



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA ACADÉMICO DE MEDICINA

Genotipificación del Virus Respiratorio Sincitial Tipo A en muestras nasofaríngeas en pacientes pediátricos hospitalizados con diagnóstico clínico de Infección Respiratoria Aguda (IRA) procedentes de Lima y Cajamarca, durante el periodo 2009 - 2020.

TESIS

Para optar el título profesional de Médico Cirujano

AUTOR(ES)

Evaristo Ballmann, Gustavo (ORCID: 0000-0001-8654-0849)

Seminario Vittoria, Alessia (ORCID: 0000-0002-9533-1368)

ASESOR(ES)

Del Valle Mendoza, Juana Mercedes (ORCID: 0000-0002-6011-5040)

Martins Luna, Johannna Elizabeth (ORCID: 0000-0002-0051-4189)

Lima, 22 de marzo de 2021.

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo a nuestros padres en primer lugar, a nuestras asesoras, nuestros profesores, compañeros y todos aquellos quienes participaron en la recolección y análisis de las muestras.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos principalmente a padres por el apoyo brindado a lo largo de estos años, han sido incondicionales en este proceso.

Agradecemos también a nuestras asesoras Juana Del Valle y Johanna Martins por habernos guiado en el proceso de elaboración del proyecto, así como a todos los integrantes del equipo de laboratorio.

A todos quienes se preocuparon o nos ayudaron de una forma u otra en la elaboración de este manuscrito.

Gracias por todo.

RESUMEN

Objetivo: Genotipificar el Virus Respiratorio Sincitial (VRS) tipo A en muestras nasofaríngeas de pacientes pediátricos hospitalizados con el diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda en hospitales nacionales de Perú.

Métodos: Se realizó un análisis de datos secundarios a partir de un estudio transversal previo realizado en niños con Infección Respiratoria Aguda del 2009 al 2012 y del 2018-2020. Todas las muestras han sido analizadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para VRS-A, luego fueron secuenciadas, alineadas y finalmente se determinó el genotipo de cada una.

Resultados: Se estudiaron un total de 211 muestras positivas para VRS-A de las cuales 93 muestras fueron positivas al secuenciamiento y el genotipo más frecuente encontrado mediante estudio filogenético fue el ON1, con 86.79% de los casos y el NA1 con 13.21% de los casos.

Conclusiones: Hubo una alta prevalencia de VRS-A del genotipo ON1 en la población estudiada. Los casos de VRS-A, en Perú, fueron más prevalentes en los meses de marzo a junio.

Palabras clave: [VSR; Asma; Pediatría; Bronquiolitis; Virus respiratorios; PCR]

ABSTRACT

Objective: To genotype RSV type A in nasopharyngeal samples from pediatric hospitalized patients with the clinical diagnosis of acute respiratory infection in national hospitals in Peru.

Methods: A secondary data analysis was carried out from a previous cross-sectional study performed in children with Acute Respiratory Infections from 2009 to 2012 and from 2018 to 2020. All samples have been analyzed through the Polymerase Chain Reaction (PCR) for RSV-A, subsequently they were sequenced, aligned and finally the genotype of each one was determined.

Results: A total of 211 RSV-A positive samples were studied, of which 93 samples were positive to sequencing and the most frequent genotype found by phylogenetic study was ON1, with 86.79% of cases and NA1 with 13.21%. of the cases.

Conclusions: There was a high prevalence of RSV-A of the ON1 genotype in the studied environment. RSV-A cases, in Peru, prevalence was higher in the months of march and june.

Keywords: [Asthma; Pediatrics; Bronchiolitis; Respiratory virus; PCR]

N° 4690_Genotipificación del Virus Respiratorio Sincitial Tipo A en muestras nasofaríngeas en pacientes pediátricos hospitalizados con diagnóstico clínico de Infección Respiratoria Aguda (IRA) procede

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%

INDICE DE SIMILITUD

16%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

10%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	7%
2	cdn.www.gob.pe Fuente de Internet	2%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
4	scielo.conicyt.cl Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas Trabajo del estudiante	1%
6	www.aunap.gov.co Fuente de Internet	1%
7	core.ac.uk Fuente de Internet	1%

upc.aws.openrepository.com

8

Fuente de Internet

1 %

9

www.scielo.cl

Fuente de Internet

1 %

Excluir citas

Apagado

Exclude assignment
template

Activo

Excluir bibliografía

Activo

Excluir coincidencias

< 20 words

TABLA DE CONTENIDOS

	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	7
MATERIALES Y MÉTODOS	9
RESULTADOS	14
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	18
LIMITACIONES	18
REFERENCIAS	19

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) son unas de las principales causas de visita médica, dentro de ellas, las infecciones de las vías respiratorias inferiores provocan más de 4 millones de muertes anuales, en niños menores de 5 años (1,2,3). Los principales microorganismos causantes de las infecciones de las vías respiratorias inferiores son los virus, dentro de los cuales se encuentran los virus de influenza, el virus respiratorio sincitial (VRS) y más recientemente el coronavirus (SARS Cov-2) (4,5). Dentro de las infecciones respiratorias virales en menores de 2 años, el VRS es la causa más frecuente de infecciones de las vías respiratorias inferiores en niños, siendo el agente etiológico en más del 22% de los casos (1,6,7).

Se trata de un virus altamente contagioso, con cuadros clínicos similares a otras IRA, en su mayoría causando cuadros clínicos de vías respiratorias superiores, autolimitados con resolución en 1 a 2 semanas requiriendo únicamente tratamiento sintomático, como también poder progresar hacia un cuadro clínico de vías respiratorias inferiores como neumonía y bronquiolitis, llevando a la hospitalización de los pacientes para un cuidado más dirigido (8,9). De tal manera, la CDC emite un boletín de emergencia en el cual fomenta la toma de pruebas para detección de VRS en pacientes que acudan con IRA y presenten una prueba para SARS Cov-2 negativa, ya que el primero puede causar un cuadro severo, no sólo en niños como previamente se conocía, sino también en ancianos e inmunodeprimidos, requiriendo incluso en algunos casos, ser hospitalizados (6,10).

