

# Diagnóstico molecular para la detección de metapneumovirus humano a partir de aislados virales en pacientes pediátricos con infección respiratoria aguda

*Molecular diagnosis for the detection of human metapneumovirus from viral isolates in pediatric patients with acute respiratory infection*

Guadalupe Cerezo Lira,\* Karla Zárate Conde,\* Sergio Alpuche-Lazcano,\*  
Carlos Cabello,\* Patricia Tato,\*<sup>†</sup> Rocío Tirado\*

\* Laboratorio de Biología de Microorganismos. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Dirección para correspondencia: Guadalupe Cerezo Lira  
Laboratorio Biología de Citoesqueleto. Departamento de Microbiología y Parasitología, Edificio A 2° piso, Circuito interior S/N Facultad de Medicina, UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México, 04510.

Recibido: 12 de agosto de 2015.  
Aceptado: 6 de abril de 2016.

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:  
<http://www.medigraphic.com/rid>

## Palabras clave:

Metapneumovirus humano, infección respiratoria aguda severa, aislado viral, fusogenicidad, variantes virales.

## Key words:

Human metapneumovirus, acute respiratory infection, viral isolate, fusogenic, viral variants.

## Resumen

Actualmente no se conoce en México la epidemiología de metapneumovirus humano, por lo que se implementó una metodología molecular para detectar y diagnosticar metapneumovirus humano. A partir de un total de 118 pacientes en edad pediátrica con infección respiratoria aguda, se tomaron muestras clínicas, de las cuales se obtuvieron aislados virales que se clasificaron en fusogénicos y no fusogénicos en función de su capacidad de inducir o no la formación de sincitios. Posteriormente, los aislados virales se sometieron a detección de metapneumovirus humano por inmunofluorescencia directa y se analizaron por RT-PCR con oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes N (nucleocápside) y/o L (RNA polimerasa viral). Los resultados obtenidos demostraron que mediante RT-PCR con nuestro diseño de oligonucleótidos identificamos como metapneumovirus humano positivos el 100% de los aislados virales metapneumovirus humano positivos por inmunofluorescencia directa (42/118). Cabe destacar que con esta metodología se detectaron siete muestras hRSV positivas mediante RT-PCR a partir del grupo de 17 muestras metapneumovirus humano negativas por inmunofluorescencia directa, lo cual pone de manifiesto la mayor sensibilidad de nuestra metodología.

## Abstract

*In Mexico the molecular epidemiology and viral etiology of acute respiratory infections are very limited; there are no data about the frequency and circulation patterns of different seasonal human Metapneumovirus. Therefore, we design a molecular technique to detect and identify human Metapneumovirus. A total of 118 clinical samples from pediatric patients with low respiratory tract infections were isolated and classified by their fusogenic activity as fusogenic and non fusogenic isolates. Moreover, fusogenic and non fusogenic isolates were human Metapneumovirus confirmed by direct immunofluorescence. The human metapneumovirus positive isolates (42/118) were confirmed by RT-PCR using oligonucleotides designed in our laboratory to amplify the viral genes N (Nucleocapsid) and/or L (RNA polymerase). We demonstrated by RT-PCR that human Metapneumovirus infection was detected in 100% of the viral isolates previously confirmed as positive by direct immunofluorescence assay (42/118). Alternatively, from the negative isolates by direct immunofluorescence (17), we were able to identify seven isolates as human respiratory syncytial virus using our designed RT-PCR.*

## Introducción

El hMPV es considerado actualmente un virus emergente;<sup>1-3</sup> se clasifica con base en la secuencia del gen de la glicoproteína de fusión o F<sup>4,5</sup> en dos grupos, A y B, con dos subgrupos cada uno:<sup>4</sup> A1, A2, B1 y B2. El análisis filogenético de los subgrupos de hMPV indica que la dinámica epidemiológica de este virus es compleja.<sup>5</sup> Reportes recientes indican que a nivel mundial se presenta la cocirculación de los cuatro genotipos en brotes anuales, variando su prevalencia cada año.<sup>5-9</sup> Recientemente se reportó que hay una alta prevalencia de hMPV en pacientes en edad pediátrica hospitalizados con bronconeumonía, lo que demuestra su importancia como agente etiológico de infecciones respiratorias severas (5-15% de los casos).<sup>5-9</sup> En México no se conocen la frecuencia ni las características epidemiológicas de la infección por hMPV y sus variantes virales, por lo que el objetivo de este trabajo fue implementar un método de detección molecular altamente sensible y específico para hMPV en aislados virales a partir de muestras clínicas, el cual permitió la confirmación y tipificación de hMPV y sus variantes.

