



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

Título de la Tesis:

**Estudio genético del virus sincitial respiratorio humano en el
brote 2022-2023 en Michoacán, México**

Que para obtener el título de Química Farmacobióloga

Presenta:

pQFB Andrea Monserrat Campos Espinosa

Asesor: Doctor en Ciencias en Biología Experimental Víctor Meza Carmen

**Co Asesor: Doctor en Ciencias en Biología Experimental Marco Iván Valle
Maldonado**

Morelia, Mich., a Noviembre de 2023

ÍNDICE

| | Página |
|--|---------------|
| ÍNDICE | II |
| ÍNDICE DE FIGURAS | IV |
| ÍNDICE DE TABLAS | V |
| ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | V |
| RESUMEN | VII |
| ABSTRACT | VIII |
| 1. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 1.1 Generalidades de los virus | 2 |
| 1.1.1 Virus respiratorios | 7 |
| 1.2 Virus Sincitial Respiratorio (RSV) | 8 |
| 1.2.1 Descubrimiento y generalidades del RSV | 8 |
| 1.2.2 Características genéticas del RSV | 9 |
| 1.2.2.1 Genómica funcional del RSV | 9 |
| 1.2.2.2 Cambios genéticos del RSV a través del tiempo | 11 |
| 1.2.2.3 Métodos de detección de RSV | 13 |
| 1.2.3 Importancia epidemiológica del RSV | 13 |
| 1.2.4 Brote mundial RSV 2022-2023 | 15 |
| 1.2.5 Métodos moleculares para la detección de los grupos antigénicos | 15 |

RSV/A y RSV/B

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1.2.6 | Importancia del estudio de diversidad genética de los virus | 16 |
| 2. | ANTECEDENTES | 17 |
| 3. | JUSTIFICACIÓN | 17 |
| 4. | HIPÓTESIS | 17 |
| 5. | OBJETIVOS | 17 |
| 5.1 | Objetivo general | 17 |
| 5.2 | Objetivos particulares | 17 |
| 6. | METODOLOGÍA EXPERIMENTAL GENERAL | 18 |
| 7. | MATERIALES Y MÉTODOS | 18 |
| 7.1 | Análisis bioinformático para la búsqueda de secuencias codificantes para la glicoproteína G de RSV/A y RSV/B | 18 |
| 7.2 | Alineamiento de secuencias codificantes para la glicoproteína G de RSV/A y RSV/B en el programa MegAlign | 19 |
| 7.3 | Diseño bioinformático de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis para un sistema de detección por RT-qPCR múltiplex de RSV/A y RSV/B y un control interno humano | 19 |
| 7.4 | Origen de las muestras y extracción de RNA viral | 20 |
| 7.5 | Preparación de mezcla maestra | 23 |
| 7.6 | Cargado de placas | 24 |
| 7.7 | Programación de condiciones de PCR | 25 |
| 7.8 | Análisis de resultados | 26 |
| 8. | RESULTADOS | 26 |

| | | |
|-----|--------------|----|
| 9. | DISCUSIÓN | 65 |
| 10. | CONCLUSIÓN | 67 |
| 11. | PERSPECTIVAS | 67 |
| 12. | REFERENCIAS | 68 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura genómica y del virión del RSV..... | 11 |
| Figura 2. Preparación de las placas precargadas de 96 pozos..... | 21 |
| Figura 3. Carga de muestra en las placas precargadas de 96 pozos..... | 22 |
| Figura 4. Introducción de la placa al equipo EXM3000 e inicio de la corrida..... | 22 |
| Figura 5. Retiro de la placa del equipo EXM3000 y fin de corrida..... | 23 |
| Figura 6. Código de colores empleados para la detección de los grupos antigénicos..... | 25 |
| Figura 7. Alineamiento genómico de los genes que codifican para la glicoproteína G de los grupos antigénico A y B del RSV..... | 41 |
| Figura 8. Ubicación genómica de oligonucleótidos y sonda de hidrólisis para la detección de RSV/A..... | 42 |
| Figura 9. Ubicación genómica de oligonucleótidos y sonda de hidrólisis para la detección de RSV/B..... | 43 |
| Figura 10. Gráficas de amplificación mediante RT-qPCR de muestras positivas a RSV/A y RSV/B..... | 45 |
| Figura 11. Gráfica de amplificación mediante RT-qPCR de una muestra positiva a RSV/B..... | 46 |
| Figura 12. Gráficas de amplificación mediante RT-qPCR del sistema de confirmación del sistema de detección RSV/A y RSV/B..... | 48 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 13. Porcentajes de grupos antigénicos de RSV detectados en el brote 2022-2023 del estado de Michoacán..... | 57 |
| Figura 14. Análisis de los ciclos de amplificación del gen que codifica para la glicoproteína G y control endógeno de 265 muestras positivas a RSV..... | 58 |
| Figura 15. Distribución por género, edad y Jurisdicción Sanitaria de muestras positivas a RSV en el brote 2022- 2023 del estado de Michoacán..... | 61 |
| Figura 16. Distribución por edad de muestras positivas a RSV/A y RSV/B del brote 2022-2023 en el estado de Michoacán..... | 62 |
| Figura 17. Distribución por género y edad de muestras positivas a RSV/A y RSV/B del brote 2022-2023 en el estado de Michoacán..... | 63 |
| Figura 18. Mapa de municipios del estado de Michoacán de Ocampo..... | 64 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1. Genes blanco de sistemas de detección de RSV/A y RSV/B mediante RT-qPCR..... | 16 |
| Tabla 2. Secuencias codificantes en pacientes positivos al grupo antigénico A del RSV..... | 26 |
| Tabla 3. Secuencias codificantes en pacientes positivos al grupo antigénico B del RSV..... | 27 |
| Tabla 4. Oligonucleótidos y sondas para la detección del RSV/A y RSV/B..... | 44 |
| Tabla 5. Género, edad, municipio de residencia y resultados de ciclos de amplificación mediante RT-qPCR (Cq) del gen G para muestras positivas a RSV/A y RSV/B..... | 49 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

