el hMPV (Williams y cols., 2005).

En relación a la infección en adultos, se observó una tasa entre el 2% y el 7%, en la mayoría de los casos cursan con una enfermedad leve en la que se destacan: tos, ronquera, congestión nasal y rinorrea. La fiebre es inusual. El 50% de los casos refiere dolor de garganta con producción de esputo y síntomas generales compatibles a una enfermedad viral. En pacientes de edad avanzada y con EPOC se ha reportado que también puede ser detonante de exacerbaciones de asma (Chan y cols., 2004; Rohde y cols., 2005; Martinello y cols., 2006).

En un estudio comparativo entre el hMPV y los demás virus respiratorios se pudo observar que la clínica posee características propias y lo diferencian del resto de los virus respiratorios en cuanto a las sibilancias, la expiración prolongada e hipoxemia encontradas en aquellos individuos que portaban este agente viral (Wolf y cols., 2006).

### **1.7 -Prevención y Tratamiento**

Las primeras medidas terapéuticas han deben encaminarse al mantenimiento de las funciones vitales frecuentemente amenazadas en lactantes y niños. La oxigenoterapia inicial, intubación orotraqueal y ventilación asistida, son medidas que en situaciones graves resultan imprescindibles.

El agente antiviral indicado para controlar la infección del VSR es la ribavirina en aerosol, un análogo nucleosídico. Es raramente usado por su falta de una eficacia en niños, por los efectos adversos que ocasiona y su dificultad en la administración. La ribavirina ha sido usada en pacientes inmunocomprometidos y también en pacientes trasplantados de médula ósea, frecuentemente en conjunción con una inmunoglobulina específica. (De Vincenzo y cols., 2000). Recientemente, un grupo mostró que la ribavirina

y la inmunoglobulina policlonal humana poseen una actividad neutralizante "in vitro" contra el hMPV equivalente a su actividad frente al VSR (Wyde y cols., 2003).

Las vacunas a virus vivo atenuado han sido desarrolladas satisfactoriamente contra diversos virus. Sin embargo, la generación de una vacuna atenuada para VSR fue muy dificultosa y los mismos inconvenientes se han encontrado para obtener una vacuna contra hMPV por esta vía. En los últimos años, nuevas estrategias se están desarrollando con la incorporación de técnicas de ADN recombinante. En este sentido, se ha diseñado una vacuna quimérica bovina-humana que expresaba el gen F y fue inmunogénica y protectora contra el hMPV en modelos animales (hámster) (Tang y cols., 2003)

Finalmente se deben extremar las medidas preventivas para evitar la diseminación del virus en medios hospitalarios ya que las infecciones nosocomiales son frecuentes y ensombrecen el pronóstico de lactantes ingresados por otras patologías y que adquieren la infección en el medio hospitalario.

## **8- Diagnóstico de Laboratorio**

### **8.1- Selección de la muestra a procesar**

Para la obtención de resultados confiables es fundamental que la muestra sea de buena calidad. En general, se consideran idóneas el aspirado nasofaríngeo, el lavado nasal, y el escobillado nasal o faríngeo. En caso necesario, también son útiles muestras invasivas, como el lavado broncoalveolar o el material de biopsia respiratoria.

Las muestras se deben procesar lo más rápido posible por lo cual se enviarán al laboratorio, preferiblemente refrigeradas. Si el procesamiento no es de inmediato, el material de estudio debe mantenerse a 4 °C hasta un máximo de 48 hs. Si se prevee una demora mayor en el procesamiento, se deben congelar a temperaturas inferiores a -70 °C. La conservación inadecuada de la muestra o la demora en su procesamiento repercuten en un resultado falsamente negativo a la hora del diagnóstico.

La muestra de elección para la detección del hMPV, es el aspirado nasofaríngeo ya que es el procedimiento menos invasivo, de fácil recolección y porque suministra el número apropiado de células infectadas. Con el uso de este procedimiento de toma de muestra se ha logrado identificar la presencia de este virus tanto en sujetos inmunocompetentes como en los inmunodeprimidos.

## 8.2- Aislamiento en cultivo celular

El aislamiento del virus en cultivo a partir de muestra clínicas, fundamentalmente utilizando líneas celulares (LC), ha sido clásicamente el procedimiento de referencia en el diagnóstico de las virosis respiratorias, aunque en la práctica sólo puede llevarse a cabo en laboratorios con una infraestructura adecuada. El cultivo presenta las ventajas de poder disponer de las cepas para estudios adicionales: serotipificación, pruebas de sensibilidad, estudios epidemiológicos, etc., y de ser un sistema abierto que permite detectar, en principio, cualquiera de los virus. No existe ninguna LC que sea capaz de permitir la replicación de todos los virus respiratorios, de la misma forma que no existe ningún virus capaz de replicar en todas ellas. Este hecho obliga a realizar la siembra de la muestra en diferentes líneas que, en conjunto, puedan cubrir el abanico de virus que pretendemos detectar.

<b>Tabla 2.</b> Comparación de crecimiento en líneas celulares de los diferentes virus respiratorios					
VIRUS	Línea celular				
	HEP-2	MRC-5	LLC-MK2	MDCK	A-549
VRS	++	+	+	-	+/-
Influenza	-	+/-	+	++	-
Adenovirus	++	+	-	-	++
Parainfluenza	+	-	++	-	+/-
Rinovirus	+/-	++	-	-	-
Coronavirus	-	-	-	-	-
Metapneumovirus	+	-	+	-	-
Bocavirus	-	-	-	-	-

Hep-2: carcinoma laríngeo, MRC-5: Fibroblastos de pulmón embrionario humano, LLC-MK2: riñón de mono Rhesus, MDCK: riñón canino Cocker Spaniel, A549: carcinoma de pulmón humano,  
(Fuente: Navarro y cols., 2007)

Las más utilizadas en las IRA y los virus a los que son sensibles se muestran en la Tabla 2. El tiempo medio de crecimiento de los virus respiratorios en cultivo celular suele oscilar en torno a los 5-7 días, hasta hacerse evidente por la presencia de un efecto citopático más o menos característico, aunque varía según el virus. A este tiempo hay que sumarle las 24-48 hs. que tarda hasta la confirmación definitiva. La demora en la obtención de resultados hace que, en gran medida, el diagnóstico clásico por cultivo pierda mucha utilidad en la práctica clínica diaria.

Para resolver en parte estos inconvenientes del cultivo tradicional, se ha desarrollado la técnica de *shell-vial* (SV) que, sin perder la especificidad y las ventajas del cultivo, permite un diagnóstico en un tiempo mucho menor. La muestra se inocula

por centrifugación en una monocapa crecida en un cubreobjetos circular, que se deposita en un tubo de fondo plano. Tras un período de incubación de 18- 48 h, se extrae el cubreobjetos y se realiza una inmunofluorescencia (IF) sobre la monocapa con anticuerpos monoclonales frente a los antígenos del virus que queremos detectar.

En la actualidad, a los problemas reseñados del diagnóstico por cultivo, hay que sumarles que la mayoría de los nuevos virus que se están describiendo como implicados en IRA, (tabla 2) no se replican, o lo hacen muy mal, en las LC más utilizadas hasta la fecha (Navarro y cols., 2007).

### **8.3- Análisis Molecular**

Existe un interés creciente en muchos centros de salud por mejorar los métodos moleculares de diagnóstico de los virus respiratorios para conseguir la simplificación del proceso y una mayor rapidez, mediante automatización de los formatos existentes o empleando nuevos formatos de amplificación o de detección. La tendencia indica que las técnicas moleculares estarían destinadas a sustituir a los métodos clásicos de cultivo celular dado que esta última no es una técnica de primera línea en la práctica clínica, por la laboriosidad que implica y la infraestructura que se necesita, para la detección de virus respiratorios.

Por otra parte se hace imprescindible contar con métodos diagnósticos específicos, de ejecución rápida y de alta sensibilidad, como son los inmunoensayos o la inmunofluorescencia para el uso rutinario en el diagnóstico de IRA por hMPV. Es de remarcar que hasta no aparezcan métodos moleculares totalmente automatizados, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (directa o acoplada a un paso de Transcripción Reversa) parecería ser la más apropiada y con más ventajas una vez que es puesta a punto en el laboratorio. La combinación de técnicas nuevas y clásicas, en función de la disponibilidad de cada laboratorio, puede aumentar enormemente el rendimiento diagnóstico en las infecciones respiratorias virales y, por consiguiente, permitir una aproximación mayor al impacto real que supone este tipo de infecciones en la población.

#### **8.3.1- Técnicas Inmunoquímicas para detección de antígenos virales**

La utilización de anticuerpos monoclonales en el diagnóstico de las infecciones virales ha permitido facilitar la identificación de los aislamientos que se llevan a cabo en cultivo y el desarrollo de metodologías que permiten el diagnóstico directamente a partir

de muestras clínicas. De ellas, las más utilizadas son la inmunofluorescencia, y las técnicas inmunoenzimáticas (EIA).

En general, estos procedimientos presentan la ventaja teórica sobre el cultivo de poder detectar virus no viables, incapaces de replicarse, pero en ningún caso se ha conseguido una sensibilidad o especificidad equiparables a las del cultivo.