## Pacientes y métodos

Durante los años 2004, 2006 y 2008-2011 se conformó para un estudio piloto descriptivo una cohorte de 118 muestras obtenidas por aspirado y/o exudado faríngeo o nasofaríngeo de pacientes pediátricos de cero a 11 años y mayores de 12 años con enfermedad respiratoria severa. Las muestras biológicas proceden del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. A cada muestra se le realizaron tres pases ciegos en monocapas semiconfluentes de células HEp-2 (células epiteliales de carcinoma de laringe de origen humano ATCC CCL-23) propagadas en placas de 24 pozos en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Invitrogen) con 5% de suero fetal bovino (SFB; Biowest) en presencia de antibióticos 100x (penicilina 10,000 U/mL, estreptomycin 10,000 µg/mL; fungizona 25 µg/mL GIBCO). Para llevar a cabo el primer pase, se realizó la infección de las células con 150 µL de la muestra y se dejó adsorber dos horas en atmósfera húmeda 5% de CO<sub>2</sub>; posteriormente, se retiró el inóculo y se colocó medio DMEM incompleto fresco. Se incubaron por una semana o hasta observar efecto citopático (formación de sincitios) para realizar la colecta de los sobrenadantes denominados «aislados virales».

En el segundo y tercer pase, se realizó la infección de las células con 150 µL del aislado correspondiente y se incubaron hasta por una semana para realizar la colecta de los aislados virales. Cada muestra y sus aislados (tres pases) correspondientes se preservaron a -70 °C hasta su procesamiento. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM, y los representantes legales de los pacientes otorgaron un consentimiento informado para la participación de los niños en este estudio.

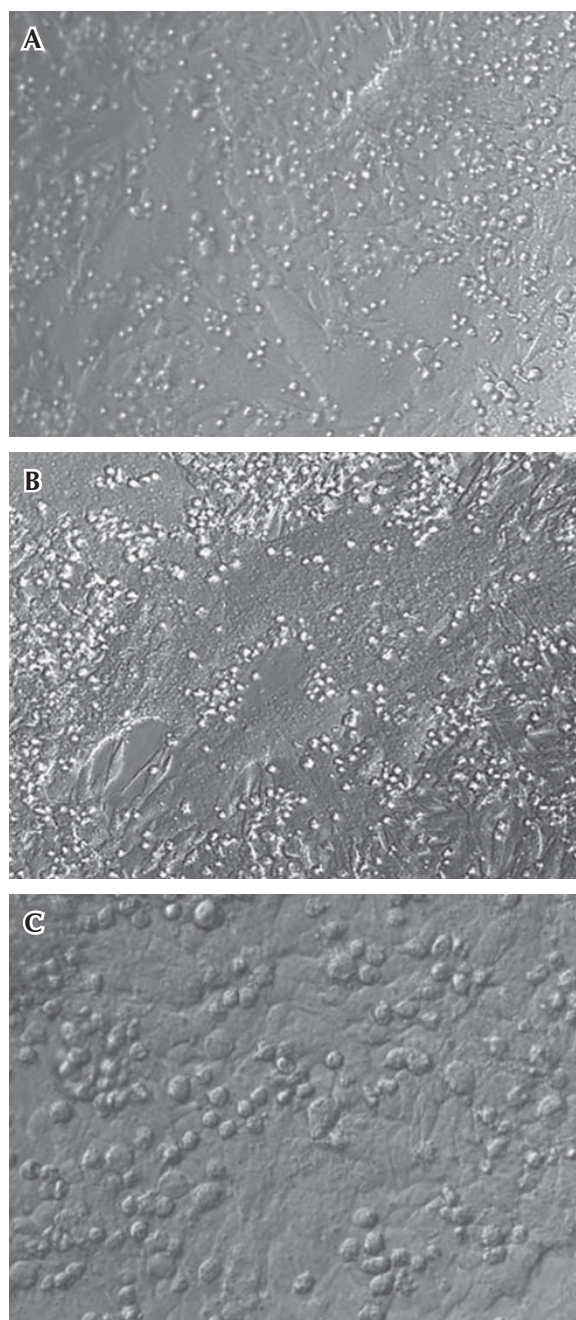
En el caso de hMPV, no existe una cepa comercial que pueda ser utilizada como referencia; por ello, para este estudio se estableció un control de hMPV positivo, para lo cual se seleccionaron dos muestras clínicas positivas por IFD, una representativa de fusogenicidad (MEX3670Fus) con un título viral de 3.43 x 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL y otra no fusogénica (MEX5286nFus) (*Figura 1*); no se determinó el título viral a los aislados virales.

Para favorecer la actividad fusogénica del virus, las muestras clínicas que durante la infección no mostraron efecto citopático se trataron posteriormente con tripsina TPCK (solución de tripsina-quimiotripsina en presencia del inhibidor de quimiotripsina fenilalanilclorometilcetona-PCK; Sigma) a una concentración final de 0.2 µg/mL en DMEM, sin SFB. El control positivo fusogénico, así como el no fusogénico, se confirmaron para hMPV por IFD con un anticuerpo monoclonal anti-hMPV (Imagen™). Las muestras clínicas se analizaron en paralelo por IFD y compararon con los controles positivos de hMPV.