RSV: Virus Sincitial Respiratorio Humano

RT-qPCR: Retro transcripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SARS-CoV-2: Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo

mRNA: RNA mensajero

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

IgM: Inmunoglobulina M

IgG: Inmunoglobulina G

IVRI: Infección de las vías respiratorias inferiores

IRAB: Infecciones respiratorias agudas bajas

COVID-19: Enfermedad del coronavirus-2019, Coronavirus disease-2019

BHQ: Apagador de Fluorescencia, Black hole quencher

RNASE P: Ribonucleasa P

Cq: Número de ciclos en el que la fluorescencia empieza a ser detectada

°C: Grados centígrados

PREFIJOS

M: Mega

nm: nanómetro

µm: micrómetro

pb: Pares de bases

kb: Kilo bases

Mb: Mega bases

µl: Microlitro

RESUMEN

El virus sincitial respiratorio humano (RSV) desde su descubrimiento ha sido un agente infeccioso con relevancia epidemiológica como consecuencia a su prevalencia e incidencia en la población. De particular interés científico fue el brote mundial reciente de RSV en los años 2022-2023, en donde existen múltiples reportes de la variabilidad genética de este virus. De manera concreta, con base a la diversidad genética del gen que codifica a la glicoproteína G, este virus se clasifica en dos grupos antigénicos: RSV/A y RSV/B. Por lo que existe la necesidad de desarrollar y diseñar una metodología sensible y actualizada para la detección de estos dos grupos antigénicos del RSV. En el presente trabajo se logró desarrollar un nuevo método molecular mediante RT-qPCR que permitió por primera vez la detección antigénica en 265 muestras positivas a RSV procedentes del estado de Michoacán. Se detectaron 189 muestras positivas para RSV/A (71.32%), 75 muestras para RSV/B (28.30%) y un caso de coinfección RSV/A+RSV/B (0.38%).

Palabras clave: (Virus, Sincitial, Respiratorio, RT-qPCR, glicoproteína)

ABSTRACT

Since its discovery, the human respiratory syncytial virus (RSV) has been reported as an infectious agent with epidemiological relevance as a consequence of its prevalence and incidence in the population. It was of particularly interesting for the scientific community the recent global outbreak of RSV in the 2022-2023 season, where multiple reports of the high genetic variability of this virus were available. Specifically, due to the genetic diversity of the gene that encodes glycoprotein G, this virus is classified into two antigenic groups: RSV/A and RSV/B. For this reason, there is a need to develop and design a sensitive and updated methodology for detection of these two antigenic RSV groups. In the present work, it was possible to develop a new molecular method using RT-qPCR that allowed for the first time the antigenic identification in 265 RSV positive samples from the state of Michoacán. 189 RSV/A positive samples (71.32%), 75 RSV/B positive samples (28.30%) and a single RSV/A+RSV/B coinfection (0.38%) were detected.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de los virus

La palabra virus proviene del latín, que significa veneno.

Los virus son parásitos intracelulares ya que no poseen propiamente un aparato celular que sea capaz de llevar a cabo todas las funciones de una célula, por lo que tampoco se considera una célula, un virus para poder reproducirse y crear nuevas partículas virales infecciosas o viriones necesita de la maquinaria de la célula (Glingston et al., 2019).

Los virus son partículas realmente pequeñas en comparación a la célula humana, poseen un tamaño de 20-100 nm de diámetro a excepción de los poxvirus que son capaces de alcanzar un tamaño de 400 nm, y los filovirus como el Ébola que tiene solo 80 nm de diámetro, pero tiene la capacidad de extenderse en forma de hilos largos de tal manera que puede alcanzar longitudes de más de 1000 nm, mientras que la célula humana tiene un diámetro de 10 - 30 μm (Ward., 2005)

Todos los virus entran a la célula por medio de la unión con la superficie de la célula, una vez dentro el virus libera su material genético; cuya naturaleza química es un ácido nucleico que lleva instrucciones específicas para las proteínas que darán lugar a nuevos viriones usando la energía y maquinaria de la célula (Gutiérrez y López, 2010).

El material genético de todas las células vivas tiene DNA de doble cadena, en cambio, los virus tienen genomas que puede ser tipo DNA (ácido desoxirribonucleico) o RNA (ácido ribonucleico) pero no ambos, asimismo pueden ser DNA monocatenarios y RNA monocatenarios o bicatenarios (Chaitanya., 2019)

Del mismo modo en el que varía el tamaño de la partícula, lo hace el tamaño del genoma, los genomas virales típicos van de 7000 a 20000 pares de bases (pb) que equivale a 7 a 20 kilopares de bases (kb). Algunos virus DNA poseen genomas muy grandes como es el caso de los herpesvirus que tienen un genoma que va de 120-200 kb, y los pandoravirus tienen genomas más grandes de hasta

2,5 millones de bases, mientras que una célula humana contiene más de 3 mil millones de nucleótidos en su material genético (Louten., 2016).

Los virus cuyo genoma es tipo DNA se conocen como Adenovirus, los que son tipo RNA se conocen como Retrovirus, el genoma contiene toda la información genética del virus y es el responsable de la capacidad infecciosa del mismo. Herpesviridae, Papillomaviridae, Adenoviridae y Poxviridae son algunos ejemplos de familias de virus de tipo DNA, Ortomyxoviridae, Coronaviridae, Picornaviridae, Flaviviridae y Retroviridae son algunos ejemplos de familias de virus de tipo RNA.

En comparación con organismos unicelulares o pluricelulares, los genomas virales son mucho más pequeños y sencillos codificando para una cantidad reducida de proteínas. Por ejemplo, los tamaños de los genomas virus son los siguientes SARS-CoV-2: 29.9 kb (Khailany et al., 2020), Herpes simple tipo 1: 152.3 kb (Jiao et al., 2019) dichos genomas son mucho más pequeños que organismos como bacterias, *Escherichia coli*: 4.9 Mb (Archer et al., 2011); levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*: 12.07 Mb (Belda et al., 2019); mamíferos, *Homo sapiens* 3000 Mb (Pray, 2008).

La estructura del RNA genómico viral es monocatenaria y puede ser de polaridad positiva (+) o negativa (-); cuando su sentido es positivo (+), en la replicación viral el genoma RNA (+) actúa como RNA mensajero, traduciéndose a proteína, cuando su sentido es negativo (-), en la replicación viral el genoma RNA (-) actúa como RNA anti mensajero o de secuencia inversa, por lo que para poder replicarse y traducirse primero debe cambiar a sentido positivo (Lodish, 2006).