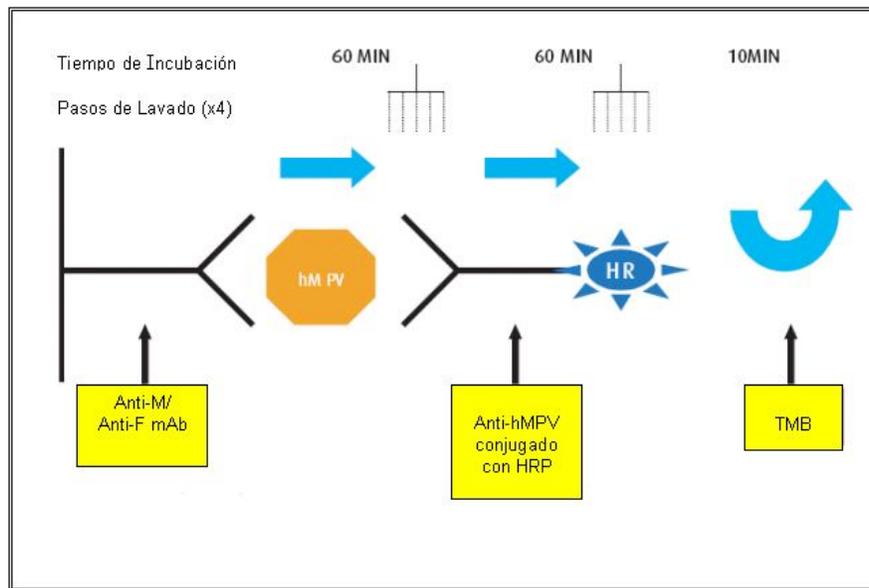
La IF es la técnica más versátil y la que permite detectar un mayor número de virus, ya que para la mayoría de ellos existen anticuerpos monoclonales de los que se puede disponer comercialmente. Se requiere un microscopio de fluorescencia y entrenamiento en la observación de las preparaciones. En el mercado ya existen equipos comerciales para la detección de este patógeno, pero aún su sensibilidad y especificidad no han sido establecidas (Chemicon Interantional®)

En Italia un grupo de investigadores desarrolló un sistema inmunoquímico rápido de diagnóstico para el hMPV basado en la fluorescencia directa. En este trabajo los anticuerpos monoclonales específicos de hMPV han mostrado una amplia reactividad con todos los subtipos de hMPV tanto las muestras de pacientes como así también en células LLC-MK2 infectadas con el virus. En este mismo estudio, utilizando la RT-PCR como método de referencia, la IFD mostró una sensibilidad de 73,9 % y una especificidad de 94,1% (Percivalle y cols., 2005).

Los métodos de EIA, aunque se han simplificado mucho en su diseño, y permiten individualizar la técnica para cada muestra y una realización en un corto lapso, requieren varios pasos y precisan de atención constante durante su ejecución.

En la actualidad, varias técnicas de EIA se están desarrollando para el diagnóstico rápido del hMPV. No obstante, los resultados obtenidos, sobre todo en cuanto a sensibilidad, varían mucho según el equipo utilizado, la muestra y la edad de la población estudiada.

Existen varios grupos de investigadores que están desarrollando métodos inmunoquímicos para la detección de las distintas proteínas de este agente. Hasta el momento se encontró buena reactividad para todos los tipos y subtipos del hMPV, pero aún los equipo para el uso rutinario se encuentran en vías de desarrollo y los que existen son sumamente costosos. La Fig. 7 muestra un esquema de uno de los modelos propuestos, en este caso utilizando anticuerpos monoclonales contra las proteínas M y F del hMPV (Alvarez y cols., 2004; Reid y cols., 2006).



**Figura 7:** Enzimo inmunoensayo, para la detección simultánea de los genes M y F del hMPV (©Biotrin International ,2005)

### 8.3.2- Tecnologías de análisis de Ácidos Nucleicos (NATs) para la Detección de Virus Respiratorios

Las pruebas analíticas que implican las tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos (NAT, en inglés) han supuesto una alternativa muy útil para el diagnóstico de los virus respiratorios, sobre todo para los laboratorios en los que el cultivo celular no estaba disponible. La técnica más comúnmente utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque hay otras NAT que también se han empleado en la detección de estos virus,

En su conjunto, estas metodologías ofrecen dos ventajas principales con respecto al cultivo: no requieren virus viables y se pueden obtener resultados en menor tiempo. Además, las NAT son la única posibilidad existente en la actualidad para detectar nuevos virus respiratorios emergentes. En el caso del hMPV, aunque se ha aislado de cultivo celular y se han comercializado algunos equipos de detección de antígeno, que podrían emplearse tanto a partir de muestras clínicas como de cultivo celular, las NAT son las más sensibles hasta la fecha para detectarlo. Una limitación es que se debe conocer, al menos en parte, el genoma del virus que se quiere detectar. Por otra parte, actualmente la combinación de métodos automatizados de extracción de ácidos nucleicos con NAT en tiempo real ha simplificado enormemente el proceso completo. Los sistemas automatizados de extracción permiten procesar un elevado

número de muestras con un tiempo de preparación mínimo y las nuevas NAT, como la PCR en tiempo real, combinan amplificación y detección, lo cual evita el manejo de los productos postamplificación y, por tanto, el riesgo de contaminación en el laboratorio de biología molecular.

Estos nuevos formatos ofrecen sensibilidad y especificidad equiparables a los formatos clásicos de PCR convencional y mayor rapidez en la obtención de resultados (de 10 h para PCR convencional a 4 h para protocolos de PCR en tiempo real). También su utilización implica una mayor rapidez y simplicidad en la ejecución del procedimiento (de 3 hs. pasaría a 1 h, aproximadamente)

Dentro de las nuevas técnicas de detección se pueden mencionar, además de la *real-time* PCR, otras que ya se comercializan como *kit* diagnósticos: *real-time* NASBA® y multiplex *real time* PCR (hMPV + VSR) (Maertzdorf y cols., 2004).

En síntesis, en cuanto a su *performance* analítica, estas técnicas son ideales debido a su rapidez y entrega de resultados, pero el inconveniente es, por el momento, el gran costo del equipamiento necesario, el hecho de que varios equipos sean reactivo-dependientes y, en consecuencia, no se aconsejan para el uso masivo debido a la relación costo-beneficio.

Además, en el caso de genomas virales consistentes en ARN, existe una gran diversidad de diseños y protocolos para la detección de las distintas secuencias de genes por la técnica de RT-PCR y todas han demostrado tener muy buena sensibilidad y especificidad. Por otra parte, se postula que es la técnica de elección para el diagnóstico de infección por hMPV debido a que es una técnica robusta, reproducible y el tiempo que se necesita para brindar resultados es corto a comparación de otras.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados y el hecho de que en nuestro laboratorio (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Emilio Coni”) no se contaba con una metodología de análisis que permitiera poner en evidencia la presencia del Metapneumovirus en nuestra región, nos planteamos los objetivos que se detallan a continuación.



**Objetivos**

### **1- Objetivo General**

- Iniciar la búsqueda de Metapneumovirus como responsable de patologías respiratorias en niños de nuestra región, con la aplicación de técnicas de biología molecular.

### **2- Objetivo Particular**

- Diseñar una estrategia de detección del hMPV basada en la amplificación in vitro por RT-PCR y realizar la confirmación de la misma, por un método sencillo.

 **Material es y Métodos**

### **1- Selección y Preparación de Muestras Clínicas**

Se analizaron aspirados nasofaríngeos (n = 118) de pacientes admitidos en el Hospital de Niños "Dr. Orlando Allasia" de la Ciudad de Santa Fe. Las muestras fueron seleccionadas al azar de aquellas que presentaron negatividad a pruebas diagnósticas para otros virus respiratorios.

También se tuvo en cuenta la clínica (cuadros respiratorios severos), la edad de los niños (menores a 5 años), el período de incubación de la patología respiratoria (7 a 15 días) y la época del año en que se presentaron los casos (finales del invierno-primavera de año 2005)

### **2- Detección de Virus Respiratorios**

La presencia de Virus Respiratorio Sincicial, Adenovirus, Virus Influenza A y B y/o Virus Parainfluenza 1, 2 y 3 fue analizada por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales con un revelado mediante la adición de una IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (Chemicon ® Internacional)

### **3- Conservación de la línea celular LLC-MK2 infectadas con el virus hMPV.**

Se utilizaron lotes de células LLC-MK2 infectadas con el virus hMPV, (gentilmente cedidas por la Dra. Cristina Videla, CEMIC, Buenos Aires), las que se cultivaron a 37° C en atmósfera con 5% de dióxido de carbono por 14 días, en medio MEM-Earle's suplementado con albúmina al 1%, HEPES 1M, glucosa 100X, penicilina-estreptomina 100X y tripsina pancreática porcina 0,1%. Las células fueron observadas cada tres días en busca del ECP, definido como el hallazgo de células granulares separadas de la monocapa.

Posteriormente, para su propagación se seleccionó una botella con una monocapa completa. La misma fue lavada con medio de cultivo MEM y luego se agregó una solución de tripsina al 0,1%, en un volumen suficiente para cubrir la monocapa, descartando el exceso. El cultivo fue incubado a 37°C, durante 5 minutos. Las células, una vez resuspendidas, fueron conservadas a -70°C, en alícuotas de 1,5 ml, para su posterior utilización. (En el desarrollo de la tesis no se realizaron ensayos de cultivos celulares)

#### **4- Purificación de Acido Ribonucleico Total**

El ARN total fue extraído a partir de las muestras clínicas seleccionadas y de la línea celular LLC-MK2 infectada por el hMPV. Se utilizó un procedimiento estándar con Tiocianato de Guanidina usando el reactivo comercial denominado TRIZOL®

Para ello se adicionó 1 ml de Trizol® a un volumen de 500 µl de aspirado o de suspensión de células LLC-MK2, homogeneizando e incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente con *vórtex* durante 15 segundos y se dejó reposar 3 minutos a temperatura ambiente. (Sambrook y cols., 1989)

Para separar las fases acuosa y orgánica, se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 10.000 g a 4°C. La fase acuosa superior (400 µl) se pasó a otro tubo Eppendorf y a la misma se adicionaron 500 µl de isopropanol, incubando 10 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente 10 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se lavó el *pellet* de ARN con 1 ml de etanol al 75%. Se descartó el sobrenadante luego de un paso de centrifugación de 30 seg a 10.000g y se evaporó el remanente de alcohol a 37°C. El *pellet* finalmente se resuspendió en 100 µl de agua estéril mediante pipeteos y agitación con *vórtex*. La conservación de los mismos se realizó a -70°C. (Sambrook y cols., 1989)

#### **5- Ensayos de Transcripción Reversa**

Para la obtención del ADNc a partir de los ARN extraídos en el paso anterior, se utilizó la enzima Transcriptasa Reversa MML-V (Moloney Murine Leukemia Virus) y oligonucleótidos al azar (*random primers*). En los distintos ensayos, en un primer paso se incubó el ARN 5 µl de RNA previamente extraído a 70 °C, durante 5 min a fin de eliminar estructuras secundarias. Luego se agregaron por tubo de reacción: 200 U de la enzima M-MLV, 100 pmol de *random primers*, dNTPs 0,4 mM, Tris-ClH pH 8,3 50 mM, ClK 75 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 3 mM y DTT 10 mM, todo llevado a un volumen final de 25 µl y la mezcla se incubó a 42 °C durante 1 h. Finalizada esta incubación, las muestras fueron sometidas a 95 °C durante 5 min. a fin de inactivar la enzima transcriptasa reversa. Las muestras de los ADNc obtenidos, se conservaron a -20°C hasta su procesamiento por PCR. (Sambrook y cols., 1989)

## 6- Amplificación *in Vitro* de ADN por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para detectar la presencia del genoma del hMPV, se seleccionaron secuencias correspondientes a los genes N y F, para ser amplificadas por la Reacción en Cadena de la Polimerasa. En la Tabla 3 se presentan los oligonucleótidos utilizados.