La confirmación de hMPV en las muestras clínicas y controles positivos se realizó por RT-PCR con oligonucleótidos (diseño propio) para la amplificación de los genes N (sentido: 5' CAACAGCAGTGACACCCTC3' y antisentido 3' ACTCATACCGTTTCGTAA5', tamaño del fragmento: 599 pb) y L (sentido 5' CAACCAGGAA-AACAGCGACA 3' y antisentido 3' GCCATAACTTCC-TACCACAG 5', tamaño del fragmento 447 pb).

Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa Primer 3 Plus; el diseño se basó en la secuencia consenso construida a partir de secuencias completas de aislados virales reportados en Genbank de los cuatro subtipos: A1 (KC588902.1), A2 (FJ168779.1), B1 (AY525843.1) y B2 (FJ168778.1) de hMPV. Los alineamientos se llevaron a cabo con el programa Clustal Omega (EMBL-EBI).

De igual manera, se examinó la formación de dímeros o estructuras secundarias y alineamientos mediante BLAST con la base de datos de secuencias nucleotídicas de NCBI para descartar alineamientos con genes de otros organismos o regiones diferentes de hMPV.



**Figura 1.** Actividad fusogénica. El aislamiento viral permitió clasificar las muestras en tres grupos. **A.** Imagen representativa del primer grupo, que incluye las muestras con actividad fusogénica espontánea. **B.** Imagen representativa del segundo grupo; incluye las muestras que al cabo de tres pases no presentaron ECP y se trataron con TPCK. **C.** Imagen representativa del tercer grupo; corresponde a aquellas muestras que no presentaron fusogenicidad aun después del tratamiento con TPCK.

Se seleccionaron los genes N y L porque están altamente conservados entre los grupos y subgrupos de hMPV. De acuerdo con lo reportado en la literatura, de todos los genes de hMPV, el gen N es el que presenta el mayor grado de conservación tanto en secuencia de nucleótidos como de aminoácidos (91.2% y 98.4%, respectivamente).<sup>10-12</sup> Para el caso del gen L, el porcentaje de homología de secuencias entre los grupos es de 95-96%.<sup>10-12</sup> Es importante señalar que en el laboratorio también se estableció el ensayo de RT-PCR para la identificación de hRSV utilizando oligonucleótidos específicos (diseño propio) para los genes N (nucleocápside), F (fusión) y G (unión), y para el caso de hPIV2, para el gen HN (hemaglutinina-neuraminidasa). Las condiciones y resultados no se muestran.

La extracción de RNA total de los aislados virales, así como de los controles positivos fusogénico y no fusogénico, se realizó a partir de células HEp-2 infectadas con 150  $\mu$ L de cada aislado viral; el control negativo correspondió a células HEp-2 sin infectar. La extracción se hizo con TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. El RNA total obtenido se resuspendió en 30  $\mu$ L de agua DEPC (dietilpirocarbonato) y se cuantificó por espectrofotometría. A partir de una concentración de 3  $\mu$ g de RNA total, se llevó a cabo la síntesis de los DNA complementarios (cDNA) por transcripción reversa, para lo cual se utilizó 1  $\mu$ L de RT (RevertAid H Minus Reverse Transcriptase; Fermentas 10,000 U). La reacción de retrotranscripción se realizó con 1  $\mu$ L de oligo-dT (ThermoScientific 100  $\mu$ M) en un volumen final de 20  $\mu$ L. La síntesis de cDNA con oligo-dT tiene como ventaja la producción del cDNA a partir del mRNA total; por lo tanto, permite recuperar la mayor concentración de transcritos.<sup>13,14</sup> Las reacciones de PCR de punto final (50  $\mu$ L) se realizaron con 10  $\mu$ g/mL de concentración final por cada oligonucleótido y 0.2  $\mu$ L de Taq polimerasa (MyTaq DNA polymerase 2500 U; Bioline), y de conformidad con el siguiente perfil térmico: gen N: 95  $^{\circ}$ C, 10 minutos (1X); 95  $^{\circ}$ C, 55 segundos; 60  $^{\circ}$ C, 60 segundos; 72  $^{\circ}$ C, 55 segundos (35X); 72  $^{\circ}$ C, 10 minutos (1X); gen L: 95  $^{\circ}$ C, 10 minutos (1X); 95  $^{\circ}$ C, 55 segundos; 66  $^{\circ}$ C, 60 segundos; 72  $^{\circ}$ C, 55 segundos (35X); 72  $^{\circ}$ C, 10 minutos (1X). Los productos de amplificación se observaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes se visualizaron, fotodocumentaron y analizaron con el *software* Quantity One (BioRad).

## Resultados

El estudio de cohorte fue un estudio piloto descriptivo que consistió en 118 muestras de individuos con

infección respiratoria aguda. El total de muestras se dividió por grupo etario en tres subcohortes: pacientes pediátricos de cero a 11 años (52.54% n = 62), mayores de 12 años (8.47% n = 10), y la tercera no se pudo clasificar correctamente porque no se indicó la edad de los sujetos, sólo se reportaron como enfermos en edad pediátrica (38.98% n = 46).