El ácido nucleico se encuentra rodeado por una cubierta proteica llamada cápside, la cápside más el ácido nucleico se llama nucleocápside. La simetría viral se otorga de acuerdo con la disposición espacial de los capsómeros, algunos virus tienen estructura helicoidal, otra forma de estructura es icosaedro. La función de la cápside es proteger el material genético del virus y facilitar la adsorción del virus a los receptores de la célula que infecta, en algunos tipos de virus existe una cubierta que protege la nucleocápside, llamada envoltura. La envoltura es una bicapa lipoproteica que está conformada por una bicapa fosfolipídica y algunos

tipos de glucoproteínas que se unen a los receptores virales en la célula por lo que la envoltura permite la adherencia del virus a los receptores de la célula que infecta y generar una respuesta inmune. Un virus envuelto, para poder propagarse necesita de un ambiente húmedo, es sensible a solventes lipídicos, detergentes, ácidos y desecación, al perder un virus envuelto su envoltura pierde la capacidad de infectar. Cuando un virus no contiene una envoltura se le llama virus desnudo, un virus desnudo es estable a factores ambientales como los cambios de temperatura y desecación, es resistente a los detergentes, ácidos, sales biliares y proteasas, sobreviven en el estómago, en el intestino y en aguas residuales, lo que conlleva a que se propaguen fácilmente a través de fómites, se sequen y aun así conservar su capacidad para infectar. Los virus envueltos se propagan mediante gotitas respiratorias, secreciones, transfusiones de sangre y no sobreviven en el tubo digestivo (Prasad y Schmid., 2012)

En el momento en el que un virus penetra en la célula, la célula pone todos sus mecanismos a disposición del virus e inicia un proceso de replicación viral (Cann., 2008) que consta de 5 pasos:

- 1) Adsorción o fijación;
- 2) Penetración o entrada;
- 3) Descapsidación o desnudamiento;
- 4) Síntesis de proteínas y replicación del genoma;
- 5) Maduración o ensamblaje;
- 6) Liberación o egreso.

El sitio de replicación en la célula está determinado por el tipo de ácido nucleico que sea el virus, los virus con genoma DNA se replican en el núcleo de la célula y los que tienen genoma RNA se replican en el citoplasma de la célula, en ambos casos hay excepciones, como, por ejemplo, los *poxvirus* (DNA) multiplican en el citoplasma y los *orthomyxovirus* (RNA) (Salonen et al., 2005)

- 1) Adsorción o fijación: El virus se une a través de las proteínas de la cápside a receptores específicos situados en la superficie de la célula hospedadora. En esta etapa el virus infecta a ciertas células de un tejido u órgano en particular.
- 2) Penetración o entrada: Es la entrada del genoma viral a la membrana plasmática de la célula hospedadora y se puede realizar de forma:
 - Directa: (solo pasa el genoma), como lo hacen ciertos bacteriófagos.
 - Endocitosis: la membrana citoplasmática se invagina y se produce el englobamiento de los virus desnudos, formándose en el interior de la célula una vesícula pequeña que contiene al virus para después ser liberado, a este proceso también se le llama pinocitosis.
 - Fusión: los virus envueltos ingresan por este mecanismo, el cual consiste en que la envoltura viral se fusiona con la membrana citoplasmática y libera la cápside en el interior de la célula.

Para los virus animales y vegetales las proteínas virales también penetran en la célula huésped.
- 3) Descapsidación o desnudamiento: una vez dentro de la célula, la cápside es eliminada por medio de enzimas proteicas celulares que la degradan. El genoma de los virus DNA ingresan en el núcleo celular y el genoma de los virus RNA permanece en el citoplasma.
- 4) Ensamblaje: proteínas virales y genomas se asocian para formar la progenie de los viriones

El mecanismo de multiplicación viral depende del tipo de ácido nucleico viral.

Genoma DNA: la transcripción sucede en el núcleo de la célula. Se necesita de una RNA polimerasa celular para sintetizar el mRNA. En el citoplasma se origina la traducción de las proteínas tempranas que no son estructurales y no formarán parte de los nuevos viriones. Después inicia la replicación del genoma viral, se produce la transcripción y la traducción de genes virales tardíos o proteínas tardías que tiene lugar en el citoplasma. Estas proteínas migran al

interior del núcleo celular y son estructurales, es decir sí formarán parte de la cápside de los nuevos viriones.

Genoma RNA: su ciclo de multiplicación sucede en el citoplasma de la célula ya que estos virus no utilizan las enzimas celulares para la transcripción y/o replicación de sus genomas. Los virus con genoma RNA de cadena positiva actúan como mRNA, se unen a los ribosomas y dirigen la síntesis de proteínas. El RNA (+) es suficiente en el organismo para iniciar la infección. El genoma RNA (-) no es infeccioso por lo que primero debe sintetizar mRNA.

5) Maduración o ensamblaje: en este proceso los ácidos nucleicos y proteínas se unen para formar la nucleocápside, se asocian para formar la progenie de los viriones

La maduración o ensamblaje de los virus DNA se realiza en el núcleo, en los virus RNA se realiza en el citoplasma.

Una vez que la nucleocápside se une a regiones que contienen proteínas virales en la superficie de la membrana de la célula hospedadora el virus obtiene su envoltura, los virus RNA lo hacen a partir de la membrana citoplasmática, la membrana rodea a la nucleocápside y se produce una brotación. Los virus DNA adquieren la envoltura en la membrana nuclear, son transportados al aparato de Golgi donde se procesan las glucoproteínas, atraviesan el citoplasma y finalmente se fusionan con la membrana citoplasmática.

6) Liberación o egreso: los virus desnudos son liberados por la ruptura de la membrana plasmática de la célula infectada, producto de la lisis celular. Los virus envueltos son liberados por un proceso de brotación, repitiéndose así cada ciclo para cada virión.

Para poder clasificar los virus se toman en cuenta características como el tipo de ácido nucleico, el tamaño, la simetría, presencia o no de envoltura, tipo de replicación y la célula que infecta o si presenta alguna predilección por alguna célula o tejido.

De los virus que se han asociado a enfermedades humanas, se han clasificado siete familias de virus con genoma viral DNA: *Poxviridae* y *Herpesviridae* (virus DNA envueltos de cadena doble) *Adenoviridae*, *Papovaviridae*, *Hepadnaviridae*, *Parvoviridae* son virus DNA no envueltos de cadena simple y catorce familias con genoma viral RNA envueltos como son: *Togaviridae*, *Flaviridae*, *Coronaviridae*, *Paramixoviridae*, *Rabdoviridae*, *Filoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae*, *Retroviridae*, *Oncovirinae*, *Lentivirinae*, algunos ejemplos de virus RNA no envueltos de cadena doble o simple son *Reoviridae*, *Picornaviridae* y *Caliciviridae*.