Oligo	Secuencia	Sitio de hibridación de primers (Nº de Acceso a Gen Bank 371337)
<i>hMPV-Nf</i>	5- TATATTCATGCAAGCTTACGG-3	777- 797
<i>hMPV-Nr</i>	5- CCCAACTTTGCAAGTGTTGTTTC-3	994-1015
<i>hMPV-Ff</i>	5- GAGCAAATTGAAAATCCCAGACA-3	3328-3350 (Falsey, 2003)
<i>hMPV-Fr</i>	5-GAAAAC TGCCGCACAACATTTAG-3	3652-3674 (Falsey, 2003)

**Tabla 3:** Secuencias de Primers utilizados en los ensayos de PCR.

## 7 - Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la optimización de la amplificación de segmentos correspondientes a los genes *N* y *F*, se trabajó con un volumen final de 25 µl, utilizando reactivos comerciales. La reacción se llevó a cabo en un medio conteniendo *buffer* termofílico (10mM Tris-HCl pH:9, 50 mM NaCl y Tritón X-100), 0,4 µM de los oligonucleótidos primers o cebadores específicos de secuencia, 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa, 1 µl de ADN plasmídico, agua en cantidad suficiente para 25 µl así como MgCl<sub>2</sub> y dNTPs en concentraciones apropiadas. En primer lugar, se evaluó la concentración de MgCl<sub>2</sub> en concentraciones crecientes de 1 a 3 mM, manteniendo el resto de los reactivos en concentraciones constantes. En segundo lugar la concentración de dNTPs se tituló en un rango de 40 a 120 µM, con las mismas condiciones para los reactivos restantes. (Sambrook y cols., 1989)

Por otro lado, con el fin de conocer el rango dinámico del ensayo, se plantearon experiencias de PCR en las que se evaluó la formación de productos de amplificación a partir de distintas concentraciones de ADN (Diluciones seriadas de ADN plasmídico conteniendo el inserto del gen N), en función del número de ciclos transcurridos

**Condiciones de ciclado.** En cuanto al programa de ciclado se aplicaron varias alternativas citadas en la bibliografía. (Falsey, 2003; Greensill,2003). Una vez evaluados aquellos que nos parecieron idóneos, elegimos el siguiente protocolo:

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg.)
1	94	600
	55	300
	72	120
30	94	30
	55	30
	72	60
1	94	30
	55	30
	72	300

**Tabla 4:** Programa de ciclado utilizado para las reacciones de PCR.

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un Termociclador Eppendorf Modelo Personal Cyclor

## 8 -Controles de Amplificación

En cada reacción, desde el paso de transcripción reversa, se incluyeron los siguientes controles:

**Control de reactivos:** conteniendo agua en lugar de muestra,

**Control positivo:** ARN obtenido a partir de un cultivo viral en células LLC-MK2

**Control Negativo:** conteniendo un ARN no relacionado purificado de células mononucleares de sangre periférica humanas.

Además, a fin de confirmar la identidad del producto amplificado a partir del Gen N, se realizó una digestión del fragmento de amplificación con la enzima *Hinf I* (PCR-RFLP).

## 9 -Precauciones para evitar la contaminación en las reacciones de PCR.

Múltiples precauciones fueron tomadas para asegurar que no ocurrieran contaminaciones con amplicones. Estas incluyeron: separación física de los procedimientos post-amplificación de aquellos de la extracción de ARN y preparación de "master mix", el uso de puntas de micropipetas con barreras así como un minucioso tratamiento de las superficies de trabajo con hipoclorito de sodio y radiación UV.

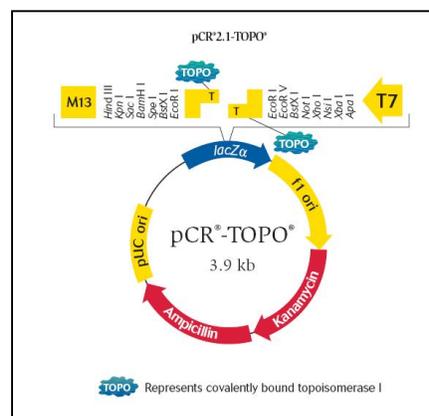
## 10- Clonado de secuencias fragmentos de los genes N y F del Metapneumovirus humano

A fin de contar con un control Positivo para las reacciones de PCR, de fácil purificación y mantenimiento, debido a que no se realizaron ensayos de cultivos celulares, se procedió a la construcción de un plásmido recombinante portador de parte de la secuencia de los genes N y F del hMPV, para ello se utilizaron:

**10.1 -Cepas de Escherichia coli:** *Escherichia coli JM109 wild type*. (Genotipo: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqIqZΔM15])

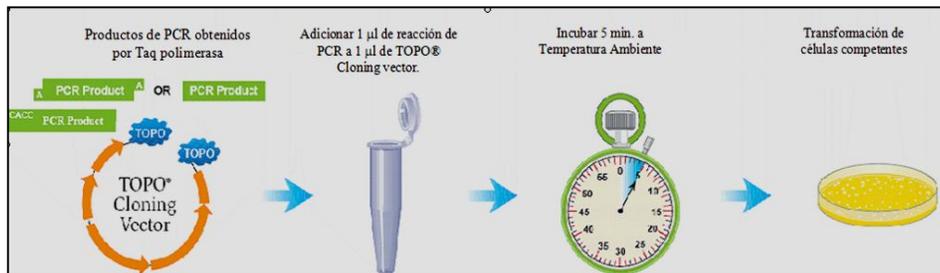
Los cultivos líquidos de bacterias se realizaron en medio LB, a 37°C y en agitación a 180 RPM, suplementándolos con ampicilina a una concentración final de 0,1 μg/ml. Para conservar las cepas durante períodos largos de tiempo, se realizó un cultivo a partir de una colonia aislada en Agar LB, durante toda la noche a 37°C. Se transfirieron 500 μl del cultivo a un tubo Eppendorf de 1.5 ml que contenía un volumen igual de LB-Glicerol 30% (vol/vol), se homogeneizó y se conservó a -70°C (Sambrook y cols., 1989)

**10.2 -Vector Plasmídico:** Se utilizó como vector el plásmido pCR TOPO TA (Invitrogen® life technologies, USA). El mismo tiene un tamaño de 3900 pb y se encuentra en forma lineal, covalentemente unido a la Topoisomerasa I. Posee, además un agregado de una base de Timina los extremos 3' de cada cadena de la doble hebra. Para facilitar la selección de transformantes, posee genes de resistencia a ampicilina y kanamicina, además del promotor T7 para la ARN polimerasa. (Fig.8)



**Figura 8:** Representación esquemática del plásmido vector utilizado para la reacción de clonado.

**10.3 -Reacciones de Ligado:** Para realizar las reacciones de ligado, se incubaron productos de amplificación de los genes N y F con el vector plasmídico TOPO® Cloning vector, en una relación molar 1:1 (vol/vol) A la mezcla se le adicionaron 2,5  $\mu$ l de buffer 2x de T4 ADN ligasa, en un volumen final de 5  $\mu$ l y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Finalizada la reacción de ligado, la mezcla fue utilizada para transformar bacterias *Escherichia coli* JM109 competentes. (Fig. 9)



**Figura 9:** Esquema del protocolo simplificado de la reacción de clonado, para los genes estudiados

#### 10.4 -Transformación de bacterias y Selección de clones recombinantes:

Células de *E. Coli* de la cepa JM109, se cultivaron en medio líquido LB a 37°C y en agitación hasta  $DO_{550} = 0,6-0,8$ . El cultivo saturado fue diluido 100 veces en el mismo medio y cultivado en las mismas condiciones hasta  $DO_{550} = 0,6-0,8$ . Las células se cosecharon por centrifugación a 4.500 r.p.m. durante 5 minutos y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de Solución de Transformación. A la suspensión obtenida se le agregaron 10  $\mu$ l de la mezcla de ligado y se incubó durante 30 minutos en hielo. Luego se adicionaron 900  $\mu$ l de Solución de Transformación fría y se incubó a 37°C con agitación durante 90 minutos. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 4.500 r.p.m. por 5 minutos, resuspendidas en 50  $\mu$ l de medio LB y distribuidas con un rastrillo de Drigalski sobre placas de Petri que contenían LB-agar suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, X-gal 0,006 % p/v e IPTG 0,3mM. Luego de una incubación durante 24 hs a 37°C, las colonias recombinantes, de color blanco, se diferenciaron de las no recombinantes (azules), debido al sistema de  $\alpha$ -complementación para la actividad  $\beta$ -galactosidasa, aportado por el vector. (Sambrook y cols., 1989)

### 11 -Extracción de ADN Plasmídico (Miniprep por lisis alcalina)

Se inoculó una única colonia bacteriana recombinante en 10 ml de medio LB estéril (conteniendo ampicilina 100 µg/ml), permitiendo su crecimiento hasta saturación durante toda la noche con agitación a 37°C. Se tomó una alícuota del cultivo (1 ml) y se centrifugó a 10.000g durante 1 min. El sobrenadante se descartó completamente, se resuspendió el *pellet* en 100 µl de *solución I* y se dejó reposar 5 min. a temperatura ambiente. Se verificó que las células estuvieran completamente resuspendidas para luego adicionarle 400 µl de *solución II*, se mezcló y se dejó en hielo durante 10 min. Posteriormente se adicionaron 300 µl de *solución III* y se mezcló utilizando un *vórtex* a máxima velocidad durante 15 seg. Se dejó reposar en baño de hielo durante 5 min. y se procedió a centrifugar durante 5 min. a 10.000 g para eliminar restos celulares y ADN cromosomal. Se transfirieron 600 µl de sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo, se agregó 1 vol (600 µl) de alcohol isopropílico frío y se dejó 30 min. en mezcla frigorífica para que precipiten los ácidos nucleicos. Se realizó una centrifugación de 3 min. a 10.000 g a temperatura ambiente para recuperar el ADN plasmídico. Se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 100 µl de etanol al 70% . Finalmente se evaporó el resto de etanol en estufa a 37°C y el *pellet* de ADN se resuspendió en 50 µl de buffer TE pH:8 y se conservó a -20°C. (Sambrook y cols., 1989).