El aislamiento viral permitió clasificar las muestras en tres grupos, el primero incluye las muestras con actividad fusogénica espontánea (19.49% n = 23), la actividad fusogénica se logró después de tres pases ciegos. Las muestras que al cabo de tres pases no presentaron efecto citopático (ECP) se trataron con TPCK para inducir la actividad fusogénica, y aquellas que presentaron ECP inducido conformaron el segundo grupo (16.94% n = 20). Finalmente, el tercer grupo correspondió a aquellas muestras que no presentaron fusogenicidad aun después del tratamiento con TPCK (68.64% n = 75) (Figura 2).

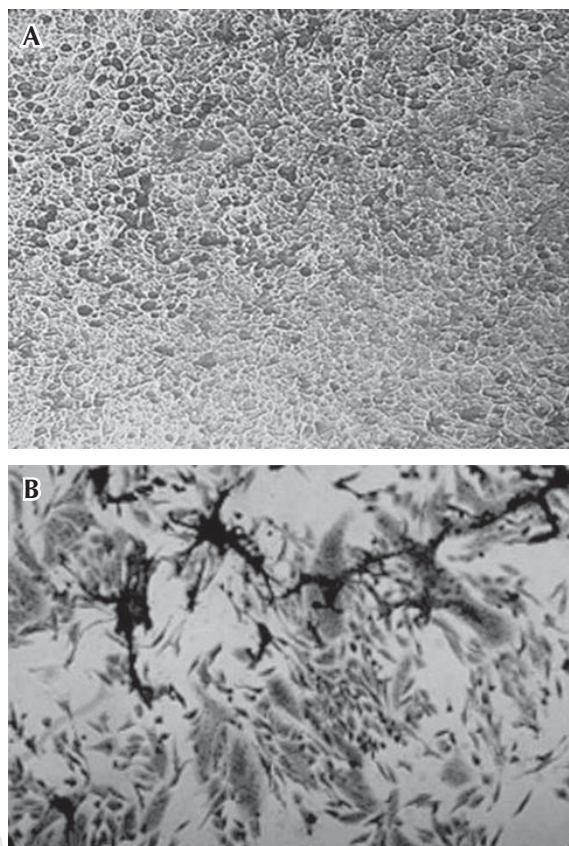
La presencia de hMPV se determinó por IFD en cada grupo de muestras. Los resultados obtenidos confirmaron que 18 (15.25%) de 118 muestras fueron positivas para hMPV. También se pudo detectar la presencia del virus sincitial respiratorio humano (hRSV) en 59 muestras (50%) y se identificaron 24 (20.33%) muestras que presentaban coinfección de hMPV y hRSV. 17 muestras fueron negativas a los virus estudiados. Todos los ensayos realizados para la tipificación por IFD de las muestras clínicas incluyeron los controles hMPV positivos.

De las 42 muestras positivas para hMPV por IFD, 11 (26.2%) presentaron fusogenicidad inducida, nueve (21.42%) fusogenicidad espontánea y 22 (52.38%) se clasificaron como no fusogénicas (Figura 3).

En condiciones previamente estandarizadas y utilizando los controles positivos (MEX3670Fus y MEX5286nFus) para amplificar los genes N y L, se llevó a cabo el ensayo de RT-PCR de punto final para la confirmación de la presencia de hMPV en los aislados virales que fueron tanto positivos (42) como negativos (17) a este virus por IFD. Se tipificaron por RT-PCR un total de 59 aislados, de los cuales 42 fueron positivos a hMPV; de las 17 negativas para hMPV por IFD, se confirmaron siete para hRSV y dos para el virus de parainfluenza humano tipo 2; ocho muestras resultaron negativas por RT-PCR a los virus estudiados.

Una muestra se consideró positiva para hMPV cuando se identificó el amplificado esperado en al menos uno de los genes virales N y/o L. La detección del producto amplificado esperado para el gen N, considerando lo reportado en la bibliografía respecto al alto porcentaje de homología de secuencia en nucleótidos

del gen N (91.2%) entre los grupos y subgrupos de hMPV,<sup>10-12</sup> permitiría identificar y confirmar de forma certera la presencia de este virus en los aislados virales a partir de las muestras clínicas. En cambio, para el gen L (gen de la polimerasa), a pesar de que se había reportado que presentaba un porcentaje de homología de secuencia entre los dominios funcionales de la polimerasa puede variar de 53-91% entre los diferentes grupos y subgrupos de hMPV.<sup>12</sup> La polimerasa viral está conformada por seis dominios funcionales I-VI, de los cuales, los dominios V-VI, particularmente la región que va del nucleótido en la posición 1787 al nucleótido en la posición 1943, presentan una baja homología de secuencia entre los miembros del género *Pneumovirinae*,<sup>12,15</sup> por lo que es fundamental precisar