1.1.1 Virus respiratorios

Los virus respiratorios causan infecciones que afectan las vías respiratorias altas o bajas, y tienen altas probabilidades de causar síntomas graves en lactantes, adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos (Morens et al., 2023)

Para el diagnóstico se hace una evaluación clínica con base al síndrome que presenta el paciente ya que cada microorganismo produce un síndrome específico y característico como resfriado común, bronquiolitis o neumonía. La identificación del patógeno es importante cuando se considera un tratamiento antiviral en casos limitados a gripe temprana o grave, neumonía grave por adenovirus, Influenza, Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave del tipo 2 (SARS-CoV-2) o infección por el Virus Sincitial Respiratorio Humano (RSV) en pacientes inmunocomprometidos. En pacientes hospitalizados o que residen en alguna institución es de mayor importancia identificar influenza, SARS-CoV-2 o RSV para contener posibles brotes.

Hay pruebas de detección rápidas que se basan en la detección de antígenos para identificar Influenza, SARS-CoV-2 y RSV, sin embargo, el índice de sensibilidad es menor que el de las pruebas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para patógenos virales en un panel múltiple o individual, estas pruebas son rápidas y son más sensibles que las pruebas rápidas.

1.2 Virus sincitial respiratorio (RSV)

El virus sincitial respiratorio humano es uno de los patógenos virales más importantes que causan infecciones respiratorias y síntomas graves en lactantes, adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos (Bergeron y Tripp., 2022).

El RSV provoca un efecto citopático directamente en las células epiteliales de las vías respiratorias del huésped, provocando destrucción epitelial y pérdida del movimiento ciliar.

1.2.1 Descubrimiento y generalidades del RSV

El RSV humano fue aislado por primera vez del tracto respiratorio superior de un chimpancé en 1955, en 1956 logró aislarse de bebés con enfermedades respiratorias graves del tracto respiratorio inferior. (Morris et al., 1956)

El Virus Sincitial Respiratorio es un virus RNA monocatenario de sentido negativo, polimórfico, que pertenece al género *Orthopneumovirus*, familia *Pneumoviridae* en el orden Mononegavirales (Afonso et al., 2016).

Se transmite por contacto cercano con saliva o gotitas de moco. El virus se replica en las células epiteliales de las vías respiratorias superiores y nasofaringe en un periodo breve de tiempo, una vez que se replica, las partículas virales se liberan y se transfieren a las vías respiratorias inferiores como los bronquiolos o alvéolos provocando que los neutrófilos se infiltren a las vías respiratorias e induzcan una respuesta inmune en los pacientes infectados y presenten enfermedades respiratorias como la bronquiolitis. De 3 a 7 días después de la infección, los pacientes comienzan a desarrollar síntomas como: fiebre, congestión y secreción nasal, tos y opresión el pecho (Linder y Malani., 2017).

Actualmente no existen vacunas autorizadas para la prevención del RSV y existe solo un medicamento autorizado para la prevención de la enfermedad.

La proteína G fue descrita por primera vez como proteína de unión en 1987 (Levine et al.,1987), esta estructura proteica es rica en carbohidratos y se

encuentra presente en forma de membrana y es responsable de la unión del RSV a las células epiteliales respiratorias (Bukreyeb et al., 2008)

1.2.2 Características genéticas del RSV

El RSV humano se compone por 2 grupos antigénicos: A (RSV/A) y B (RSV/B), pertenecientes al género *Orthopneumovirus* en la familia *Pneumoviridae* y orden *Mononegavirales*, propenso a cambios genéticos (Afonso et al., 2016).

Morfología estructural: Es una partícula viral pleomórfica, con un diámetro de 50 nm aproximadamente y una longitud de 1 a 10 μm , mientras que el virus envuelto va de 150 a 250 nm de diámetro.

El virus contiene un genoma RNA monocatenario, de sentido negativo, no segmentado y de aproximadamente 15,2 kb, es decir 15.200 nucleótidos. El genoma completo está segmentado en 10 genes que codifican 11 proteínas en total, 2 proteínas no estructurales y 9 proteínas estructurales. Esto es debido a que el gen M2 contiene dos marcos de lectura abierto que se superponen codificando a dos proteínas distintas M2-1 y M2-2 (Birmingham y Collins, 1999).

1.2.2.1 Genómica funcional del RSV

A continuación, se abordará la función de las 11 proteínas virales codificadas en el genoma del RSV. Hay tres proteínas integrales de membrana. Primeramente la proteína más variable del RSV en cuanto a su secuencia primaria es la glicoproteína de unión (G), la cual es una proteína de membrana del tipo II altamente glicosilada que consta de 292–319 aminoácidos (aa) con un extremo citoplasmático (1–37 aa), un dominio transmembranal (38–66 aa), y el dominio extracelular en donde se encuentra el extremo carboxilo terminal (Anderson et al., 2021). Funcionalmente es relevante ya que, la glicoproteína G, según estudios en animales regula la respuesta del huésped que contribuye a la inflamación y la enfermedad, y la unión de la proteína G con el anticuerpo previene gran parte de esta enfermedad (Miao et al., 2009). Adicionalmente, como primer paso en la infección de las células, la glicoproteína G media la unión a CX3CR1 en células

epiteliales primarias de las vías respiratorias humanas *in vitro* y el anticuerpo anti-G neutraliza eficazmente el RSV en estas células (Jonhson et al., 2015; Anderson et al., 2021).