Las infecciones infantiles por VRS se han relacionado con sibilancias crónicas y asma, además de tener como consecuencia un gran impacto en la salud de niños, sobre todo los de edad escolar (9,11,12). En niños pequeños menores de 6 meses se presenta como irritabilidad, letargia, mala alimentación y apnea con o sin fiebre; mientras que en niños mayores se presenta como

rinorrea, disminución del apetito, tos, estornudos, fiebre y en algunos casos sibilancias (9,10). Este virus tiene una distribución uniforme en todo el mundo y se distribuye mayormente durante el otoño, invierno y principios de la primavera, mientras que, en regiones de climas fríos, se presenta uniformemente durante todos los meses del año (13,14).

El virus respiratorio sincitial es un pneumovirus ARN monocatenario, en sentido negativo, de la familia de los pneumoviridae (15,16). El virus contiene 10 genes en total y cada uno codifica una proteína diferente, a excepción del gen M2, el cual da lugar a dos proteínas, teniendo así un total de 11 proteínas virales distintas. En comparación con los otros virus de su familia es de igual tamaño, sin embargo, es el más complejo al tener varios genes y proteínas adicionales. Dentro de sus principales proteínas se encuentran: F, G, NS1, NS2, SH, M2-1 y M2-2 (15,17).

El VRS se caracteriza por presentar dos subtipos antigénicamente diferentes, A y B, así como múltiples genotipos, con la capacidad de circular de forma simultánea (18,19). En la actualidad se conocen 13 genotipos del grupo VRS-A (GA1-GA7, SAA1, NA1-2 y ON1-2) y 20 genotipos de VRS-B (GB1-4, BA1-10, SAB1-4, y URU1-2) (14,17,18). Previamente se creía que el genotipo NA1 del subtipo A era el más común en circulación, hasta la aparición del ON1 en Ontario en el año 2011 y desde este suceso se sabe que es el más predominante (21). Según lo descrito en el artículo de Streng et al. 2019, se sabe que los genotipos GA2 y GA5 son los más prevalentes en Latinoamérica, mientras que en Estados Unidos y en Corea del Sur es el genotipo ON1 entre los principales genotipos del VRS-A (22, 23).

Un estudio reciente realizado en Singapur entre el 2014 y el 2018, reveló una alta prevalencia del tipo A en niños menores de 5 años durante dichos años, a excepción del 2016, donde el tipo B ha sido el más prevalente (24). Estudios realizados en Perú, demostraron valores similares al mencionado previamente. Saiki et al. 2019, han evidenciado una dominancia por parte del VRS tipo A sobre el B en niños menores de 5 años (25).

Una de las razones por las que en niños el riesgo de hacer un cuadro más severo es más alto que en adultos, se debe a las células dendríticas plasmacitoides y las células dendríticas mieloides, quienes juegan un rol importante durante la infección de VRS, la cual consiste en producir IFN alfa y beta (15,22). Se ha demostrado que en niños y neonatos hay inmadurez de estas células, por lo que no se genera una respuesta de memoria adecuada; lo cuál podría permitir que se dé una reinfección, incluso de la misma cepa. A diferencia de los adultos, que tienen esta capacidad conservada y son capaces de producir anticuerpos neutralizantes de tipo IgG contra la proteína F. Debido a la alta capacidad de contagio del VRS y la deficiente calidad de la inmunidad que queda post-infección, la prevención recae en el desarrollo de una vacuna, utilizando la proteína F como blanco terapéutico (27).

Dentro de los subtipos del VRS, el VRS-A es el más prevalente, en comparación con el VRS-B, según lo evidenciado en los diferentes artículos revisados, tanto en Latinoamérica, específicamente en Perú, así como también en otros países (2, 4).

Es muy importante la realización de estudios de genotipificación, no solo desde el punto de vista epidemiológico si no también desde la perspectiva clínica, puesto que otros estudios han demostrado que existen patógenos que responden de diferente manera frente a diferentes terapias, para estudios a futuro, la actual investigación permitirá conocer los genotipos y las secuencias de estos de manera que será posible intervenir sobre estos con terapias específicas (28).

Por lo expuesto, este estudio tiene como finalidad evaluar los diferentes genotipos más frecuentes del VRS-A en muestras nasofaríngeas en niños hospitalizados en Perú, que podría ser muy útil para la adquisición de la vacuna más adecuada, dirigida a los genotipos encontrados. Adicionalmente, en Latinoamérica no se dispone de la suficiente información, por lo que el estudio podría servir para la toma de múltiples decisiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de la población en estudio

Los participantes del presente estudio fueron niños de 0 a 17 años, hospitalizados con diagnóstico clínico de Infección respiratoria aguda (IRA). Según estos criterios se obtuvieron 1698 muestras nasofaríngeas, mediante PCR a tiempo real para la detección e identificación de patógenos de las vías aéreas, entre ellos el VRS.

Recolección de muestras y detección del VRS

Se utilizaron 351 muestras remanentes positivas para VRS colectadas durante enero del 2009 al 2012 y del 2018 al 2020 a partir de las 1698 muestras obtenidas en el paso previo (29).

Las muestras nasofaríngeas fueron colectadas con ayuda de dos hisopos de Dacrón de mango flexible (Viral Culturette, Becton-Dickinson Microbiology Systems, MD, USA) y sumergida en medio de transporte DMEM modificado, suplementado con suero bovino fetal al 10%, 1% de estreptomicina/penicilina y 20 mg/mL de fungisona. Las muestras fueron transportadas a 4° C siguiendo las condiciones de bioseguridad al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC). En el laboratorio de biología molecular, las muestras fueron alicuotadas en viales estériles de 1.5 mL, cada alícuota contenía 200 µL de la muestra en suspensión. Las alícuotas fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Todas las muestras cuentan con una ficha de datos epidemiológicos.

Extracción de ácidos nucleicos

Se utilizó 200 μL de muestra, para obtener el material genético (ARN) se utilizó el Kit comercial *High Pure Template Preparation* (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) y se procedió de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial.

A la alícuota de 200 μL de la muestra se agregó 250 μL de la solución “A” (200 μL *Binding Buffer* + 50 μL proteinasa K + 5 μL poly A), con el objetivo de lisar el virus y degradar las proteínas que se encuentran unidas al ARN, luego se mezcló con vortex y se incubó durante 10 minutos a 72°C para favorecer la lisis.

Posteriormente se adicionó 100 μL del *Binding Buffer* y se mezcló por inversión, para proveer un pH adecuado para que el ARN quede atrapado a la membrana, ya que esto solo se da en presencia de alta concentración de sales, después se armó una columna con filtro se colocó la muestra y se centrifugó por 1 minuto a 8000 g.