### 12 -Confirmación de la identidad del inserto

La confirmación de la identidad de los fragmentos insertados en el vector plasmídico se realizó por PCR, en idénticas condiciones a las descritas previamente.

### 13 -Análisis con enzimas de restricción (PCR-RFLP):

Los fragmentos obtenidos mediante la reacción de PCR a partir de la línea celular LLC-MK2 y muestras, para el gen N fueron sometidos a un clivaje con enzimas de restricción; la composición y condiciones de reacción se describen en la Tabla 5:

Tabla 5: Protocolo de trabajo utilizado para la PCR-RFLP	
Reactivos	Volumen agregado
Buffer termofílico 10x	2,0 µl
BSA Acetilada, 10 µg/µl	0,2 µl
<i>Hinf</i> I, 10 U/µl	1,0 µl
Producto de PCR	10 µl
H <sub>2</sub> O estéril	6,8 µl
Incubación a 37 °C por 60 min.	

#### **14 – Ensayo de Multiplex-PCR en muestras clínicas**

Para la realización de la amplificación de segmentos correspondientes a los genes N y F mediante un ensayo de Multiplex-PCR, se trabajó con un volumen final de 25  $\mu$ l, utilizando reactivos comerciales. La reacción se llevó a cabo en un medio conteniendo *buffer* termofílico (10mM Tris-HCl pH:9, 50 mM NaCl y Tritón X-100), 0,4  $\mu$ M de una mezcla de oligonucleótidos primers o cebadores específicos de secuencia (Genes N y F), 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa, 2.5  $\mu$ l de cADN, agua en cantidad suficiente para 25  $\mu$ l así como MgCl<sub>2</sub> y dNTPs en concentraciones apropiadas. (Sambrook y cols., 1989). En cuanto al programa de ciclado se aplicó el descripto previamente en la sección 7.

#### **15 -Electroforesis en gel de agarosa**

Para la evaluación de las moléculas de ADN obtenidas en los distintos casos se sembraron las muestras en geles de agarosa en concentraciones en el rango del 1 al 3%, dependiendo del tamaño del fragmento a analizar. Los geles fueron preparados en *buffer* TAE 1X, con el agregado de Bromuro de Etidio a una concentración final de 0.5  $\mu$ g/ml. Las corridas electroforéticas se realizaron en el mismo *buffer* a 5-10V/cm. Como marcadores de tamaño se utilizó una mezcla de fragmentos de ADN de tamaño escalonado (100 bp ladder, Promega ®) Los fragmentos de ADN resueltos en el gel se visualizaron en un transiluminador de luz UV ( $\lambda$ 255 nm) o luego de una tinción con sales de plata (Zalazar y cols., 2001).

#### **16– Análisis *in silico***

Para la confirmación de la identidad y especificidad de los oligonucleótidos cebadores utilizados, se recurrió a las utilidades del programa Blast 2 sequences 2.2.14 (*Align two sequences*) y *Blast n* disponibles *on-line* en la página del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Además, para la selección de las enzimas capaces de clivar los fragmentos de amplificación generados por PCR se recurrió al programa *NTISuite* (Version 6.0.3)

Para el análisis de geles los mismos fueron fotografiados, digitalizados y analizados densitométricamente, utilizando el programa *Scion Image* (Scion Co., USA)



**Resultados y Discusión**

## 1- Optimización del ensayo de amplificación *in vitro* del genoma de hMPV

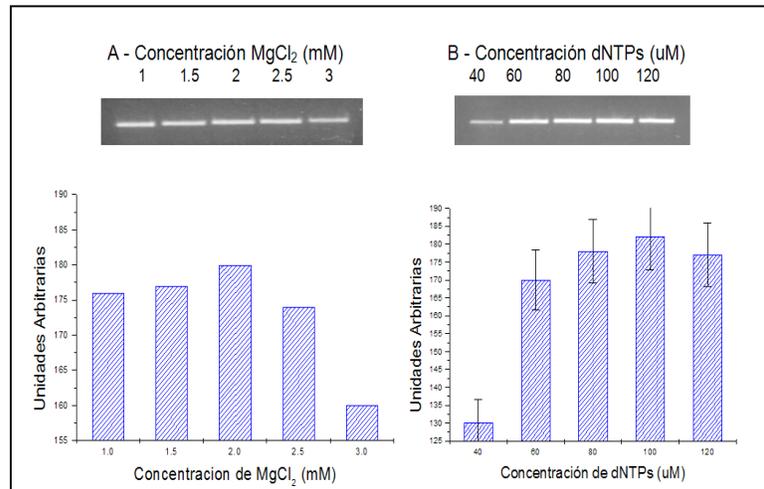
Nos propusimos optimizar un ensayo de RT-PCR para los genes N y F del hMPV, sensible, específico y aplicable en forma rutinaria en nuestro laboratorio.

Dentro de los parámetros críticos en un ensayo de RT-PCR, analizamos varias condiciones en la reacción de amplificación *in vitro*. En este sentido, luego de obtener ADNc a partir de ARN viral (obtenido de cultivos de células infectadas con hMPV), clonarlo en un vector apropiado y obtener el plásmido recombinante purificado, se realizaron experiencias a fin de considerar -en primera instancia- :

- a) los efectos de la concentración de dNTPs,
- b) la concentración óptima de  $Mg^{+2}$
- c) el rango dinámico de trabajo.

Para evaluar los efectos de la concentración de  $MgCl_2$  más apropiada para esta reacción, se evaluaron concentraciones de  $MgCl_2$  desde 1,0 a 3,0 mM, manteniendo constantes el resto de los reactantes. La figura 10 A muestra una imagen típica de estos ensayos. Aunque con poca diferencia a simple vista, el análisis densitométrico de las bandas de esta figura mostró que la mayor señal fue obtenida cuando la concentración de  $MgCl_2$  en el medio fue 2,0 mM.

De la misma forma se diseñó una experiencia similar para conocer la concentración óptima de dNTPs en el ensayo. Para ello se utilizaron cantidades crecientes de los mismos, desde 40 a 120  $\mu M$ , mientras el resto de los componentes de la PCR se mantenían en niveles constantes. Luego del análisis de las imágenes de la Fig 10 B, se observó que la mayor señal fue encontrada para una concentración de dNTPs igual a 100  $\mu M$ .



**Figura 10:** Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas por electroforesis en agarosa para determinar las concentraciones óptimas de trabajo de MgCl<sub>2</sub> y dNTPs en las experiencias de PCR

En concordancia con otros autores, con concentraciones en defecto se produce una disminución en el rendimiento del producto formado. En forma opuesta, con un exceso dNTPs puede observarse una disminución en la señal esperada pero debido, fundamentalmente, a que se favorecería la formación de productos no deseados, comprometiendo la especificidad del ensayo así como a la menor disponibilidad de Mg<sup>+2</sup> libre.

Por otra parte, para conocer la cinética de la reacción de amplificación in vitro, se evaluó la formación de productos en función del número de ciclos transcurridos, para diferentes concentraciones iniciales de templado de ADN ( $7 \cdot 10^4$  –  $7 \cdot 10^6$  moléculas). Esto adquiere importancia a fin de poner en evidencia el máximo número de ciclos que pueden llevarse a cabo mientras el sistema se encuentra en disponibilidad de reactivos y no se alcanza la meseta o *plateau*, dato importante a la hora de intentar disminuir el tiempo total de ejecución del ensayo, sin comprometer la sensibilidad del mismo. Luego de someter distintos números de copias iniciales de templado a un número creciente de ciclos de amplificación, alícuotas de los mismos se analizaron por electroforesis y densitometría. Para el rango de concentraciones analizado, la respuesta más apropiada, en función de nuestros requerimientos analíticos estuvo comprendida entre los ciclos 20 a 30 (Fig 11.).

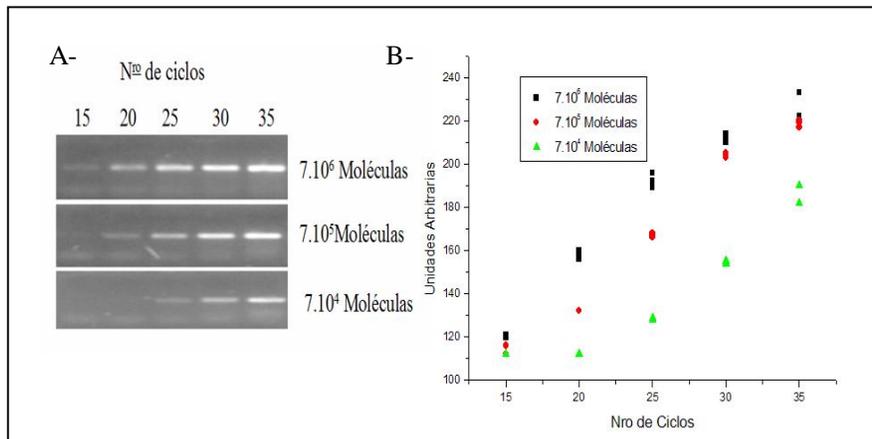


Figura 11: Cinética de formación de productos de amplificación en función del número de ciclos transcurridos y a diferentes concentraciones de templado de ADN.

A - Electroforesis en gel de agarosa al 2% /TAE 1X, coloreado con Bromuro de Etidio.

B - Análisis densitométrico de los amplicones de la Fig.2A.

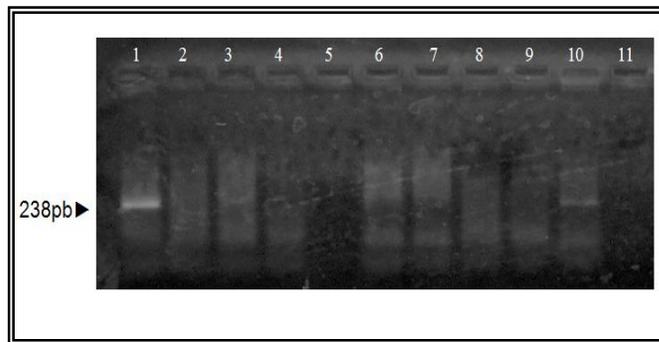
En cuanto al programa de ciclado se aplicaron varias alternativas citadas en la bibliografía. Una vez evaluados aquellos que nos parecieron idóneos, elegimos el siguiente protocolo: incubación inicial a 94 °C durante 10 min., *annealing* a 55 °C por 5 min., y extensión a 72°C durante 2 min., seguido por 30 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 55 °C y 1 min. a 72 °C. El último ciclo consistió en una incubación a 94°C por 30 seg., a 55°C durante 30 seg. y una extensión final de 5 min. a 72 °C.