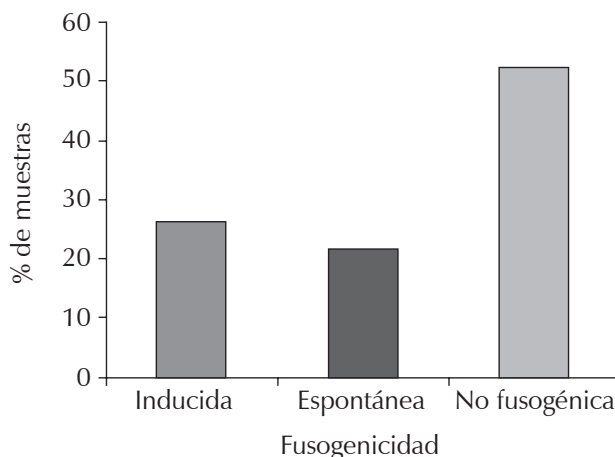


**Figura 2.** Titulación por TCID<sub>50</sub> del control interno con actividad fusogénica. Los controles internos fusogénico y no fusogénico se establecieron a partir de aislados virales positivos a hMPV por IFD. El control fusogénico se tituló por ensayo de TCID<sub>50</sub>. **A.** Control de células HEp-2 no infectadas. **B.** Control fusogénico con un título viral de  $3.43 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL.

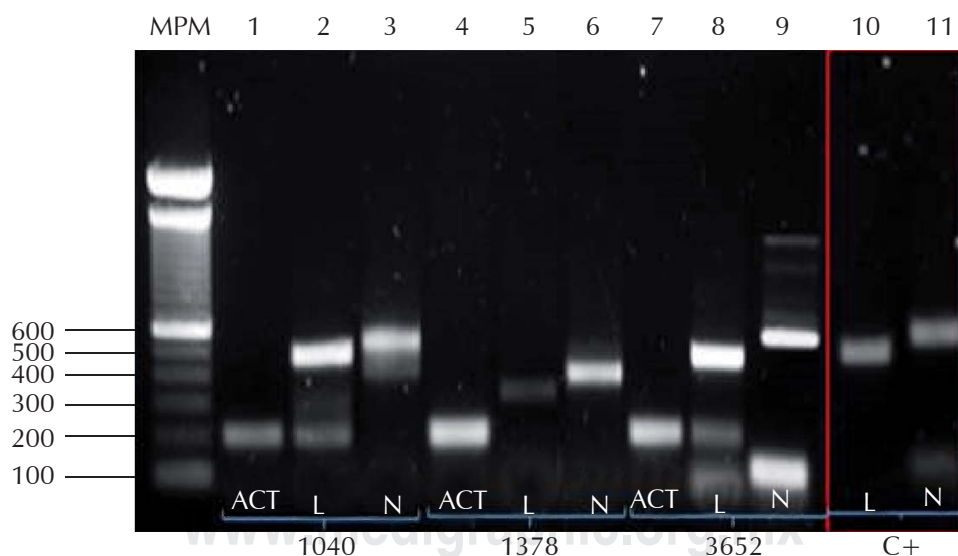
que los oligonucleótidos seleccionados amplifican la región comprendida entre los nucleótidos 1698-2206, lo que implica la posibilidad de que los oligonucleótidos no hibriden adecuadamente en esta región y, en consecuencia, que no se puedan obtener productos de amplificación y/o den un resultado negativo falso a este virus para la muestra en estudio. Por esta razón, aunque se amplificaron los dos genes, se consideran como positivos aquellos aislados virales que fueron positivos para el gen N, aunque hubieran sido negativos para L. En la *figura 4* se observa un gel representativo con tres muestras clínicas (1040, 1378 y 3652), en las cuales se amplificaron los genes L (447 pb), y N (599 pb). Paralelamente, se muestran los productos de amplificación correspondientes al control positivo MEX3670Fus y al control interno de  $\beta$ -actina, así como un control negativo que correspondió a células HEp-2 sin infectar.

Es importante señalar que durante el análisis de los productos de amplificación de los aislados analizados, además de observar el fragmento amplificado del tamaño esperado, se identificaron también productos amplificados de diferente tamaño con peso molecular superior o inferior a éste, los cuales no se detectaron en el control negativo, que correspondió a células HEp-2 sin infectar (*Figura 4*).

Se encontraron los dos productos de amplificación correspondientes a los genes N (599 pb) y L (447pb) en un total de n = 31 muestras (52.54%) de las 59 analizadas por RT-PCR, mientras que en cinco (8.47%) de los 59 aislados analizados únicamente se observó



**Figura 3.** Porcentaje de muestras que mostraron fusogenicidad. De las muestras positivas para hMPV (42), 11 (26.2%) presentaron fusogenicidad inducida, nueve (21.42%), fusogenicidad espontánea, y 22 (52.38%) se clasificaron como no fusogénicas.