Después se descartó el tubo colector, se agregó 500 μL del *Inhibitor Removal Buffer* y se centrifugó por 1 minuto a 8000 g, con el propósito de eliminar los inhibidores, deshaciéndose de los contaminantes que puedan interferir en la PCR.

Se descartó el tubo colector y se adicionó 450 μL de *Wash Buffer*, se centrifugó por 1 minuto a 8000 g, se descartó el tubo colector y se agregó 450 μL de *Wash Buffer* se volvió a centrifugar por 1 minuto a 8000 g e inmediatamente se centrifugó por 10 segundos a 13000 g. El *Wash Buffer* fue previamente preparado con etanol y tiene la capacidad de remover las sales, impurezas o residuos que no se hayan adherido a la membrana y puedan estar fluyendo a través de la columna interfiriendo en las futuras reacciones.

Por último, se descartó el tubo colector, se rotuló un Eppendorf y se colocó la columna, se agregó 50 μL de *Elution Buffer*, se incubó por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 minuto a 8000 g, se repitió el procedimiento una vez más y se guardó la muestra a -80°C hasta su uso. El tampón de elución va a desprender el ARN de la membrana de sílica,

permitiendo que los ácidos nucleicos atraviesen la membrana durante la centrifugación, siendo recuperados para su posterior uso.

Identificación de la proteína G del Virus Respiratorio Sincitial tipo A (VRS-A) mediante PCR a tiempo real (RT-PCR).

Para la identificación de las muestras positivas para VRS-A se utilizó la técnica de transcripción inversa - Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), los cebadores y la sonda utilizados han sido descritos por Liu et al. (30) (Tabla 1).

Para la PCR a tiempo real se realizó una RT-PCR de un paso usando la sonda TaqMan con fluorescencia de BHQ a 125 nM y 250 nM de cebadores en un volumen final de 20 µL. Se combinaron cinco microlitros del ARN extraído con 15 µL del Ready RNA Virus Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Las condiciones de amplificación para VRS-A fueron a 50 ° C durante 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 95 ° C durante 5 s, 51 ° C durante 20 s y 72 ° C durante 20 s. Realizado en el equipo LightCycler 2.0 y los datos se analizaron con el software LightCycler 4.1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

Amplificación del gen proteína G del Virus Respiratorio Sincitial tipo A (VRS-A) mediante RT-PCR convencional y secuenciamiento de los amplicones.

Para la amplificación se realizó una primera RT-PCR, en la cual se utilizaron los cebadores RSVA1-G513-F y RSVA1-F131-R descritos por Reiche et al (30) y Peret et al (31). Se combinaron 5 µL del RNA y 15 µL de la enzima LightCycler® Multiplex RNA Virus Master, todo se colocó en un termociclador Eppendorf. Las condiciones fueron: un ciclo de 50° C durante 45 minutos, seguido de un ciclo de 95° C durante 5 minutos y posteriormente 40 ciclos

a 95° C por 30 segundos, 58° C por 30 segundos y 72° C por un minuto, una extensión final de 72° C por 10 minutos y un último ciclo de 4° C.

Posteriormente se realizó una segunda PCR convencional con el producto de la primera RT-PCR los cebadores usados fueron RSVA2-G606-F y RSVA2-F22-R descritos por Peret et al (32), la mix fue colocada en el termociclador Eppendorf. Las condiciones utilizadas fueron un ciclo de 95° C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95° C por 30 segundos, 53° por 30 segundos, 72° C por un minuto, una extensión final de 72° C por 10 minutos y un último ciclo de 4° C.

Los productos amplificados fueron separados en un gel de agarosa al 1.5%, previamente teñido con bromuro de Etidio. Las bandas de ADN obtenidas fueron purificadas con ayuda del Kit de purificación de Novagen y enviadas a secuenciar a MacroGen - Korea.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y corroboradas en el programa BLAST - Nucleotide de la U.S National Library of Medicine (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Posteriormente las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal X2 de la University College Dublin y se creó el archivo en formato FASTA.

Análisis filogenético

Para el análisis filogenético se utilizaron un total de 202 secuencias obtenidas en GenBank con su respectivo código de acceso por X. Chen et al (33) y las 93 muestras secuenciadas por MacroGen del presente estudio.

Las secuencias fueron alineadas mediante la herramienta de ‘Complete Multiple alignment’ mediante Clustal X2 y posteriormente han sido importadas a MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) y se elaboró el dendrograma. El árbol filogenético fue construido utilizando el método de ‘Maximum likelihood neighbor joining’ mediante Mega X, el porcentaje de valores Bootstrap fue de 500. Finalmente se compararon las secuencias conocidas con las estudiadas, identificando los genotipos correspondientes (Figura 1).

Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC) (Ethical Application N° FCS-CEI/ 342-05-21) y el Comité de Ética del Instituto de Investigación Nutricional (IIN) (Ethical Application N° 279-2009/CEI-IIN) en Lima, Perú.

Previo a la toma de muestra se procedió con la firma del consentimiento informado de los padres o apoderados y el asentimiento informado en el caso de los niños mayores de 8 años.

Todos los procedimientos han sido realizados bajo las directrices éticas para la investigación en salud humana por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

RESULTADOS

Frecuencia y distribución temporal del VRS tipo A.

Se analizaron 351 muestras positivas para VRS mediante RT-PCR durante el periodo 2009-2012 y 2018-2020, obteniéndose 211 (60.1%) muestras positivas para VRS tipo A y 140 (39.8%) muestras positivas para VRS tipo B (Figura 1). Los casos de VRS se distribuyen durante todo el año, sin embargo, se observa un aumento de los casos de manera reiterada, entre los meses de marzo a mayo, durante el periodo del estudio. Este aumento, ocurrió en simultáneo al incremento de casos de infección respiratoria aguda (IRA), generados por otros patógenos a nivel de las vías respiratorias. El año con mayor número de casos de VRS fue el 2018, donde en el mes de mayo se registraron más de 40 casos (Figura 2).

Se les realizó PCR convencional a las 211 muestras positivas de VRS-A obtenidas previamente mediante RT-PCR a tiempo real, para amplificar el material genético y poder realizar la secuenciación automática. Solamente 103 muestras mediante PCR Convencional dieron resultados óptimos para la secuenciación automática (MS Figura 1). En el análisis filogenético se identificaron 2 genotipos: el ON1 y el NA1. Siendo el genotipo ON1 el más predominante con 46/53 (86.79%) secuencias correspondientes, seguido del genotipo NA1 con 7/53 (13.21%) casos. No se encontraron secuencias para los demás genotipos investigados: NA2, GA1-7 y NA1 (Figura 3 a y 3 b) (Tabla 2).