## 2- Aplicación de ensayo de RT-PCR en muestras clínicas

Una vez analizados y seleccionados los parámetros anteriores, se procedió a intentar la aplicación de esta metodología en muestras clínicas de pacientes pediátricos, afectados de infección respiratoria aguda, posiblemente de origen viral.

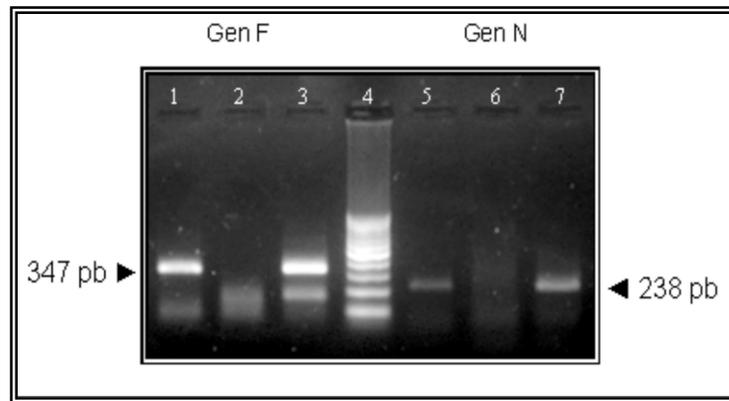
Se seleccionaron aquellas muestras en que todos los ensayos dieron resultados negativos para los agentes virales clásicamente analizados (Virus Sincicial Respiratorio, Adenovirus, Virus Influenza A y B y/o Virus Parainfluenza 1, 2 y 3). Como reacción de *screening*, la reacción de amplificación del genoma viral por RT-PCR tuvo como blanco a una región conservada dentro del genoma del hMPV (Genes N)

La Figura 12 muestra uno de los resultados del análisis del hMPV en un lote de muestras clínicas de niños afectados con IRA. En la misma se observa que, cuando se utilizó el par de *primers* correspondientes al gen N, en una de las muestras pudo amplificarse el fragmento esperado de 238 pb.



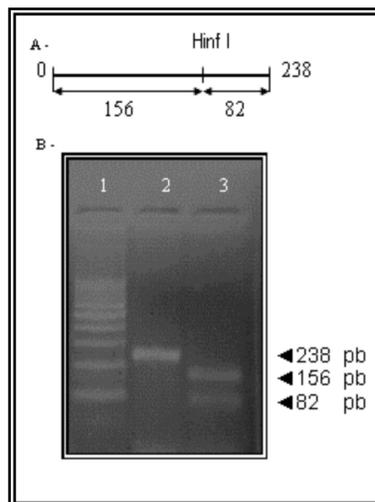
**Figura 12:** Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de amplificación por RT-PCR del gen N del hMPV.  
 Calles 1 a 8: Muestras clínicas (Aspirados nasofaríngeos en estudio) .  
 Calle 9 : Control negativo .Calle 10: Control positivo (Línea celular LLC-MK2 infectada con hMPV).Calle 11: Master Mix (Control de Reactivos)

En los casos en que se obtuvo una reacción positiva para el mencionado gen N, y a fin de confirmar el resultado inicial, decidimos amplificar otra región del genoma; para ello se seleccionaron primers para la región F, relatada en la bibliografía como la más conservada. En este ensayo de confirmación, una banda de 347 pb fue visualizada. (Figura 13)



**Figura 13:** Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de amplificación por RT-PCR de los genes N y F del hMPV. 1 y 5: Control positivo (Línea celular LLC-MK2 infectada con hMPV), 2 y 6: Control negativo, 3 y 7: Muestras clínicas (Aspirado nasofaríngeo) en estudio, 4: Marcador de tamaño molecular (Cien Marker, Biodynamics, Argentina)

Además, a fin de aumentar la confiabilidad del resultados obtenidos, las secuencias correspondientes a los fragmentos de amplificación de los genes N y F fueron analizados con un *software* apropiado para seleccionar una enzima de restricción que originara cortes factibles de ser utilizados en la confirmación de la secuencia amplificada. A partir de este análisis, nuestra estrategia incluyó una digestión del amplicón del gen N con la enzima *Hinf I*, lo que originó dos fragmentos de 156 y 82 pb. Los resultados obtenidos se observan en la figura 14.



**Figura 14:** PCR-RFLP del amplicón del gen N de hMPV con la enzima *Hinf I*. A) Representación esquemática del sitio de reconocimiento de *Hinf I* dentro del fragmento de PCR. B) Electroforesis en gel de agarosa al 3%. 1: Marcador de tamaño molecular (Cien Marker, Promega®), 2: Fragmento de PCR del gen N de 238 pb, 3: Digestión de los productos de PCR, utilizando la enzima *Hinf I*.

Luego de aplicar la metodología aquí estandarizada en muestras de 118 pacientes pediátricos, se pudo detectar la presencia del hMPV en el 4,2% de la población estudiada. Estos resultados estarían en concordancia con lo descrito en la literatura, donde se describen porcentajes que varían entre un 4 y 17% de infección por hMPV cuando se analizaron poblaciones similares.

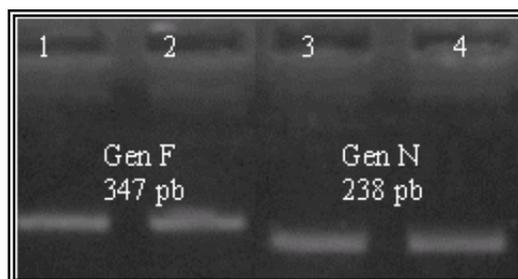
### 3 - Clonado de secuencias fragmentos de los genes N y F del hMPV

Debido a que en el marco de la tesis, no estaba previsto la realización de ensayos de cultivos celulares, se optó por poseer un control positivo de fácil propagación y conservación,

Para ello se utilizaron cepas de *Escherichia coli* JM109, y como vector de clonado de los genes amplificados por PCR, el vector plasmídico comercial denominado pCR TOPO TA (Invitrogen USA) del cual se aprovecharon tres ventajas que posee:

- 1- Ligado del inserto a través de sistema T/A con ayuda de la topoisomerasa
- 2- Selección de clones recombinantes (Por el sistema de  $\alpha$ -complementación para la actividad  $\beta$ -galactosidasa)
- 3- Gen de resistencia a la ampicilina para selección de cepas transformadas.

Se siguió el protocolo de ligado y transformación de las células competentes sugerido por el fabricante, sin modificaciones, logrando obtener dos cepas transformadas con los amplicones de los genes de interés. Para la confirmación de la identidad del inserto se procedió a la purificación de ADN plasmídico por el método de Miniprep por lisis alcalina descrito por Sambrook y cols, seguido por un ensayo de PCR. La siguiente imagen es una de las obtenidas al realizar la confirmación del inserto por PCR:



Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de amplificación por PCR de los genes N y F del hMPV, utilizando como templado DNA plasmídico. 1 y 2: Cepa transformada con el vector de clonado conteniendo el amplicon del gen F; 2 y 4: Cepa transformada con el vector de clonado conteniendo el amplicon del gen N.

#### 4- Aplicación de un ensayo de Multiplex-PCR en muestras clínicas

Una vez puesta a punto la PCR para los genes individuales, decidimos analizar la posibilidad de desarrollar un ensayo para la detección simultánea de ambos genes en la misma reacción. Se comenzó el trabajo con las mismas condiciones de ciclado, y manteniendo las concentraciones de los reactantes, que para la detección de los genes N y F de manera individual.

Como las bandas de amplificación no presentaban una intensidad apropiada (buena densidad) optamos por modificar las concentraciones de dNTPs y  $MgCl_2$ , obteniéndose los mejores resultados, cuando modificamos la concentración de 2 a 2,5 mM de  $MgCl_2$  y de 100 a 120 de dNTPs  $\mu M$ . Una imagen característica de los ensayos de multiplex PCR se grafican en la Figura 15.

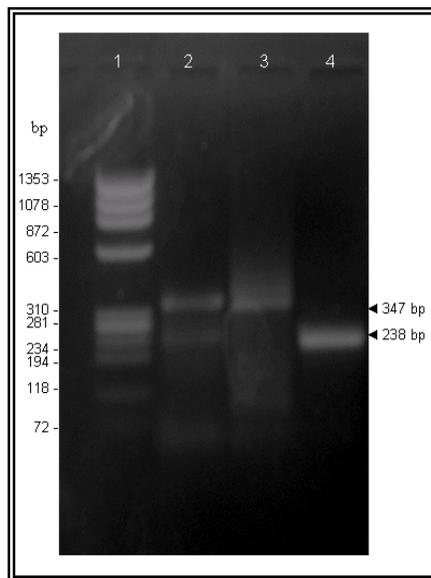


Figura 15: Multiplex-PCR: Para los gen N y F del hMPV  
Electroforesis en gel de agarosa al 2%. 1: Marcador de tamaño molecular (Bench Top  $\phi X174$  ADN/*Hae* III Markers, Promega®); 2: Muestra analizada por Multiplex PCR; 3: Fragmento de PCR del gen F de 347 pb, 4: Fragmento de PCR del gen N de 238 pb

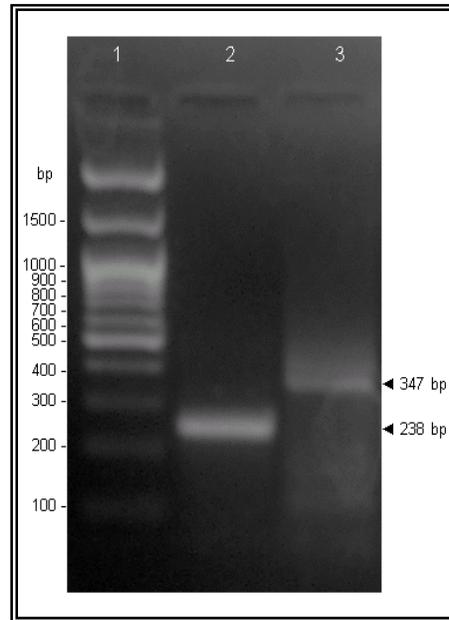
## **5- Detección de Metapneumovirus humano (hMPV) asociado a un caso de exacerbación de asma aguda bronquial severa**