**Figura 4.** Gel representativo de la amplificación de los genes virales N y L a partir de muestras clínicas. MPM = marcadores de peso molecular; 1 = gen de  $\beta$ -actina de la muestra 1040; 2 = gen L de hMPV de la muestra 1040; 3 = gen N de hMPV de la muestra 1040; 4 = gen de  $\beta$ -actina de la muestra 1378; 5 = gen L de hMPV de la muestra 1378; 6 = gen N de hMPV de la muestra 1378; 7 = gen de  $\beta$ -actina de la muestra 3652; 8 = gen L de hMPV de la muestra 3652; 9 = gen N de hMPV de la muestra 3652; 10 = gen L de hMPV del control positivo; 11 = gen N de hMPV del control positivo.

la banda de 599 pb, no se observaron bandas adicionales. Asimismo, en seis (10.16%) de los 59 aislados analizados únicamente se observó la banda de 447 pb del gen L, no se observaron bandas adicionales. La variación en el número de productos de amplificación observados en los 42 aislados positivos a hMPV no se relacionó con la capacidad fusogénica inducida, espontánea o su ausencia. No hubo diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Wilcoxon,  $p > 0.90$ .

## Discusión

El estudio de cohorte fue un estudio piloto descriptivo que consistió en 118 muestras de pacientes con infección respiratoria aguda. Se realizaron tres pases ciegos a las 118 muestras obtenidas, estos pases, además de enriquecer el título viral, nos permitieron obtener un banco de aislados que sirve como respaldo de las muestras y nos provee de una cantidad suficiente de virus para la realización de los ensayos.

Durante la realización de estos pases, 23 (19.49%) de las 118 muestras produjeron sincitios, por lo cual la producción de este tipo de ECP se denominó «fusogenicidad espontánea». <sup>16,17</sup> La actividad fusogénica, cuando no se presenta de manera espontánea, puede ser inducida por la acción enzimática de la tripsina. La tripsina procesa las subunidades F1 y F2 de la proteína viral de fusión o F (precursor F0), lo que favorece la exposición de los dominios de fusión. <sup>18,19</sup> Se ha reportado que el desarrollo de ECP es favorecido por proteasas externas en otros virus respiratorios, como los virus de parainfluenza humana 1 y 2<sup>20</sup> y el de la influenza, <sup>21</sup> es por ello que se estandarizaron las condiciones para inducir fusogenicidad. Existe una serie de reportes que demuestran que el tratamiento con TPCK es capaz de inducir eficientemente la actividad fusogénica en aislados virales de hMPV, por lo que las muestras que no desarrollaron sincitios de forma espontánea se trataron con TPCK. Si el ECP se presentaba, era un indicio de presencia viral, probablemente causada por hMPV, dados los antecedentes teóricos y lo observado en el control positivo (*Figura 1*). Cabe destacar que no se repitió el tratamiento con tripsina en pases posteriores; la fusogenicidad se desarrolló de manera «espontánea», lo cual presumiblemente nos indica que emergieron mutantes independientes de tripsina, similar a lo que sugieren Schickli y sus colaboradores. <sup>22-24</sup>

Las infecciones respiratorias por hMPV y hRSV parecen afectar a individuos con la misma cohorte de edad (de cero a 11 años). En nuestro trabajo, la edad media de los pacientes pediátricos fue de 18.9 meses,

un poco inferior a la descrita en otro estudio nacional realizado por Rodríguez y su grupo, <sup>25</sup> donde reportan una edad media de 22 meses. En América Latina, otros reportes recientes informan que en Brasil fue de ocho meses. <sup>26</sup> Si se toman en cuenta los pacientes menores de 18 años, la media es de 21.6 meses; aun así, es baja en comparación con la reportada en Chile (33 meses). <sup>27</sup> Sin embargo, la media pediátrica es superior a la descrita por otros grupos: Reina y colega, en España, observaron una edad media de 12.5 meses; <sup>28</sup> estudios realizados en otros países, como Israel, reportan una media de 17.6 meses. <sup>29</sup>

En cuanto a la frecuencia estacional, encontramos que hMPV y las coinfecciones con hRSV estuvieron presentes durante los meses de enero a abril, presentando picos máximos en abril para hMPV y en marzo para las coinfecciones. Esta frecuencia es acumulativa de los años 2004, 2006 y 2008-2011. Los datos coinciden con muchos otros estudios, que reportan que la mayoría de las infecciones respiratorias por hMPV y hRSV se producen en los meses fríos. <sup>25</sup> Sin embargo, en nuestro trabajo no pudimos establecer una relación con la frecuencia estacional debido a que las muestras provienen de diferentes años y para observar este parámetro se requiere de un muestreo más amplio de todo el año.

En términos generales, se reporta que las infecciones por hMPV son menos graves y precisan de menos ingresos hospitalarios, aunque esto depende de los grupos de edad y las zonas geográficas consideradas. En cuanto a las coinfecciones con hRSV y hMPV, se ha indicado que son frecuentes. <sup>27</sup> Drews y su equipo plantean que la presencia de hRSV en las coinfecciones se debe a que este virus podría facilitar la infección con un segundo virus respiratorio. <sup>30</sup> Sin embargo, aún no se ha aclarado su implicación con la severidad de la infección.