Así mismo, se analizaron los sublinajes del genotipo ON1 encontrándose: ON1-1, ON1-2, ON1-3, ON1-4, ON1-?. Dentro de ellos los de mayor prevalencia fueron el ON1-1 y el ON1-? Con 14 y 21 muestras respectivamente.

DISCUSIÓN

El Virus Respiratorio Sincitial es el virus más frecuente y responsable de las infecciones de las vías respiratorias bajas en la población pediátrica. Actualmente, se sabe que este patógeno no solo es responsable de infecciones en niños, sino también producir cuadros clínicos similares en pacientes adultos, por lo que no puede ser descartado como agente causal dentro de los diagnósticos diferenciales (34).

Por ser uno de los virus respiratorios altamente contagiosos y más comunes en los cuadros de IRA en niños, sobre todo en pacientes hospitalizados, es considerado un virus de vigilancia continua por los centros de referencia. Se sabe que el virus presenta un alto número de reproductividad, lo cual se ve reflejado en el aumento de hospitalizaciones y la sobrecarga ocasionada por este mismo, en los servicios de salud (35).

Un estudio realizado en Alemania durante 1999 - 2007, encontró que los picos de las temporadas de VRS fueron mayormente durante las estaciones de invierno y primavera en el hemisferio norte. Mientras que, en el presente estudio se ha identificado aumento de los casos de VRS durante el otoño e invierno (31).

En los años recientes han surgido varios estudios que describen el incremento de la prevalencia del VRS en países vecinos. Un estudio retrospectivo descriptivo realizado en Colombia menciona que durante 10 años consecutivos encontraron mayor número de muestras positivas para VRS-A, mientras que sólo en algunos departamentos del país se encontró VRS-B; y dentro del subtipo A, el genotipo GA5 fue el más prevalente (36). En un estudio publicado el 2014 en Brasil, se evidenció que la mayoría de los casos positivos para VRS pertenecían al subtipo A, en el mismo estudio mencionan que es posible la coinfección con ambos subtipos de VRS en un mismo paciente (37). Si bien en el presente estudio se ha encontrado un mayor número de muestras de VRS subtipo A (60.1%) que del subtipo B (39.8%), se ha evidenciado que ambos

subtipos co-circulan durante los mismos períodos de tiempo. Diferentes estudios muestran datos distintos con respecto a la prevalencia según la región y las características demográficas, tales como edad, sexo, comorbilidades, severidad del cuadro, tiempo de estadía en hospitalización y lugar de procedencia (36,38,39).

Diversos estudios han buscado determinar la relación entre subtipo y severidad, sin embargo, los resultados son ambiguos, puesto que ciertos estudios relacionan al subtipo A con un cuadro clínico más severo (38). Diferentes estudios realizados en los años de 2015 y 2019 identificaron dentro del subtipo A, que el genotipo NA1 es más severo que el ON1 (41,42). Por otro lado una investigación realizada en el año 2016 indica que el genotipo ON1 tiene una presentación clínica más severa que NA1 (21). Por tales motivos, no se ha logrado llegar a una conclusión sobre esto y sigue siendo controversial.

Estudios recientes han tratado de establecer relaciones no solo entre los subtipos sino también entre los genotipos del VRS (43). Un estudio realizado en Alemania entre el 2011-2017, establece una relación entre infección con el genotipo NA1 en la población pediátrica de menor edad, junto a un curso clínico más severo (44). En contraste, un estudio realizado en Vietnam mostró un mayor riesgo de infecciones del tracto respiratorio inferior en 2.26 y neumonía confirmada radiológicamente en 1.98 veces a causa ON1, siendo menor el riesgo para el genotipo NA1. Así mismo, describe que los casos de infecciones respiratorias de vías inferiores eran clínicamente más severos en los casos positivos para el genotipo ON1 en comparación con los casos positivos para el genotipo NA1 (21).

Existen medicamentos actualmente en ensayos clínicos que buscan prevenir los casos severos ocasionados por el VRS, así como evaluar la seguridad y eficacia. Uno de los medicamentos aprobado por la FDA para su uso en humanos en 1998 (45) y que es empleado en niños como profilaxis, es el Palivizumab [[NCT02968173](#)], el cual consiste en un anticuerpo monoclonal,

IgG1. Este anticuerpo está dirigido a un epítipo del sitio antigénico A de la proteína F (Fusión), de tal manera que inhibe la fusión del virus a la membrana celular de las células del huésped y por lo tanto la capacidad viral de infección y replicación (46).

En una revisión sistemática de diversos estudios publicada en Cochrane, recomienda el uso de Palivizumab a una dosis de 15 mg/kg intramuscular, en niños con factores de riesgo como prematuridad, bajo peso al nacer o diagnóstico de broncodisplasia pulmonar, la cual debe ser aplicada entre 3 a 5 veces, 1 vez por mes. Se observó reducción en la infección, hospitalización y mortalidad, además de ser un fármaco seguro con pocos o casi nulos efectos adversos observados.

Una segunda alternativa y que actualmente está en estudio es el Motavizumab [[NCT00113490](#)], un anticuerpo monoclonal con una eficacia similar a la del Palivizumab, pero a diferencia de este, los resultados han sido ligeramente inferiores. Además, genera gran preocupación la relación con hipersensibilidad que podría causar su administración (47, 48).

CONCLUSIONES

El presente estudio es un análisis de prevalencia que ha determinado los principales genotipos circulantes del Virus Respiratorio Sincitial subtipo A durante el periodo de 2009-2012 y 2018-2020 en Perú, los cuales incluyen ON1, y NA1. Además, los resultados sugieren que el genotipo ON1 es el más frecuente y su tendencia ha ido incrementándose en los últimos años, resultado similar a lo descrito en estudios multicéntricos (33).

Finalmente, recomendamos ampliar el estudio en el área de biología molecular en nuestro País, con la finalidad de analizar a mayor profundidad el campo de la genética de microorganismos, debido a la asociación existente entre diferentes genotipos, carga viral y el 'outcome' clínico que se presentan (49,50).

LIMITACIONES

Debido al diseño no es posible determinar la causalidad de los patógenos ni correlacionar el diagnóstico clínico de los genotipos de VRS-A, lo cuál deja las posibilidades abiertas a la futura realización de otros estudios cuyo objetivo sea este.