Dado que recientemente se han publicado cuadros de exacerbación de asma asociados a la infección por hMPV (Schildgen y cols., 2004; Williams y cols., 2005), en este trabajo describimos el caso de un paciente, de 4 años y 6 meses, admitido en el Hospital de Niños de Santa Fe "Dr. Orlando Alassia", que tuvo que ser hospitalizado por un episodio agudo de asma bronquial con sospecha de una infección viral concomitante. El cuadro clínico mostró un cuadro de crisis asmática aguda, presentando fiebre, accesos de tos catarral y agitación. Al momento del ingreso hospitalario, el paciente presentó además, una radiografía mostrando atrapamiento aéreo e infiltrado intersticial, por lo cual se procedió a su internación que se prolongó por cuatro días. Durante este período se le suministraron corticoides, broncodilatadores y oxígeno. Debido a los síntomas clínicos que presentó el paciente, compatibles con una infección respiratoria viral concomitante, una muestra de aspirado nasofaríngeo fue obtenida al día siguiente de la admisión por el Servicio de Guardia del Hospital. Una alícuota de la muestra fue conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la purificación de ARN y el resto fue utilizado para la búsqueda inicial de virus respiratorio sincicial, adenovirus, virus influenza a y b y virus parainfluenza 1, 2 y 3 por inmunofluorescencia indirecta. Todos los ensayos para virus respiratorios dieron resultados negativos para los agentes virales analizados. Al mismo tiempo, la búsqueda del hMPV se realizó en otra alícuota del aspirado nasofaríngeo por RT-PCR, utilizando las condiciones descritas previamente, con lo cual se pudo poner en evidencia secuencias de los genes N y F del hMPV (Figura 16).

Estos resultados son similares a los reportados en un caso de exacerbación de un cuadro asmático debido a hMPV en un paciente pediátrico, en el cual se postula que, a semejanza de lo que ocurre con VSR, una infección por hMPV puede gatillar una enfermedad respiratoria crónica como el asma. Además, se ha reportado recientemente que la infección por hMPV juega un rol decisivo en las exacerbaciones de asma agudo en adultos, llevando a la hospitalización de los pacientes afectados (Schildgen y cols., 2004; Williams y cols., 2005)

En el hemisferio sur, aún cuando se ha descrito que entre los niños hospitalizados con diagnóstico de IRA, el porcentaje de detección de hMPV oscilaría entre el 5,4 % y el 17% (Galiano y cols., 2004), no se conocen datos acerca de la asociación de este virus con la exacerbación de casos de asma. En consecuencia, bajo

nuestro conocimiento, esta sería la primera descripción de la detección molecular de hMPV en nuestra región, asociada a un cuadro de crisis asmática.



**Figura 16:** Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de amplificación por RT-PCR de los genes N y F del hMPV. 1: Marcador de tamaño Molecular (Cien Marker, Promega®) 2 y 3 Muestra clínica (Aspirado nasofaríngeo) en estudio.

En relación a esto, la definición de la importancia local del hMPV como causa de distintos síndromes clínicos adquiriría fundamental importancia si se tiene en cuenta la hipótesis propuesta acerca de la existencia de diferentes subgrupos virales que podrían estar asociados a síndromes de variada severidad (Peret y cols, 2002; Stockton y cols, 2002; Peiris y cols, 2003). Así, la presencia e intensidad de la circulación local de distintos subgrupos, podrían determinar la importancia relativa del virus en distintos cuadros clínicos.

Finalmente, acordamos con otros autores en que la aplicación de procedimientos de análisis molecular por RT-PCR permitirá una estimación más aproximada de la prevalencia e incidencia de infecciones por hMPV, aportando a la vez información adicional en la evaluación de las manifestaciones clínicas de estas infecciones respiratorias virales. Por otra parte, la implementación en forma rutinaria de la detección del hMPV disminuiría los casos de IRA de origen desconocido, permitiendo así establecer en forma más acabada el papel que desempeñaría este virus en nuestro medio, facilitando la elección de las conductas terapéuticas más apropiadas, orientadas a las subpoblaciones susceptibles.



**Conclusiones**

## **Conclusiones**

Finalmente, podemos decir que en nuestros laboratorios hemos podido evaluar una estrategia de identificación molecular del hMPV, basada en ensayos de RT-PCR, RFLP y Multiplex PCR.

Con la aplicación de estas metodologías detectamos la presencia de este virus respiratorio en muestras de aspirados nasofaríngeos de pacientes pediátricos con cuadros clínicos compatibles con infección viral, con resultados negativos para el panel de virus respiratorios tradicionalmente estudiados.

En la población estudiada se pudo detectar la presencia del hMPV en el 4,2% de los pacientes. Este hallazgo concuerda con la literatura, donde se describe entre 4 y 17% de infección por hMPV en poblaciones similares.

Se pudieron clonar secuencias correspondientes a los genes N y F del hMPV a fin de contar con controles positivos de fácil propagación y mantención, para su posterior utilización en las reacciones de amplificación in vitro por PCR.

Además se ha podido asociar la infección por este agente viral con un cuadro de exacerbación de asma bronquial severa en un paciente pediátrico

Estos resultados reafirmarían la importancia de la investigación del hMPV como agente causal de IRA, sobre todo en los casos en los que no se logra identificar ninguno de los virus respiratorios tradicionalmente estudiados.

Actualmente, nuestros esfuerzos están dirigidos a aplicar el ensayo de Multiplex PCR (para los genes N y F del hMPV), para utilizarlo en un estudio de incidencia de este patógeno en cuadros infecciosos respiratorios desarrollados en nuestra región.



**Bibliografía**

**Bibliografía**

- Abara S. Metapneumovirus humano: Un nuevo agente en IRA alta y baja. *Neumol. Pediatr* **2006**.1 :11-13
- Alvarez R, Jones L, Seal B, Kapczynsky D, Tripp R. Serological cross-reactivity of the Metapneumovirus genus. *Virus Research*. **2004** 105 :67-73
- Barry-Murphy , K.; Setterquist S; Gray G; Elliott G; Reid S. Development of a novel immunoassay for the detection of human Metapneumovirus in clinical specimens. *Biotrin International.*, 93 The Rise, Mount Merrion, Co. Dublin, Ireland. 2006. [www.biotrin.com](http://www.biotrin.com)
- Biacchesi S, Skiadopoulos M, Boivin G, Hanson C, Murphy B, Collins, Buchholz, U. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology*. **2003**.315:1-9
- Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote S, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect. Dis.* **2002**.186:1330-4.
- Boivin, G; Abed, Y; Pelletier, G; Ruel, L; Moisan, D; Cote, S; Peret, T; Erdman, D; Anderson, L. Human Metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis.* **2003**. 9:634–640.
- Bosis S, Esposito A, Osterhaus E, Tremolati E, Begliatti C, Tagliabue F, Corti N, Principi H. Association between high nasopharyngeal viral load and disease severity in children with human metapneumovirus infection . *J Clin Virol* .**2008**. PMID: 18479963
- Bosis S, Esposito S, Niesters H, et al. mpact of human metapneumovirus in childhood: comparison with respiratory syncytial virus and influenza virus. *J Med Virol*. **2005**.75:101– 4
- Calvo J, Peinado M, Palomo A, Bellacasa J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. *Protocolos Clínicos SEIMC*.**2007**. (<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/clinicos/>).
- Cane P, van den Hoogen B, Chakrabarti S, Fegan C, Osterhaus A .Human Metapneumovirus in a haematopoietic stem cell transplant recipient with fatal lower respiratory tract disease. *Bone Marrow Transplantation*. **2003**.31:309-10
- Crowe J , Williams J. Immunology of viral respiratory tract infection in infancy..*Pediatr. Respir*.**2003**.4:112- 9
- Cuevas L, Ben Nasser W, Gurgel R, Greensill , Hart A. Human Metapneumovirus and Respiratory Sinsytial Virus in Brazil. *Emerg. Infect. Dis*.**2003**. 9:1626- 28
- Diaz –Rubio M , Espinós D. Tratado de Medicina Interna. Editorial Médica Panamericana. **1994**
- Ebihara T, Endo R, Ishiguro N, Nakayama T, Sawada H, Kikuta H. Early reinfection with human metapneumovirus in an infant. *J Clin Microbiol*.**2004**.42:5944-6

- Falsey A, Criddle M, Walsh E. Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse transcription polymerase chain reaction in adults with and without respiratory illness. *J Clin Virol.* **2005**.35:46-50.
- Falsey A, Erdman D, Anderson L, Walsh E. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis.* **2003**.187:785-90.
- Galiano M, Trento A, Ver L, Carballal G, Videla C. Genetic heterogeneity of G and F protein genes from Argentinean human metapneumovirus strains. *Virology.* **2006**.78:631-7.
- Galiano M, Videla C, Sánchez Puch S, Martínez A, Echavarría M, Carballal G. Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina. *J Med Virol.* **2004**.72: 299-303
- García García M., Calvo Rey C, Martín del Valle F, López Huertas M, Casas Flecha J, Díaz-Delgado R, Pérez-Breña P. Infecciones respiratorias por Metapneumovirus en lactantes hospitalizados. *An Pediatr (Barc).* **2004**.61:213-8
- Greensill J, McNamara P, Dove W, Flanagan B, Smyth R, Hart A. Human Metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis.* **2003**. 9:372-375
- Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone, V. Novel Human Metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis* **2006**.12:147-50
- Jartti, T; Van den Hoogen, B; Garofalo R; Osterhaus A; Ruuskanen, O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. **2002**.*The Lancet* .360:1393-4
- Jofré L, Luchsinger V, Zepeda G, Rojas A, Muñoz A. Apnea como forma de presentación de una infección por metapneumovirus humano. *Rev Chil Infect* .**2007**.24:313-8
- Kahn J. Epidemiology of human Metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev.* **2006**. 19:546–57
- Kaida A, Kubo H, Goto K, Shiomi M, Kohdera U, Iritani N. Co-infection of human metapneumovirus with adenovirus or respiratory syncytial virus among children in Japan. *Microbiol Immunol.* **2007**.51:679-83
- Laham F, Israele V, Casellas J, Garcia A, Lac Prugent C, Hoffman, S Hauer D, Thumar B, Name M, Pascual Ataratutto N, Ishida M., Balduzzi M, Maccarone M, Jackli S, Passarino, Gaivronsky R, Karron R, Polack N, Polack F. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human Metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *J Infect Dis.* **2004**.189:47–56
- Lazar I, Weibel C, Dziura J, et al. Human Metapneumovirus and severity of respiratory syncytial virus disease. *Emerg Infect Dis.* **2004**, 10:1318–20.
- Luchsinger V, Escobar C, Avendaño L. Detección de metapneumovirus humano en niños hospitalizados por infección respiratoria aguda baja en Santiago Chile. *Rev Méd Chile.* **2005**.133:1059-64