Las otras dos proteínas de membrana son la proteína de fusión (F) y la proteína hidrofóbica pequeña (SH), la cual inhibe la señalización del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Fuentes et al., 2007). Además, existe la proteína de envoltura interna de la de la matriz (M), la cual es indispensable para la replicación y el ensamblaje viral (Teng y Collins, 1998) y la proteína M2-1 que es un factor de procesividad y antiterminación transcripcional (Fearn y Collins, 1999), mientras que la proteína M2-2 que es un factor de regulación involucrado en el equilibrio entre replicación y transcripción del RNA (Bermingham y Collins, 1999). Existen tres proteínas asociadas a la nucleocápside. La nucleoproteína (N) es una proteína estructural muy conservada y es esencial para la encapsulación viral al proteger todo el genoma de RNA y formar la ribonucleoproteína RNP (Challa et al., 2015). La fosfoproteína (P) al igual que otras proteínas P de paramyxovirus muy probablemente es un cofactor que sirve para estabilizar a la proteína L y colocar la polimerasa en el complejo RNP (Horikami et al., 1992). La RNA polimerasa viral (L) es dependiente de RNA y contiene múltiples actividades enzimáticas requeridas para la replicación de RSV (Tiong-Yip et al., 2014) y dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2 las cuales se han relacionado con la evasión de la respuesta inmune innata al inhibir la expresión de Stat2 y la respuesta del interferón Alfa y Beta (Lo et al., 2005).

Las proteínas F y G son importantes desde el punto de vista antigénico porque poseen la capacidad de generar de respuestas inmunitarias protectoras. Las respuestas a la proteína F incluyen respuestas de linfocitos T humorales y citotóxicas (Cherrie et al., 1992). Similarmente a lo que ocurre con otros paramixovirus la glicoproteína de fusión F del RSV conserva su estructura y función siendo transmembrana de tipo I con una secuencia señal N-terminal escindida y un anclaje transmembrana cerca del extremo C. Después de la

síntesis y modificación mediante la adición de azúcares unidos en el extremo amino terminal, se escinde en dos subunidades, F1 y F2, que están unidas por enlaces disulfuro (Collins et al., 1996).

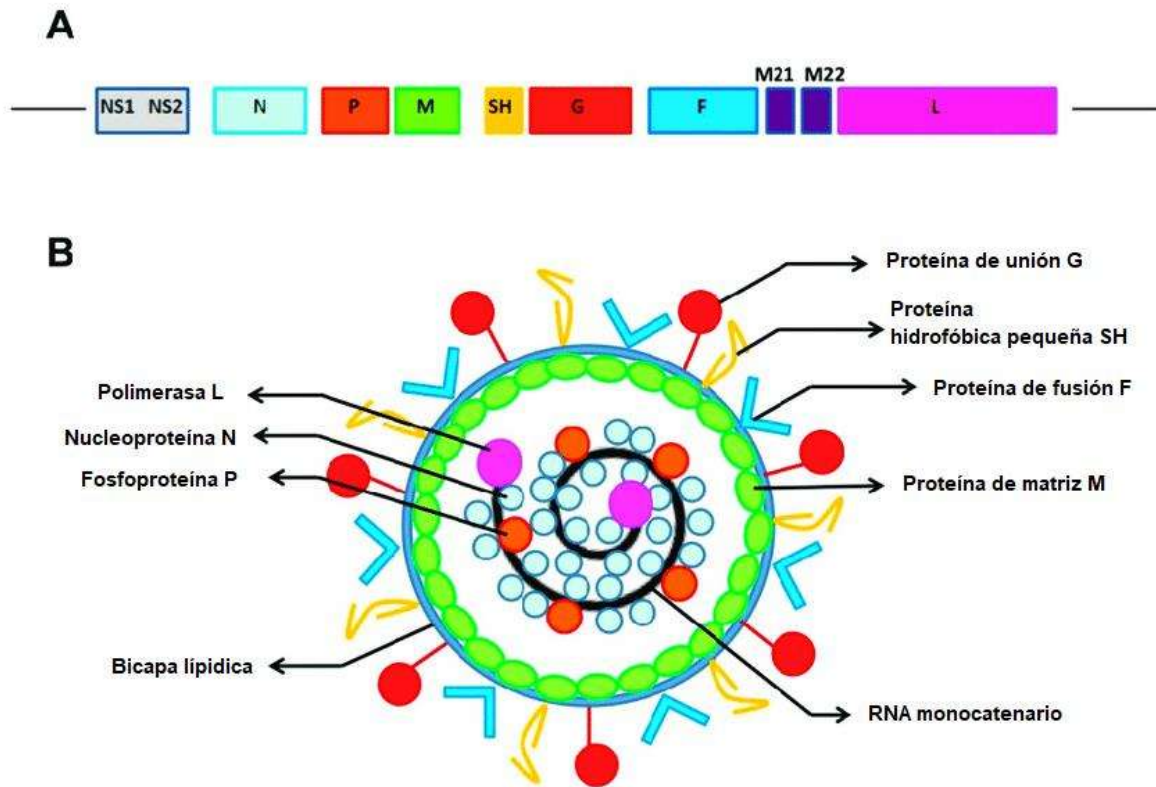


Figura 1. Estructura genómica y del virión del RSV. Se muestra una representación genómica de los genes codificantes presentes en el genoma de RNA del RSV (A), representación del virión del RSV (B). Modificado de Rocca et al., 2021.

1.2.2.2 Cambios genéticos del RSV a través del tiempo

El RSV humano se divide en dos grupos antigénicos (A y B) de acuerdo con las diferencias que presenta en la glicoproteína de unión G. La proteína G es la que presenta mayor variabilidad genética, cuenta con una región central altamente conservada y dos regiones hipervariables que es donde se encuentran la mayoría de las diferencias antigénicas (Yu et al., 2021).

Se han realizado varios estudios para determinar las tasas de mutación relativas de las cepas de RSV y han mostrado tasas que oscilan entre 10^{-3} y 10^{-4} sustituciones de nucleótidos/sitio/año, dependiendo de la ubicación y la cepa (Zlateva et al., 2004; Pandya et al., 2019).

El grupo RSV/A se clasifica en 9 genotipos (GA1-GA7, SAA1, y NA1) (Muñoz-Escalante et al. 2019), mientras que el grupo RSV/B se subdivide al menos en 37 genotipos descritos en la literatura (GB1, GB2, GB3, GB4, GB5, GB6, GB12, GB13, SAB1, SAB2, SAB3, SAB4, URU1, URU2, CB1, THB, BA1, BA2, BA3, BA4, BA5, BA6, BA7, BA8, BA9, BA10, BA11, BA12, BA13, BA14, BA-Ly, BA-C, BA-CCA, BA-CCB, JAB1, NZB1 y NZB2) (Muñoz-Escalante et al. 2021).

Se ha observado que ambos grupos circulan al mismo tiempo en años sucesivos sin embargo se ha observado que el grupo A predomina ante el grupo B. Durante los años 2011 y 2014 destaca la prevalencia de un único genotipo RSV/A NA1 y RSV/B BA9 (Muñoz-Escalante et al. 2019).