Algunos estudios indican que el cuadro respiratorio en caso de coinfección es más severo que con los agentes individuales, <sup>31,32</sup> mientras que otros no han descrito exacerbación de la infección. <sup>1,27</sup> Se desconoce si estos resultados contradictorios se deben a diferencias metodológicas o variabilidad en los virus circulantes. <sup>33</sup>

Es importante destacar que las muestras provenientes de pacientes hospitalizados correspondieron a aquéllas que no desarrollaron fusogenicidad; sin embargo, hay que recordar que la respuesta del hospedero a la infección depende de muchos factores, entre ellos, el estado inmunológico y la patogenicidad del virus que infecta; por ello, *in vivo*, no se puede realizar una asociación directa de mecanismos evasores del

sistema inmune, como lo es la fusogenicidad, con un estado clínico grave del paciente. No obstante, es importante considerar que la fusogenicidad y la presencia de variantes virales son dos factores importantes en la patogenicidad de hRSV y hMPV.

En la literatura se ha reportado que para miembros de la familia *Paramyxoviridae*, las variantes relacionadas con el desarrollo o pérdida de fusogenicidad se encuentran en la glicoproteína de superficie, particularmente en la proteína F o de fusión. Además, para el virus de sarampión, se ha reportado que variantes truncas en la proteína M o de matriz facilitan el desarrollo de fusogenicidad.<sup>33</sup>

Respecto a la observación de bandas de amplificación con un tamaño inferior o superior al esperado para ambos genes, éstas nos sugieren la presencia de variantes virales; sin embargo, esta consideración debe tomarse con reserva, ya que esta suposición deberá ser confirmada por secuenciación: de ninguna manera la observación de estas bandas adicionales nos confirma tal variación. No obstante la presencia de estas bandas de amplificación, los oligonucleótidos diseñados en el laboratorio se utilizaron para establecer una metodología diagnóstica altamente sensible y específica que permitió identificar la presencia de hMPV y otros virus respiratorios en las muestras clínicas analizadas. La especificidad de los oligonucleótidos para la identificación de hMPV se mostró cuando se retaron con cDNA blancos de otros virus respiratorios de la misma familia (*Paramyxoviridae*). Los resultados obtenidos (no se muestran) demostraron que no hubo amplificación inespecífica. Es relevante mencionar que en el laboratorio también se estandarizaron las condiciones de amplificación para hRSV y para hPIV (virus de parainfluenza tipo 2 humano), y en ambos casos, la especificidad de los oligonucleótidos diseñados por y probados en el laboratorio no mostraron amplificación inespecífica.

Si bien es cierto que en este estudio piloto descriptivo la prueba de RT-PCR se estableció con aislados virales presuntivamente positivos a hMPV por IFD, esto tuvo como objetivo inicial establecer la estandarización con aislados virales identificados previamente como hMPV positivos, sin dejar de lado que los ensayos de IFD pueden dar resultados negativos falsos. No obstante, los resultados obtenidos con los cDNA blanco demostraron la especificidad de la prueba, que permitió identificar y confirmar la presencia de hMPV. Asimismo, los aislados virales negativos por IFD para hMPV se confirmaron como positivos para hRSV y hPIV2 (no se muestran) por los ensayos de RT-PCR establecidos en el laboratorio.

La implementación de esta herramienta diagnóstica permitirá una identificación rápida del agente viral, lo que coadyuvará al profesional de la salud para establecer las medidas terapéuticas, profilácticas y/o paliativas para cada paciente conociendo el agente causal, hecho indistinguible desde el punto de vista clínico; además de las implicaciones que puede tener el diseño de herramientas moleculares para la tipificación viral y el impacto epidemiológico.

## Conclusiones

En nuestro estudio se desarrolló una metodología para la confirmación de la infección de hRSV y/o hMPV por RT-PCR. Además, obtuvimos las frecuencias epidemiológicas de dos de los principales agentes etiológicos virales de infecciones respiratorias agudas en pacientes en edad pediátrica: hRSV ,47.58%; hMPV, 14.52%, y coinfección, 19.35%.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Papenburg J, Boivin G. The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol.* 2010; 20 (4): 245-260.
2. Abara S. Metapneumovirus humano: un nuevo agente en IRA alta y baja. *Neumol Pediatr.* 2006; 1 (1): 11-13.
3. Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics.* 2003; 111 (6 Pt 1): 1407-1410.
4. Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S et al. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (7): 2987-2991.
5. Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (7): 3043-3045.
6. Noyola DE, Alpuche-Solís AG, Herrera-Díaz A, Soria-Guerra RE, Sánchez-Alvarado J, López-Revilla R. Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics. *J Med Microbiol.* 2005; 54 (Pt 10): 969-974.
7. Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Ishiko H, Hara M et al. Human metapneumovirus infection in Japanese children. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (1): 126-132.

8. Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*. 2001; 7 (6): 719-724.
9. Huang CG, Tsao KC, Lin TY, Huang YC, Lee LA, Chen TH et al. Estimates of individuals exposed to human metapneumovirus in a community-based Taiwanese population in 1999. *Arch Virol*. 2010; 155 (3): 343-350.
10. Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *Int J Infect Dis*. 2014; 25: 45-52.
11. Samransamruajkit R, Thanasugarn W, Prapphal N, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Human metapneumovirus in infants and young children in Thailand with lower respiratory tract infections; molecular characteristics and clinical presentations. *J Infect*. 2006; 52 (4): 254-263.
12. Piyaratna R, Tollefson SJ, Williams JV. Genomic analysis of four human metapneumovirus prototypes. *Virus Res*. 2011; 160 (1-2): 200-205.
13. Stangegaard M, Hufva IH, Dufva M. Reverse transcription using random pentadecamer primers increases yield and quality of resulting cDNA. *Bio Techniques*. 2006; 40 (5): 649-657.
14. Kish L. Survey sampling. New York: John Wiley & Sons; 1965.
15. Sidhu MS, Menonna JP, Cook SD, Dowling PC, Udem SA. Canine distemper virus L gene: sequence and comparison with related viruses. *Virology*. 1993; 193 (1): 50-65.
16. Dutch RE, Hagglund RN, Nagel MA, Paterson RG, Lamb RA. Paramyxovirus fusion (F) protein: a conformational change on cleavage activation. *Virology*. 2001; 281 (1): 138-150.
17. Michalsk W, Crameri G, Wang Lin-Fa, Shiell BJ, Eaton B. The cleavage activation and sites of glycosylation in the fusion protein of Hendra virus. *Virus Res* 2000; 69: 83-93.
18. Gardner AE, Dutch RE. A conserved region in the F(2) subunit of paramyxovirus fusion proteins is involved in fusion regulation. *J Virol*. 2007; 81 (15): 8303-8314.
19. Schowalter RM, Chang A, Robach JG, Buchholz UJ, Dutch RE. Low-pH triggering of human metapneumovirus fusion: essential residues and importance in entry. *J Virol*. 2009; 83 (3): 1511-1522.
20. Lindquist SW, Darnule A, Ista A, Demmler GJ. Parainfluenza virus type 4 infections in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J*. 1997; 16 (1): 34-38.
21. Chaipan C, Kobasa D, Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Tsegaye TS et al. Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J Virol*. 2009; 83 (7): 3200-3211.
22. Schickli JH, Kaur J, Ulbrandt N, Spaete RR, Tang RS. An S101P substitution in the putative cleavage motif of the human metapneumovirus fusion protein is a major determinant for trypsin-independent growth in vero cells and does not alter tissue tropism in hamsters. *J Virol*. 2005; 79 (16): 10678-10689.
23. Biacchesi S, Pham QN, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Modification of the trypsin-dependent cleavage activation site of the human metapneumovirus fusion protein to be trypsin independent does not increase replication or spread in rodents or nonhuman primates. *J Virol*. 2006; 80 (12): 5798-5806.
24. Lawlor HA, Schickli JH, Tang RS. A single amino acid in the F2 subunit of respiratory syncytial virus fusion protein alters growth and fusogenicity. *J Gen Virol*. 2013; 94 (Pt 12): 2627-2635.
25. Rodríguez-Auad JP, Nava-Frías M, Casasola-Flores J, Johnson KM, Nava-Ruiz A, Pérez-Robles V et al. The epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection in children at a public pediatric referral hospital in Mexico. *Int J Infect Dis*. 2012; 16 (7): e508-e513.
26. Bezerra PG, Britto MC, Correia JB, Duarte Mdo C, Fonceca AM, Rose K et al. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *PLoS One*. 2011; 6 (4): e18928.
27. Martínez P, Cordero J, Valverde C, Unanue N, Dalmazzo R, Piemonte P et al. Co-infección viral respiratoria en niños hospitalizados por infección respiratoria aguda y su impacto en la gravedad clínica. *Rev Chil Infect*. 2012; 29 (2): 169-174.
28. Reina J, Ferrés F, Mena A, Figuerola J, Alcoceba E. Características clínicas y epidemiológicas de las infecciones respiratorias causadas por el metapneumovirus humano en pacientes pediátricos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26 (2): 72-76.
29. Wolf DG, Greenberg D, Kalkstein D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Saleh N et al. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25 (4): 320-324.
30. Drews AL, Atmar RL, Glezen WP, Baxter BD, Piedra PA, Greenberg SB. Dual respiratory virus infections. *Clin Infect Dis*. 1997; 25 (6): 1421-1429.
31. Schildgen V, van den Hoogen B, Fouchier R, Tripp RA, Alvarez R, Manoha C et al. Human metapneumovirus: lessons learned over the first decade. *Clin Microbiol Rev*. 2011; 24 (4): 734-754.
32. Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2005; 191 (3): 382-386.
33. Cathomen T, Mrkic B, Spohner D, Drillien R, Naef R, Pavlovic J et al. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *EMBO J*. 1998; 17 (14): 3899-3908.