- Mackay I, Jacob K, Woolhouse D, Waller K, Syrmiss M, Whiley D, Siebert D, Nissen M, Sloots T. Molecular assays for detection of human Metapneumovirus . J Clin. Microbiol. **2003**.41:100–5
- Maertzdorf J, Wang C, Brown J, Quinto J, Chu M, de Graaf M, et al. Realtime reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known for genetic lineages. J Clin Microbiol. **2004**. 42: 981-6.
- Mallimaci M, Espul C, Sijvarger C, Martinez N, Lazbal M, Cuello H, Cadario M, Matson D, Savy V. Infección respiratoria aguda por Metapneumovirus humano en Ushuaia, Argentina: descripción del primer caso. Arch. Arg. Pediatr .**2006**.104:150-2
- Martin J ,Siddiqui S, Hassan M.Immune responses to viral infections; relevance for asma. Paediatr Respir Rev.**2006**.7:125-7
- Martinello R, Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry M, Kahn J .Human metapneumovirus and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. J Infect.**2006**. 53:248-54
- Mc Adam AJ, Hasenbein ME, Feldman HA, et al. Human metapneumovirus in children tested at a tertiary-care hospital. J Infect Dis. **2004**.190:20–6.
- Mc Intosh K, Mc Adam A. Human Metapneumovirus: an important new respiratory virus. N Engl J Med.**2004**.350:431-3
- Mirazo, S; Ruchansky, D; Blanc, A; Arbiza, J. Serologic evidence of human metapneumovirus circulation in Uruguay. **2005**. Mem Inst Oswaldo Cruz.100: 715-8.
- Mullins J, Erdman D, Weinberg G, et al.Human Metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. Emerg Infect Dis. **2004**.10:700-5
- Navarro-Marí J, Pérez-Ruiz M. Virus respiratorios: viejos y nuevos virus. Revisión de métodos diagnósticos Enferm Infecc Microbiol. Clin. **2007**.25:60-5
- Noyola D, Alpuche-Solis A, Areli Herrera-Díaz R,Soria-Guerra, Sanchez-Alvarado J, López Revilla R. Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics. J Med Microbiol.**2005**.54:969–4
- Peiris J, Tang W, Chan K, Khong P, Guang Y, Lau Y, et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. Emerg Infect Dis. **2003**.9: 628-33
- Percivalle E, Sarasini A, Visai L, Revello M, Gerna G.Rapid Detection of human Metapneumovirus strains in nasopharyngeal aspirates and shell vial cultures by monoclonal antibodies.J Clin. Microbiol.**2005**.43:3443-6
- Peret T, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus A, et al. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. J Infect Dis **2002**.185:1660-3.
- Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM, Morton JR. Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. J Infect Dis. **2003**.187: 1314-8.

- Rohde G, Borg I, Arinir U, Kronsbein J, Rausse R, Bauer T, Bufe A, Schultze-Werninghaus. Relevance of human metapneumovirus in exacerbations of COPD. *Respiratory Research*. **2005**. 6:150:1-5
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. En: C. Nolan, ed. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; **1989**.
- Schildgen O, Geikowskia T, Glatzela T, Simonb A, Wilkesmannb A, Roggendorf M. New variant of the human metapneumovirus associated with an acute and severe exacerbation of asthma bronchiale. *J Clin Virol* .**2004**.31: 283-8
- Schildgen O, Glatzel T, Geikowski T, Scheibner B, Matz B, Bindl L, Born M, Viazov S, Wilkesmann A, Knöpfle G, Roggendorf M, Simon. A Human Metapneumovirus ARN in Encephalitis Patient. *Emerg Infect Dis*.**2005**.11: 467-470
- Stockton J, Stephenson I, Fleming D, Zambon M. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis*. **2002**.8: 897-901.
- Ulloa-Gutierrez, R. Metapneumovirus humano un nuevo agente en el diagnóstico .*An Pediatr (Barc)*. 2003.59:129-30
- Van den Hoogen B, Bestebroer T, Osterhaus A, Fouchier R. Analysis of the genomic sequence of a human Metapneumovirus. *Virol*.**2002**. 295:119–32
- Van den Hoogen B, de Jong J, Groen J, Kuiken T, Degroot R, Fouchier R, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*. **2001**; 7: 719-24.
- Van den Hoogen B, Osterhaus A, Fouchier R. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *J Pediatr Infect Dis*.**2004**. 23: S25-S32.
- Van den Hoogen B, van Doornum G, Fockens J, Cornelissen J, Beyer W, de Groot R, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis*. **2003**.188: 1571-7.
- Williams J, Crowe J, Enriquez R, Minton P, Peebles R, Hamilton R, et al. Human metapneumovirus infection plays an etiologic role in acute asthma exacerbations requiring hospitalization in adults. *J Infect Dis* **2005**<sup>a</sup>.192:1149-53.
- Williams J, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE. Human Metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med*. **2004**.350:443-50
- Williams J, Tollefson S, Nair S, Chinmaitree. Association of human metapneumovirus with acute otitis media. *J. Pediatric Otorhinolaryngology*.**2006**. 70:1189-93
- Williams J, Martino R, Rabella N, Otegui M, Parody R, Heck J, Crowe J. Prospective study comparing human Metapneumovirus with other respiratory viruses in adult as with hematologic malignancies and respiratory tract infections. *J Infect. Dis*.**2005**<sup>b</sup>.192:1261-65

- Wyde P, Chetty S, Jewell A, Schoonover S, Piedra P. Development of a cotton rat-human metapneumovirus(hMPV) model for identifying and evaluating potential hMPV antivirals and vaccines. *Antiviral Research*. **2005**. 66:57-66
- Zalazar F, Baroni M, Amato D, Gianni R, Mayoral C, Ochoteco C, Tedeschi F. Modified silver staining for ARN and ADN in agarose gels. **2001**. *Analytical Biochemistry*. 291:299–300



**Apéndice**

**Medios de cultivos líquidos**

LB (Luria-Bertani)  
 Bacto-triptona 10 g  
 Extracto de Levadura 5 g  
 NaCl 10 g  
 Ajustar a pH 7,5 con NaOH 5N ,aprox. 200 µl  
 Llevar a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada.

**Medios de cultivos sólidos****LB-Agar**

Para placas de 90 mm de diámetro se utilizó 25 ml de medio LB. A la fórmula base se adicionó 1,5g de Bacto-agar .Luego se procedió al autoclavado.

**LB-Agar con ampicilina/IPTG/X-gal:**

Para placas de 90 mm de diámetro se utilizaron 25 ml de medio LB con la adición de 25 µl de ampicilina para una concentración final de 100µg/ml, 100 µl de 100 mM de IPTG y 20 µl de 50 mg/ml de X-gal.

**Antibióticos:**

ampicilina

Solución Stock: 10 mg/ml de solución de sal sódica de ampicilina en agua desionizada.  
 Esterilizar por filtración a través de filtros de 0,22 µm. Conservar a a -20 °C.  
 Solución de Trabajo: 50 – 100 µg/ml

**Isopropil-1-tio-β-D-galactosido (IPTG)**

IPTG 0,2383 g  
 H<sub>2</sub>O desionizada. csp. 10 ml  
 Concentración final: 0,1 M

**5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-gal)**

X-gal 20 mg  
 N,N-dimetilformamida 1 ml  
 Guardar a -20°C. Proteger de la luz .Concentración final: 2%

**Solución de Transformación**

CaCl<sub>2</sub> 75 mM, glucosa 0,5%, MOPS 10 mM, pH 6,5

CaCl<sub>2</sub> (PM 110,99) 0,832 g  
 Glucosa (PM 180,16) 0,500 g  
 MOPNa (PM 231,2) 0,231 g  
 HCl conc. csp llevar a pH 6.5 aprox. 10 gotas  
 H<sub>2</sub>O desion. csp 100 ml.  
 Esterilizar por filtración con filtro de 0.2 µ. Conservar a 4°C.

**Reactivos para la minipreparación de ADN plasmidico**

**Solución I:** Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH: 8, EDTA 10 mM pH: 8

Glucosa 0,450 g

Tris-HCl 1 M pH: 8 1,25 ml

Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 M pH: 8 1,00 ml

H<sub>2</sub>O desionizada csp 50 ml

Esterilizar por filtración con filtro de 0,2 µm. Conservar a 4°C.

**Solución II:** SDS 1%, NaOH 0,2 N

SDS 10% 100 µl

NaOH 10 N 20 µl

H<sub>2</sub>O desionizada 880 µl

Preparar en el momento de usar.

**Solución III:** NaAc 3M pH: 4,8

NaAc 2,04 g

H<sub>2</sub>O desionizada c.s.p. 50 ml.

Ajustar a pH: 4,8 con ácido acético, autoclavar y guardar a T.A.

**Buffers de electroforesis**

Solución de trabajo (1x): Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M

Solución concentrada stock (5x)

Tris base 54,4 g

Ácido bórico 27,5g

EDTA 0.5 M pH:8.00 20 ml

H<sub>2</sub>O desionizada c.s.p. 1000 ml

**Soluciones varias**

Acetato de sodio 3 M, pH 4,8

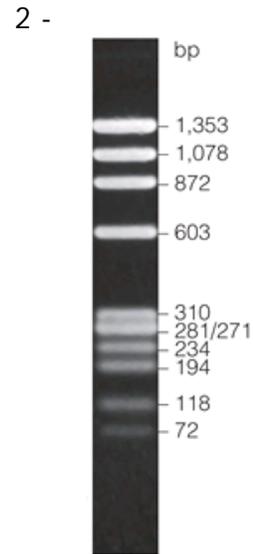
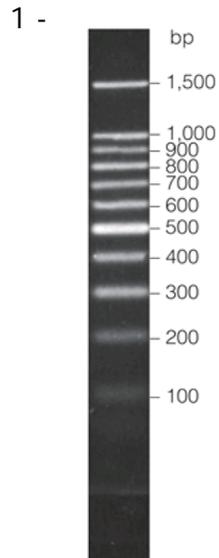
NaAc. 3 H<sub>2</sub>O

Ácido acético glacial c.s.p.