Se han logrado identificar algunas modificaciones genéticas únicas en el gen G del RSV como lo es la duplicación de 72 nucleótidos pertenecientes al grupo A y la duplicación de 60 nucleótidos en el grupo B la cual fue designada como ON1 y BA (Eshaghi., et al. 2012; Trento et al. 2015)

Estudios recientes demuestran que en el grupo de RSV/A se encontró que el genotipo con mayor duración epidémica fue GA5, sin embargo, desapareció en el año 2015, por otro lado, los genotipos GA7, GA6 y SAA1 prevalecieron antes y durante la década de 1980, los genotipos GA4 Y GA1 prevalecieron antes de 2000, GA3 antes de 2010, GA2 prevaleció durante 2001 y 2014 mientras que el único genotipo desde el 2015 ha sido NA1 (Yu et al., 2021)

En lo que respecta al grupo de RSV/B los genotipos que predominaron durante la etapa inicial correspondiente a la década de 1970 y 1980 fueron los genotipos BA (BA1-BA14), GB1, GB2, GB4 y NZB2, en la década de 1990 a 2000 los genotipos que prevalecieron fueron SAB1-4 y durante los últimos 20 años desde 2015 el único genotipo prevalente es BA9 (Yu et al., 2021)

Sin embargo, un estudio recientemente realizado en 2022 en Austria en muestras de RSV demostraron un clado predominante del RSV/B donde lograron identificar mutaciones en la glicoproteína de unión G, la glicoproteína de fusión F, la proteína M2 y la proteína L, tal mutación revela que la distancia patrística entre este clado y los demás es de 0,032 lo que indica un nuevo linaje de RSV/B (linaje GB5.0.6a) que no había sido detectado antes de 2021 (Redlberger-Fritz et al., 2023)

1.2.2.3 Métodos de detección de RSV

Existen 4 métodos principales para el diagnóstico y detección de RSV: cultivo, detección de antígenos mediante ensayo enzimático o inmunofluorescencia (sensibilidad del 75% al 95%), detección de RNA mediante PCR por transcripción inversa (RT-PCR) (sensibilidad del 97.5%), serología de IgM específica del RSV o diagnóstico por aumento de anticuerpos IgG específicos por RSV entre los sueros de fase aguda y convalecencia (Falsey y Walsh., 2000)

1.2.3 Importancia epidemiológica del RSV

El RSV es un virus estacional altamente contagioso y de los patógenos virales principales causantes de hospitalización por infección viral del tracto respiratorio inferior (IVRI) incluidas neumonía y bronquiolitis en bebés en su primer año de vida (Pandya et al., 2019; Baraldi et al., 2022)

Los bebés prematuros con enfermedad pulmonar crónica, cardiopatía congénita o alguna inmunodeficiencia tienen un mayor riesgo de mortalidad y manifestaciones graves por RSV, provocando consecuencias agudas a largo plazo para los pulmones en desarrollo (Boyce et al., 2000; Blanken et al., 2013)

Las infecciones por RSV es la causa responsable de bronquiolitis en un 60-80% de los casos y hasta el 40% de neumonía pediátrica (Salón., 2001; Hall et al., 2009)

Los brotes por RSV inician generalmente en la época de invierno durante los meses de noviembre o diciembre alcanzando su pico máximo en el mes de enero,

febrero y terminando en la temporada cálida durante los meses de marzo y abril, siguiendo una tendencia impulsada por el clima (Pitzer et al., 2015)

La forma en la que el RSV se transmite es a través de la saliva o moco en forma de gotitas en el aire o por el contacto directo con fómites de áreas contaminadas. La inoculación del virus se realiza a través de la mucosa nasofaríngea o de las membranas conjuntivales. La incubación en la nasofaringe es de 5 días mientras que el virus se propaga por medio del movimiento ciliar, transmisión intracelular o aspiración de secreciones nasofaríngeas al resto de las vías respiratorias (Shigueta et al., 1968).

RSV causa un efecto citopático en las células epiteliales de las vías respiratorias del huésped, causando destrucción epitelial y pérdida del movimiento ciliar (Shigueta et al., 1968).

El tratamiento indicado para la infección por RSV consiste en mantener una adecuada hidratación y oxigenación en el paciente, ya que actualmente no existen medicamentos específicos disponibles, la oxigenación puede administrarse mediante presión positiva continua en las vías respiratorias o terapia con cánula nasal de alto flujo dependiendo la gravedad de la enfermedad (Turnham et al., 2017). Los corticoesteroides y broncodilatadores han demostrado no ser eficientes cuando se presenta bronquiolitis por RSV, por lo que no es una terapia que se recomiende (Instituto Nacional para la Excelencia en la Atención y la Salud (NICE Estados Unidos)., 2021)

La tasa de hospitalizaciones por RSV a nivel mundial es de 1,2% y 1,6%, las infecciones virales del tracto respiratorio inferior son la principal causa de muerte en niños de 1-59 meses, a nivel mundial el RSV causa 600,000 muertes de niños hospitalizados menores de 5 años cada año, siendo la principal causa de hospitalización infantil en el mundo por infección respiratoria aguda baja (IRAB) y la segunda causa de muerte en bebés después de la malaria (Shi et al., 2017).

La tasa de letalidad de bebés hospitalizados por RSV es de 2-3 % y la tasa de mortalidad es 10 veces más alta que las de los bebés infectados por el virus influenza (Thomson et al., 2003)

Actualmente solo se ha probado un solo anticuerpo monoclonal contra las infecciones por RSV, provocando una urgente necesidad a nivel mundial en el desarrollo de vacunas para el gran número de niños que podrían beneficiarse con ello. La única profilaxis aprobada actualmente para la prevención del RSV es la vacuna palivizumab sin embargo es un tratamiento preventivo limitado únicamente a bebés que nacen con un tiempo de gestación menor o igual a 35 semanas o niños menores a 2 años que presentan enfermedad pulmonar crónica o una enfermedad cardíaca congénita (Baraldi et al., 2022)