REFERENCIAS

1. Nair DNB H, Theodoratou E, Rudan I, Nokes DJ, Ngama HND M, Munywoki PK, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* [Internet]. 2010;375:1545–55. Available from: www.thelancet.com
2. Sitthikarnkha, P., Uppala, R., Niamsanit, S., Sutra, S., Thepsuthammarat, K., Techasatian, L., & Teeratakulpisarn, J. (2022). Epidemiology of acute lower respiratory tract infection hospitalizations in Thai children: A 5-year national data analysis. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 16(1), 142–150. <https://doi.org/10.1111/irv.12911>
3. Smith, D. K., & Budzik, C. (2017). *Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in Children* (Vol. 95, Issue 2). <http://www.aafp.org/afp/recommend>
4. Yoshida LM, Suzuki M, Nguyen HA, Le MN, Vu TD, Yoshino H, et al. Respiratory syncytial virus: Co-infection and paediatric lower respiratory tract infections. *European Respiratory Journal*. 2013 Aug 1;42(2):461–9.
5. Fleming PF, Gale C, Molloy EJ, Faust SN, Costeloe K, Juszczak E, et al. Paediatric research in the times of COVID-19. Vol. 90, *Pediatric Research*. Springer Nature; 2021. p. 267–71.
6. Nair H, Verma VR, Theodoratou E, Zgaga L, Huda T, Simões EA, et al. An evaluation of the emerging interventions against Respiratory Syncytial Virus (RSV)-associated acute lower respiratory infections in children. *BMC Public Health*. 2011;11(SUPPL. 3).
7. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *The Lancet*. 2017 Sep 2;390(10098):946–58.
8. Karampatsas K, Kong J, Cohen J. Bronchiolitis: an update on management and prophylaxis. 2019 May.
9. Dalziel SR, Haskell L, O'Brien S, Borland ML, Plint AC, Babl FE, et al. Bronchiolitis. Vol. 400, *The Lancet*. Elsevier B.V.; 2022. p. 392–406.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Increased Interseasonal Respiratory Syncytial Virus (RSV) Activity in Parts of the Southern United States. 2021 Jun.
11. Anderson EJ, Carbonell-Estrany X, Blanken M, Lanari M, Sheridan-Pereira M, Rodgers-Gray B, et al. Burden of severe respiratory syncytial virus disease among 33-35 weeks' gestational age infants born during multiple respiratory syncytial virus seasons. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2017;36(2):160–7.
12. Sigurs N, Aljassim F, Kjellman B, Robinson PD, Sigurbergsson F, Bjarnason R, et al. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax*. 2010;65(12):1045–52.
13. Welliver RC. Temperature, humidity, and ultraviolet B radiation predict community respiratory syncytial virus activity. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2007;26(11 SUPPL.):29–35.
14. Radhakrishnan D, Ouedraogo A, Shariff SZ, McNally JD, Benchimol EI, Clemens KK. The association between climate, geography and respiratory syncytial virus hospitalizations among children in Ontario, Canada: A population-based study. *BMC Infect Dis*. 2020 Feb 19;20(1).

15. Thornhill EM, Verhoeven D. Respiratory Syncytial Virus's Non-structural Proteins: Masters of Interference. Vol. 10, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
16. Nam HH, Ison MG. Respiratory syncytial virus infection in adults. Vol. 366, *The BMJ*. BMJ Publishing Group; 2019.
17. Collins Peter; Melero José. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. National Health Institute [Internet]. 2011;162(1–2):80–99. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016817021100373X>
18. Vandini S, Biagi C, Lanari M. Respiratory syncytial virus: The influence of serotype and genotype variability on clinical course of infection. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8).
19. Pangesti KNA, Abd El Ghany M, Walsh MG, Kesson AM, Hill-Cawthorne GA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. Vol. 28, *Reviews in Medical Virology*. John Wiley and Sons Ltd; 2018.
20. Vandini S, Biagi C, Lanari M. Respiratory syncytial virus: The influence of serotype and genotype variability on clinical course of infection. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8).
21. Yoshihara K, Le MN, Okamoto M, Wadagni ACA, Nguyen HA, Toizumi M, et al. Association of RSV-A ON1 genotype with Increased Pediatric Acute Lower Respiratory Tract Infection in Vietnam. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(November 2015):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep27856>
22. Streng A, Goettler D, Haerlein M, Lehmann L, Ulrich K, Prifert C, et al. Spread and clinical severity of respiratory syncytial virus A genotype ON1 in Germany, 2011-2017. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):1–10.
23. Tabor DE, Fernandes F, Langedijk AC, Wilkins D, Lebbink RJ, Tovchigrechko A, et al. Global molecular epidemiology of respiratory syncytial virus from the 2017-2018 INFORM-RSV study. Vol. 59, *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology; 2021.
24. Ang LW, Mak TM, Cui L, Leo YS, Lee VJM, Lin RTP. Characterisation of respiratory syncytial virus activity in children and adults presenting with acute respiratory illness at primary care clinics in Singapore, 2014-2018. *Influenza Other Respir Viruses*. 2020;14(4):412–9.
25. Saiki-Macedo S, Valverde-Ezeta J, Cornejo-Tapia A, Castillo ME, Petrozzi-Helasvuo V, Aguilar-Luis MA, et al. Identification of viral and bacterial etiologic agents of the pertussis-like syndrome in children under 5 years old hospitalized. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):11–4.
26. Russell CD, Unger SA, Walton M, Schwarze J. The human immune response to respiratory syncytial virus infection. Vol. 30, *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology; 2017. p. 481–502.
27. Díaz P v, FiDeL aVenDaño L. El virus respiratorio sincicial: patógeno de niños... y de grandes ACTUALIZACIÓN. Vol. 33, *Rev Chil Enferm Respir*. 2017.
28. Stürmer M, Doerr HW, Preiser W. Variety of interpretation systems for human immunodeficiency virus type 1 genotyping: confirmatory information or additional confusion? *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2003 Dec;3(4):373-82. doi: 10.2174/1568005033481006. PMID: 14754436.
29. Juana del Valle Mendoza, Angela Cornejo-Tapia, Pablo Weigl, Eduardo Verne, Ronald Nazario-Fuertes, Claudia Ugarte, Luis J. del Valle TP. Incidence of Respiratory Viruses in Peruvian Children With Acute Respiratory Infections. *J Med Virol*. 2015;87(November 2005):917–24.