H<sub>2</sub>O desionizada c.s.p.

Esterilizar en autoclave 20 min. A 1 atm de presión (kg/cm<sup>3</sup>)

### Marcadores de Tamaño Molecular



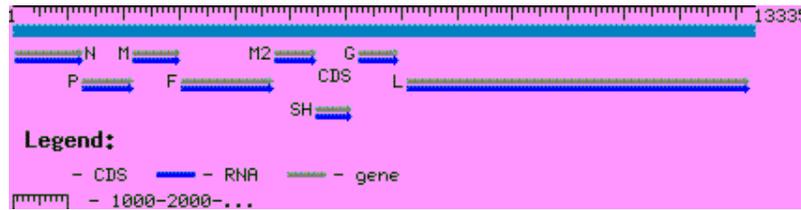
1 - Cien Marker, Promega®

2 - Bench Top  $\phi$ X174 ADN/*Hae* III Markers, Promega®



**Anexo I**

1- Genoma del hMPV y zona de apareo de primers usados en la experiencia



[AF371337](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Human metapneumovirus (hMPV) – (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank )

LOCUS AF371337 13350 bp ARN linear VRL 15-APR-2002

DEFINITION Human metapneumovirus isolate 00-1, complete genome.

VERSION AF371337.2 GI:20150834

SOURCE Human metapneumovirus

ORGANISM [Human metapneumovirus](#), Viruses; ssARN negative-strand viruses; Mononegavirales; Paramyxoviridae; Pneumovirinae; Metapneumovirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 13350)

AUTHORS van den Hoogen, B.G., et al. TITLE: A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. JOURNAL : Nat. Med. 7 (6), 719-724 (2001)

ORIGIN

```

1  gtataaatta gattccaaaa aaatatggga caagtgaaaa tgtctcttca agggattcac
61  ctgagtgatt tatcatatac gcatgctata ttaaaagagt ctcagtacac aataaaaaga
121 gatgtgggta caacaactgc agtgacaccc tcatcattgc aacaagaaat aacctgttg
181 tgtggagaaa ttctgtatgc taaacatgct gactacaaat atgctgcaga aataggaata
241 caatatatta gcacagcttt aggatcagag agagtgcagc agattctgag gaactcaggc
301 agtgaagtcc aagtggctct aaccagaacg tactctctgg ggaaaattaa aaacaataaa
361 ggagaagatt tacagatggt agacatacac ggggtagaga agagctgggt agaagagata
421 gacaaagaag caaggaaaac aatggcaacc ttgcttaagg aatcatcagg taatatccca
481 caaaatcaga ggcctcagc accagacaca ccataatct tattatgtgt aggtgcctta
541 atattcacta aactagcatc aaccatagaa gtgggactag agaccacagt cagaagggct
601 aaccgtgtac taagtgatgc actcaagaga tacctagaa tggacatacc aaagattgcc
661 agatccttct atgacttatt tgaacaaaaa gtgtatcaca gaagtttgtt cattgagtat
721 ggcaaagcat taggctcatc atctacaggc agcaaagcag aaagtctatt tgtaatata
781 ttoatgcaag cttatggggc cgggtcaaaca atgctaagggt ggggggtoat tgccaggtca
841 tccaacaata taatgttagg acatgtatcc gtccaagctg agttaaaca ggtcacagaa
901 gtctatgact tgggtgcgaga aatgggacct gaatctggac ttctacattt aaggcaaaagc
961 caaaaagctg gactgttate actagccaac tgcocaaact ttgcaagbgt tgttctcgga
1021 aatgcctcag gcttaggcat aatcggtatg tatcgaggga gactacaaa cacagaatta
1081 ttttcagcag ctgaaagtta tgccaaaagt ttgaaagaaa gcaataaaat aaatttctct
1141 tcattaggac ttacagatga agagaaagag gctgcagaaac atttcttaa tgtagtgac
    
```

Gen N

238 pb

1201 gacagtcaaa atgattatga gtaattaaaa aagtgggaca agtcaaaatg tcatttcctg  
 1261 aaggaaaaga tattcttttc atgggtaatg aagcagcaa attagcagaa gctttccaga  
 1321 aatcattaag aaaaccaggt cataaaagat ctcaatctat tataggagaa aaagtgaata  
 1381 ctgtatcaga aacattggaa ttacctacta tcagtagacc tgcaaaacca accataccgt  
 1441 cagaaccaa gttagcatgg acagataaag gtggggcaac caaaactgaa ataaagcaag  
 1501 caatcaaagt catggatccc attgaagaag aagagtctac cgagaagaag gtgctaccct  
 1561 ccagtgatgg gaaaaccct gcagaaaaga aactgaaacc atcaactaac accaaaaaga  
 1621 aggtttcatt tacaccaa gaaccagga aatatacaa gttggaaaa gatgctctag  
 1681 attgctctc agataatgaa gaagaagatg cagaatcttc aatcttaacc tttgaagaaa  
 1741 gagatacttc atcattaagc attgaggcca gattggaatc aatagaggag aaattaagca  
 1801 tgatattagg gctattaaga acactcaaca ttgctacagc aggaccaca gcagcaagag  
 1861 atgggatcag agatgcaatg attggcgtaa gagaggaatt aatagcagac ataataaagg  
 ←\*\*\*\*\*→  
 2761 attaattatg atcatgacta tgaacaatcc caaaggcata ttcaaaaagc ttggagctgg  
 2821 gactcaagtc atagtagaac taggagcata tgtccaggct gaaagcataa gcaaaatag  
 2881 caagacttgg agccatcaag ggacaagata tgtcttgaag tccagataac aaccaagcac  
 2941 cttggccaag agtactaac cctatctcat agatcataa gtcaccattc tagttatata  
 3001 aaaatcaagt tagaacaaga attaaatcaa tcaagaacgg gacaaataa **aatgtcttgg**  
 3061 **aaagtgggta tcattttttc attgttaata acacctcaac acgggtctta agagagctac**  
 3121 **ttagaagagt catgtagcac tataactgaa ggatatctca gtgttctgag gacaggttgg**  
 3181 **tacaccaatg tttttact ggaggtaggc gatgtagaga accttacatg tgccgatgga**  
 3241 **cccagcttaa taaaaacaga attagacctg accaaaagtg cactaagaga gctcagaaca**  
 3301 **gtttctgctg atcaactggc aagagag**gag caaattgaaa atcccagaca** atctagattc**  
 3361 **gttctaggag caatagcact cgggtgttga actgcagctg cagttacagc aggtgttgca**  
 3421 **attgcaaaa ccatccggct tgaaagtgaa gtaacagcaa ttaagaatgc cctcaaaaag**  
 3481 **accaatgaag cagtatctac attggggaat ggagttctg tgttggcaac tgcagtgaga**  
 3541 **gagctgaaag attttgtgag caagaatcta acacgtgcaa tcaacaaaa caagtgcgac**  
 3601 **attgctgacc tgaaaatggc cgttagcttc agtcaattca acagaaggtt cctaaatggt**  
 3661 **gtgcggcaat tttc**agacaa cgctggaata acaccagcaa tatctttgga cttaatgaca  
 3721 gatgetgaac tagccagagc tgtttccaac atgccaacat ctgcaggaca aataaaaactg  
 3781 atgttgagaa accgtgcaat ggtaagaaga aaagggttcg gattcctgat aggagtttac  
 3841 gga\*\*\*\*\*  
 13261 tagttaatta aaaactaaa atcaaaagtt agaaactaac aactgtcatt aagtttatta  
 13321 aaaataagaa attataattg gatgtatagc

347 pb {

Gen F



2- Análisis mediante el uso de Programas Bioinformáticos (Blast 2 sequences 2.2.14 (Align two sequences y Blast n disponibles en National Center for Biotechnology Information) para determinar en el genoma del hMPV la zona de apareo de *primers* usados en la experiencia

```

Score = 43.0 bits (22), Expect = 0.040
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 21      GAACAACACTTGCAAAGTTGGG  42
             |||
Sbjct 1015    GAACAACACTTGCAAAGTTGGG  994

Score = 35.3 bits (18), Expect = 8.3
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1       TATATTCATGCAAGCTTA  18
             |||
Sbjct 777     TATATTCATGCAAGCTTA  794
    
```

Análisis de secuencia para los primers que flanquean la región del gen N

Análisis de secuencia para los primers que flanquean la región del gen F

```

Score = 44.9 bits (23), Expect = 0.013
Identities = 23/23 (100%), Gaps = 0/23 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1       GAGCAAATTGAAAATCCCAGACA  23
             |||
Sbjct 3328     GAGCAAATTGAAAATCCCAGACA  3350

Score = 44.9 bits (23), Expect = 0.013
Identities = 23/23 (100%), Gaps = 0/23 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 24      GAAAATTGCCGCACAACATTTAG  46
             |||
Sbjct 3674    GAAAATTGCCGCACAACATTTAG  3652
    
```

## **Anexo II**

Publicaciones, trabajos presentados y otras actividades realizadas en el transcurso de este trabajo

### **1- Publicaciones**

*Metapneumovirus humano (hMPV) asociado con exacerbación de asma aguda bronquial severa.*  
López MA; Kuszniez GF, Imaz MS; Cociglio R, Tedeschi FA, Zalazar FE.  
Revista Argentina de Microbiología (2006).38:140-142

*Identificación molecular de Metapneumovirus Humano (hMPV) por PCR-RFLP*  
López MA; Kuszniez GF, Imaz MS; Cociglio R, Tedeschi FA, Zalazar FE.  
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana (2007) 41 (2):90,P153

### **2- Asistencia Congresos con Presentación e Trabajos**

*Identificación molecular de Metapneumovirus Humano (hMPV) por PCR-RFLP*  
López MA; Kuszniez GF, Imaz MS; Cociglio R, Tedeschi FA, Zalazar FE.  
Congreso Nacional Bioquímico CUBRA IX.  
Carlos Paz. Córdoba. Septiembre 2007.