1.2.4 Brote mundial RSV 2022-2023

Durante el otoño de 2022 la incidencia del RSV aumentó de manera repentina en varios países a nivel mundial, esto llamó la atención de la comunidad científica ya que tuvo un inicio más temprano de lo habitual en múltiples lugares del mundo, este aumento se manifestó después de una larga temporada sin casos detectados como resultado de las medidas tomadas a consecuencia de la pandemia que atravesó el mundo durante 2020-2022 por COVID-19 causada por el virus de SARS-CoV-2, lo cual llevó a la comunidad científica a realizar análisis epidemiológicos y filogenéticos de secuencias de muestras respiratorias recolectadas de RSV, los cuales demostraron que la falta de exposición prolongada a este virus provocó una disminución de la inmunidad específica, provocando un inicio estacional atípico en comparación a años anteriores, asimismo reveló que tal aumento durante 2022 fue impulsado por el subtipo RSV/B ya que en las secuencias obtenidas correspondía y predominaba el genotipo GB5.0.5a (BA9) de RSV, de manera similar se observó que las muestras analizadas del subtipo RSV/A correspondían al genotipo GA2.3.5 (ON1) (Gordon et al., 2023; Redlberger-Fritz et al., 2023)

1.2.5 Métodos moleculares para la detección de los grupos antigénicos RSV/A y RSV/B

A través de los años, ha sido necesario el estudio de los dos grupos antigénicos del RSV, esto con el objetivo de conocer la epidemiología del virus y lo que a su vez pudiera facilitar el desarrollo de vacunas y tratamientos efectivos. De tal manera que han sido diversos grupos a nivel internacional que han desarrollado métodos moleculares efectivos para la detección de RSV/A y RSV/B, teniendo como blancos moleculares diferentes genes.

Tabla 1. Genes blanco de sistemas de detección de RSV/A y RSV/B mediante RT-qPCR

| Gen Blanco | Referencia |
|-------------------|------------------------|
| N | Wang et al. 2019 |
| F | Halabi et al., 2022 |
| N | Van Elden et al., 2003 |
| F | Hu et al., 2003 |
| L | Todd et al., 2021 |

Debido a la evolución molecular que presentan los virus RNA, como es el caso, existe el riesgo inherente para cualquier sistema de detección basado en RT-qPCR de que con el paso del tiempo pueda dar como resultados falsos negativos.

1.2.6 Importancia del estudio de diversidad genética de los virus

Los virus RNA cuentan con una gran capacidad de variabilidad genética ya que presentan una rápida evolución y adaptación. Al caracterizar esta variabilidad genética ayuda a proporcionar información importante sobre los procesos involucrados en la evolución y epidemiología de los virus convirtiéndolo en una herramienta trascendental para el desarrollo y diseño de métodos de diagnóstico actualizados, eficientes y confiables asimismo impulsa el desarrollo de estrategias para el control de enfermedades (Rubio., et al 2013).

2. ANTECEDENTES

El virus sincitial respiratorio (RSV) es un agente muy común causante de infecciones en infantes y adultos. De particular interés en la comunidad científica fue el brote mundial 2022-2023. En el mismo sentido existen reportes que indican un constante aumento en la variabilidad genética en el virus RSV. Particularmente, cambios genéticos en el gen que codifica a la glicoproteína G, hacen posible la clasificación del virus RSV en los grupos antigénicos A y B. No existen reportes de estudios genéticos de este virus en Michoacán.

3. JUSTIFICACIÓN

El virus sincitial respiratorio (RSV) es un agente infeccioso con relevante importancia epidemiológica debido a su alta prevalencia e incidencia actual en la población. La generación y validación de un nuevo método molecular de detección mediante RT-qPCR múltiplex para la identificación de los grupos antigénicos RSV/A y RSV/B permitirá estudiar genéticamente por primera vez a este virus en muestras del estado de Michoacán.

4. HIPÓTESIS

Los grupos antigénicos A y B se encontraron circulando en el brote 2022-2023 del virus sincitial respiratorio humano en Michoacán.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

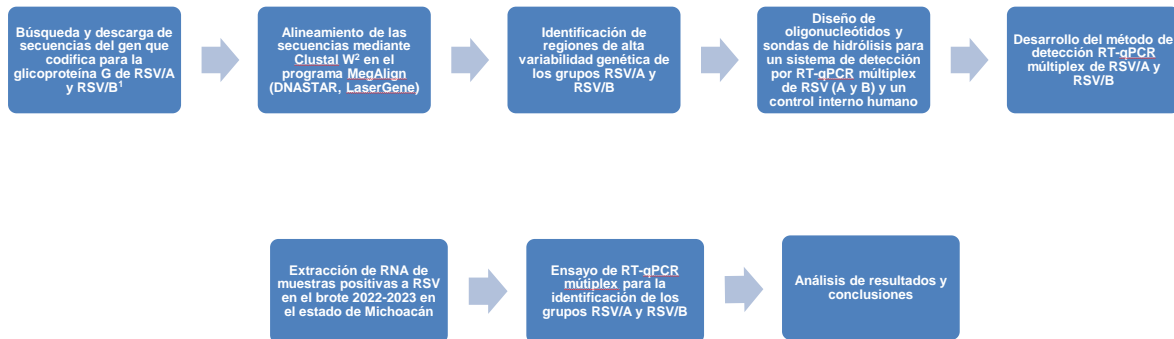
Identificar los grupos antigénicos A y B del virus sincitial respiratorio humano en el brote 2022-2023 en Michoacán, México.

5.2 Objetivos Particulares

1.- Diseñar un sistema de identificación de los grupos antigénicos A y B del virus sincitial respiratorio humano mediante RT-qPCR múltiplex.

2.- Identificación de los grupos A y B del virus sincitial respiratorio humano en el brote 2022-2023 en Michoacán, México.

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL GENERAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Análisis bioinformático para la búsqueda de secuencias codificantes para la glicoproteína G de RSV/A y RSV/B

La glicoproteína G es un elemento crucial en la regulación de la virulencia del RSV debido a que es indispensable para la adhesión del virus a las diferentes líneas celulares del huésped. Además de lo anterior, la diversidad genética que presenta esta proteína confiere diferentes propiedades antigénicas. De tal manera que el primer paso metodológico de la presente investigación consistió en buscar y descargar secuencias recientes de genes codificantes para la glicoproteína G, de los dos grupos antigénicos que presenta el virus (A y B). Para lo anterior, se hizo una revisión extensa de la literatura y se identificó un estudio reciente en donde se reportó la secuenciación completa de genomas de RSV de ambos grupos antigénicos (Goya et al., 2023). Haciendo uso de la base de datos de la Biblioteca Nacional de Medicina (NIH), del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI), del Gobierno de Estados Unidos de América, en la sección de información de nucleótidos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), procedimos a hacer una búsqueda y descarga de 20 secuencias codificantes para el gen G del grupo antigénico A y 20 secuencias codificantes para el gen G del grupo antigénico B,

reportadas recientemente por Goya et al., 2023. Dichas secuencias fueron guardadas en formato fasta en el programa EditSeq (DNASTAR, LaserGene) y nombradas con su grupo antigénico y número de acceso.