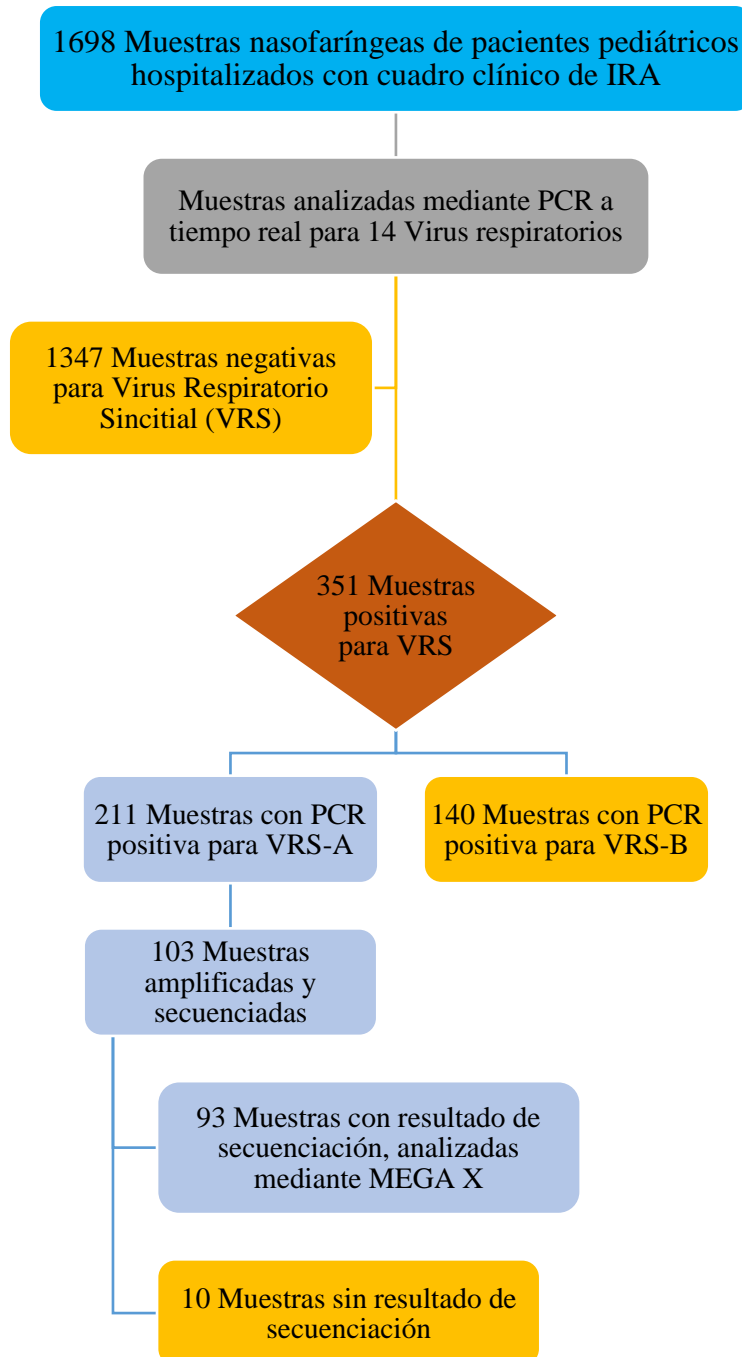
30. Liu W, Chen D, Tan W, Xu D, Qiu S, Zeng Z, et al. Epidemiology and clinical presentations of respiratory syncytial virus subgroups A and B detected with multiplex real-time PCR. *PLoS One*. 2016 Oct 1;11(10).
31. Reiche J, Schweiger B. Genetic Variability of Group A Human Respiratory Syncytial Virus Strains Circulating in Germany from 1998 to 2007. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2009 Jun 1;47(6):1800 LP – 1810. Available from: <http://jcm.asm.org/content/47/6/1800.abstract>
32. Peret TCT, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Printed in Great Britain Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. Vol. 79, *Journal of General Virology*. 1998.
33. Chen X, Zhu Y, Wang W, Li C, An S, Lu G, et al. A multi-center study on Molecular Epidemiology of Human Respiratory Syncytial Virus from Children with Acute Lower Respiratory Tract Infections in the Mainland of China between 2015 and 2019.
34. Muñoz-Quiles C, López-Lacort M, Doménech-Clar R, Puig-Barberà J, Díez-Domingo J. Infecciones por virus respiratorio sincitial en adultos diagnosticados en la Comunidad Valenciana. Vol. 216, *Revista Clinica Espanola*. Elsevier Doyma; 2016. p. 508–10.
35. van Boven M, Teirlinck AC, Meijer A, Hooiveld M, van Dorp CH, Reeves RM, et al. Estimating transmission parameters for respiratory syncytial virus and predicting the impact of maternal and pediatric vaccination. *Journal of Infectious Diseases*. 2021;222:S688–94.
36. Avila V, Calvo E, Barbosa J, Velandia-Romero ML, Castellanos JE. Description of respiratory syncytial virus genotypes circulating in Colombia. *J Infect Dev Ctries*. 2018 Dec 1;12(12):1112–8.
37. De-Paris F, Beck C, de Souza Nunes L, Machado ABMP, Paiva RM, da Silva Menezes D, et al. Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil. *Virol J*. 2014 Feb 24;11(1).
38. Barbosa J, Parra B, Alarcón L, Quiñones FI, López E, Franco MA. Prevalencia y periodicidad del virus sincitial respiratorio en Colombia. *Rev Acad Colomb Cienc Exactas Fis Nat*. 2018 Jan 12;41(161):435.
39. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *The Lancet*. 2017 Sep 2;390(10098):946–58.
40. Espinosa Y, Martín CS, Torres AA, Farfán MJ, Torres JP, Avadhanula V, et al. Genomic loads and genotypes of respiratory syncytial virus: Viral factors during lower respiratory tract infection in Chilean hospitalized infants. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 21;18(3).
41. Esposito S, Piralla A, Zampiero A, Bianchini S, di Pietro G, Scala A, et al. Characteristics and their clinical relevance of respiratory syncytial virus types and genotypes circulating in Northern Italy in five consecutive winter seasons. *PLoS One*. 2015 Jun 5;10(6).
42. Anderson LJ, Peret TC, Piedra PA. RSV Strains and Disease Severity. Vol. 219, *Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press; 2019. p. 514–6.
43. Maggi F, Pistello M, Antonelli G. Future management of viral diseases: role of new technologies and new approaches in microbial interactions. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2019;25(2):136–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.015>
44. Midulla F, Nenna R, Scagnolari C, Petrarca L, Frassanito A, Viscido A, et al. How Respiratory Syncytial Virus Genotypes Influence the Clinical Course in Infants Hospitalized for Bronchiolitis. 2019;219.
45. Medinmune. SYNAGIS® (palivizumab) injection, for intramuscular use. 2014; Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/103770s5185lbl.pdf

46. NCT02968173 Clinicaltrials gov[Internet]. B (MD): NL of M (US) N 2016 . I. A Study to Assess the Safety and Effectiveness of Palivizumab Administered to Children at High Risk of Severe Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection in the Russian Federation and the Republic of Belarus (Synagis Russia) 2018. National Health Institute [Internet]. 2016;(1). Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02968173?term=palivizumab&draw=2&rank=2&view=results>
47. Haynes LM. Progress and Challenges in RSV Prophylaxis and Vaccine Development. *Journal of Infectious Diseases*. 2013;208(SUPPL. 3):177–83.
48. LLC M. Study of MEDI-524 (Motavizumab) for the Prophylaxis of Serious Respiratory Syncytial Virus (RSV) Disease in High-Risk Children [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2013. Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00129766?term=motavizumab&draw=2&rank=2>
49. Charlton, C. L., Babady, E., Ginocchio, C. C., Hatchette, T. F., Jerris, R. C., Li, Y., Loeffelholz, M., Mccarter, Y. S., Miller, M. B., Novak-Weekley, S., Schuetz, A. N., Tang, Y.-W., Widen, R., & Drews, S. J. (2018). *Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Viruses Causing Acute Respiratory Tract Infections*.
<https://doi.org/10.1128/CMR>
50. Xiao, Q., Zheng, S., Zhou, L., Ren, L., Xie, X., Deng, Y., Tian, D., Zhao, Y., Fu, Z., Li, T., Huang, A., & Liu, E. (2015). Impact of human rhinovirus types and viral load on the severity of illness in hospitalized children with lower respiratory tract infections. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(11), 1187–1192. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000879>

ANEXOS:

Tablas y figuras:

Figura 1: Flujograma de diseño del estudio y procedimientos



Leyenda:

IRA: Infección respiratoria aguda.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

VRS: Virus Respiratorio Sincitial

Tabla 1: Cebadores y Sondas utilizados para la amplificación del Virus Respiratorio Sincitial tipo A (RSVA)

Plataforma	Cebadores	Secuencia (5' – 3')	Referencia
PCR Real time	RSV-A-F	ACTGCAATCAYACAAGATGCAACRA	Liu et al.
	RSV-A-R	CAGATTGRAGAAGCTGATTCCA	
	RSV-A-probe	CCAGATCAAGAACACAACCCCARCATACT	
PCR convencional	PCR Externa		
	RSVA-G513-F	AGTGTTCAACTTTGTACCCTGC	Reiche et al
	RSVA-F131-R	CTGCACTGCATGTTGATTGAT	
	Nested PCR		
	RSVA-G606-F	AACCACCACCAAGCCCACAA	Peret et al

Figura 2: Distribución espacial de casos positivos para VRS tipo A entre los años 2009-2012 y 2018-2020

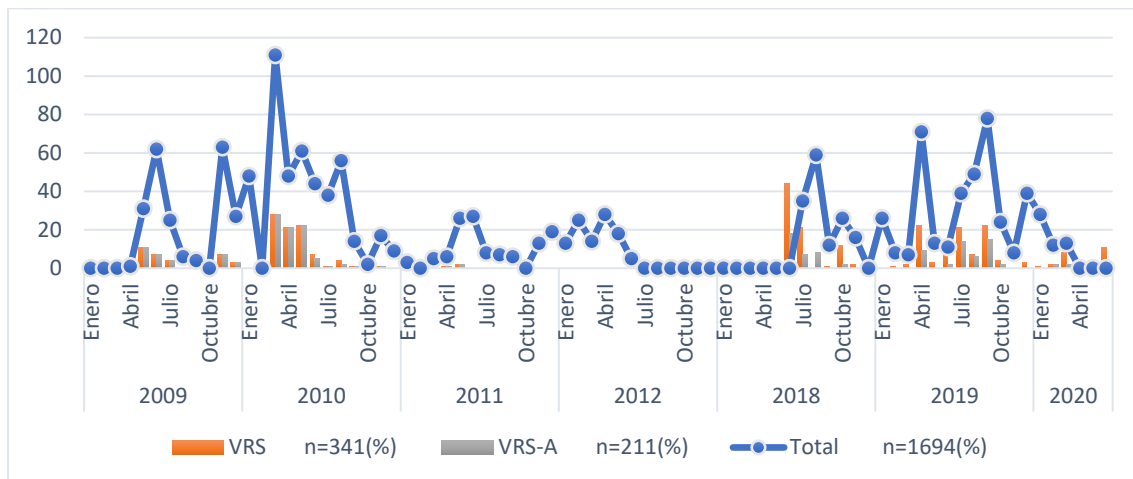


Figura 3 a: Dendrograma filogenético del VRSA

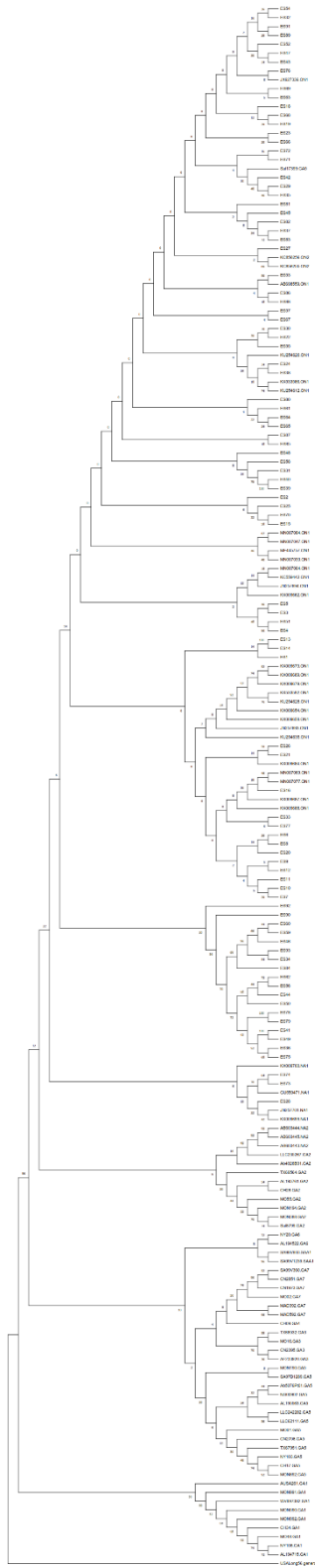


Figura 3 b: Dendrograma filogenético circular del VRSA

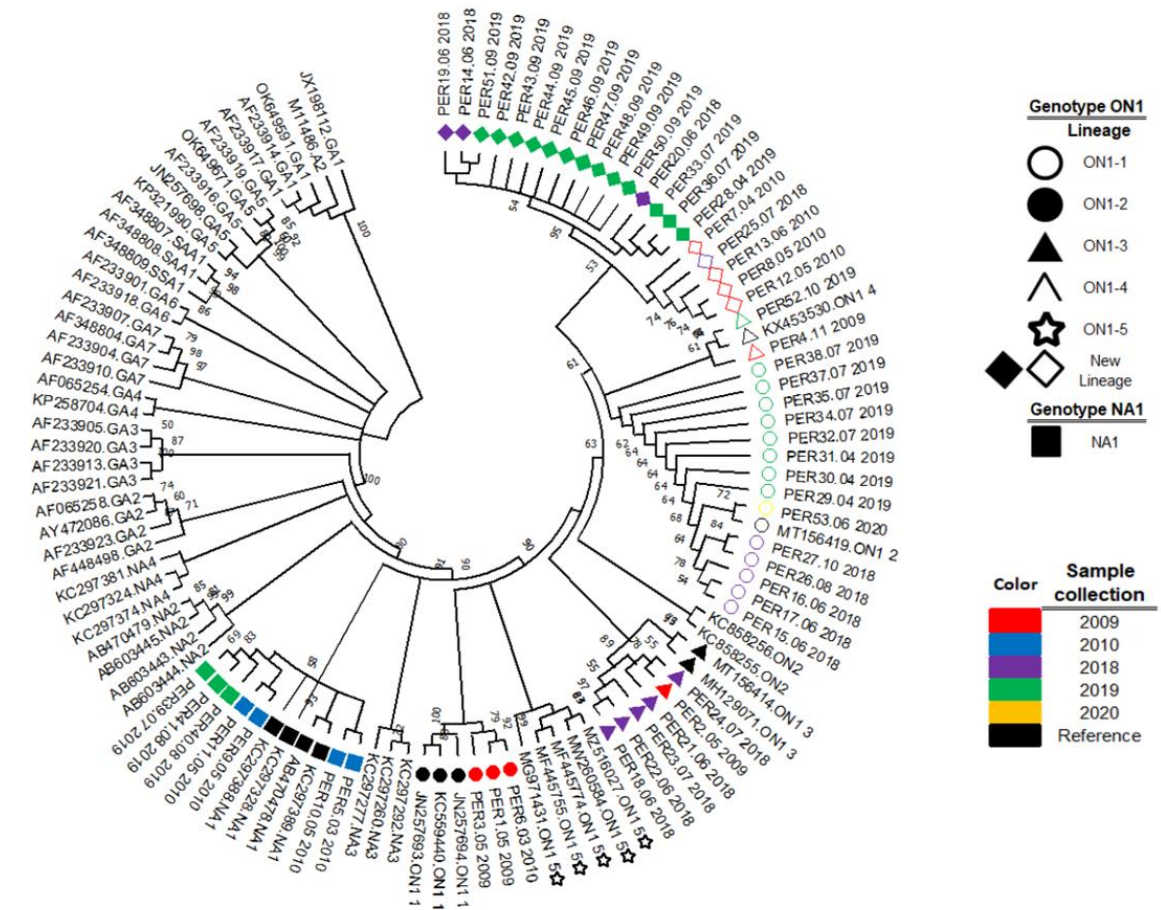


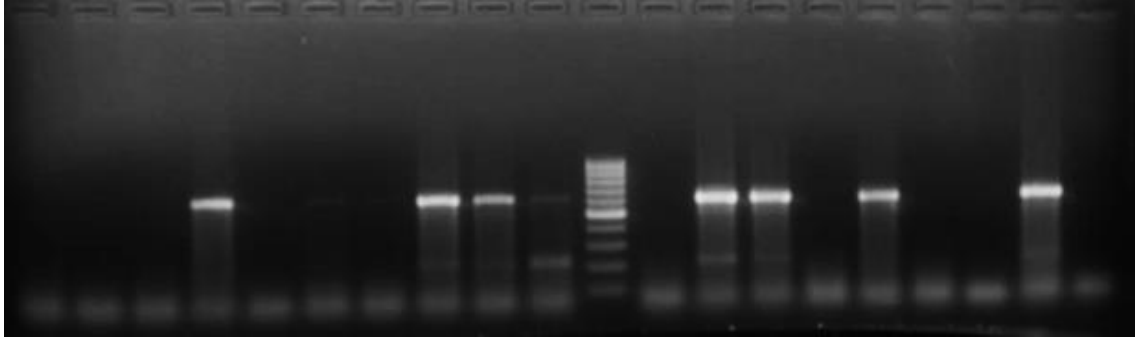
Tabla 2: Genotipos identificados y no identificados en el alineamiento utilizando 8 genotipos.

Años	Linaje	n= 53(%)	Sublinaje	n= 53(%)
2009	ON1	9 (16.98)	ON1-2	3 (5.66)
			ON1-3	1 (1.89)
			ON1-4	1 (1.89)
			ON1-?	4 (7.55)
2010	NA1	4 (7.55)		
2018	ON1	14 (26.42)	ON1-1	5 (3.77)
			ON1-3	5 (3.77)
			ON1-?	4 (7.55)
2019	ON1	22 (41.51)	ON1-1	8 (15.09)
			ON1-4	1 (1.89)
			ON1-?	13 (24.53)
	NA1	3 (5.66)		
2020	ON1	1 (1.89)	ON1-1	1 (1.89)

Otros genotipos estudiados: NA2, GA2, GA6, SA1, GA7, GA4, GA3.

Material Suplementario

Figura S1: Amplificación RVSA para identificar las mutaciones RSVA-G606-F, RSVA-F131-R, RSVA-G513-F



PCR □ Se cortan las bandas amplificadas □ Se purifica el ADN □ Secuenciamiento (MacroGen)