7.2 Alineamiento de secuencias codificantes para la glicoproteína G de RSV/A y RSV/B en el programa MegAlign

El alineamiento de las secuencias codificantes para el gen G de los grupos antigénicos A y B del RSV se realizó para identificar regiones con alta variabilidad genética y que fuera factible para el diseño de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis. Para lo anterior se hizo uso del programa bioinformático MegAlign (DNASTAR, LaserGene), empleando el algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994) y usando las cuarenta secuencias codificantes para el gen G de los grupos antigénicos A y B del RSV, descritas en el paso anterior (Goya et al., 2023).

7.3 Diseño bioinformático de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis para un sistema de detección por RT-qPCR múltiplex de RSV/A y RSV/B y un control interno humano

Una vez que las regiones de alta variabilidad genética de los grupos antigénicos A y B del RSV fueron identificadas se procedió a emplear dichas regiones como candidatas para el diseño de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis. Para el caso del control interno humano se utilizó el gen normalizador que corresponde a la RNASA llamada RNASE P (Hummel et al., 2006) al cual se le asignó el fluoróforo CAL Fluor Red 610. Lo anterior se realizó mediante el uso del programa bioinformático Real Time Design de la compañía BioSearch Technologies (Novato, California, Estados Unidos de América). Las consideraciones que seguimos para el diseño de las sondas se explican a continuación:

Consideraciones en el diseño de sondas de hidrólisis acopladas a un apagador o quencher (sondas BHQ):

1. Considerar una longitud de la sonda típicamente entre 20 y 30 bases. Las sondas BHQ que tienen una longitud mayor a 30 bases pueden tener una menor eficiencia de funcionamiento del apagador o quencher.
2. Establecer un porcentaje GC% en la sonda BHQ de entre 30% y 80% (Ma y Chung, 2014).
3. Evitar segmentos con nucleótidos idénticos.
4. No colocar una guanósina en el extremo 5' de la sonda BHQ. Esto debido a que una guanósina al lado del reportero químico fluorescente alterara la fluorescencia (Nazarenko et al., 2002).
5. Evitar una guanósina en el extremo 3' de la sonda BHQ (por ejemplo 5'-...GGG-3' o 5'-...GGAG-3') (Althaus et al., 2010).
6. Evitar 4 guanósinas consecutivas ya que pueden formar una estructura secundaria estable (Beaudoin y Perreault, 2010)
7. Para sondas BHQ con etiqueta de FAM, evitar una guanósina en la segunda posición en el extremo 5' (Livak et al., 1995; Lunge et al., 2002).

7.4 Origen de las muestras y extracción de RNA viral

1. Origen de las muestras

El presente estudio se realizó empleando 265 exudados nasofaríngeos de pacientes con resultado positivo a RSV, procedentes de las 8 Jurisdicciones Sanitarias del Estado de Michoacán. Las pruebas diagnósticas se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán mediante la técnica de RT-qPCR. El reactivo empleado para este diagnóstico fue Allplex SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay (Seegene, Corea del Sur) y el periodo en el que las muestras fueron tomadas y procesadas estas muestras corresponde al periodo comprendido entre Abril 2022 a Enero de 2023. El procesamiento de estas muestras se realizó respetando los lineamientos de respetando los lineamientos del diagnóstico molecular de virus respiratorios (Lineamiento Estandarizado para la Vigilancia Epidemiológica y por Laboratorio de la enfermedad respiratoria viral, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud), al igual se respetaron los lineamientos de

bioseguridad internacionales vigentes y se obtuvo la aprobación del Comité de Investigación y ética en Investigación del Laboratorio Estatal de Salud Pública para la realización de esta investigación.

Todas las muestras con un resultado positivo a RSV fueron sometidas a un proceso de extracción de ácidos nucleicos mediante un sistema semiautomatizado de perlas magnéticas como se describe a continuación:

- Organización de las muestras: Se ordenaron las muestras de forma ascendente y se agruparon para cada diagnóstico de acuerdo a las especificaciones del sistema de extracción semiautomatizado B 200-32 (ZYBIO, Chongqing, China).
- Encendido y programación del equipo EXM3000: se encendió el equipo EXM3000 presionando el interruptor de encendido ubicado en la parte posterior. Se eligió en la pantalla táctil la opción de “Run” en la esquina superior izquierda, posteriormente se eligió la opción Zybio-B200-32.
- Preparación del kit de extracción: se abrió la caja del kit de extracción, identificando la placa de extracción de 96 pozos, mangas de extracción y la proteinasa K. Una placa de extracción precargada fue suficiente para realizar la purificación de 16 muestras. Se homogeneizó el contenido de la placa de extracción al voltearla de arriba abajo y dejando que el líquido descendiera hasta el fondo de los pozos como se muestra en la imagen:

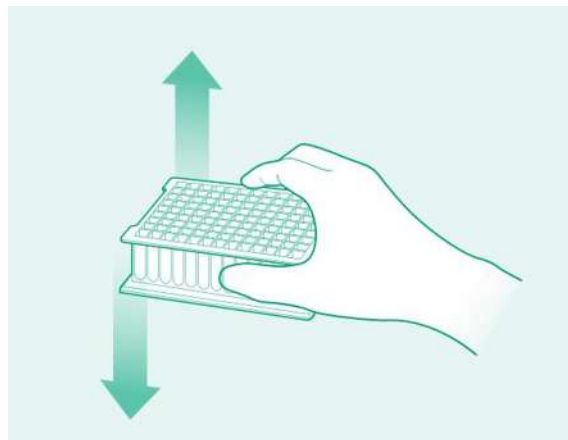


Figura 2. Preparación de las placas precargadas de 96 pozos.

Esperamos 5 minutos antes de poder usarla posteriormente se rotuló la placa de 96 pozos de forma manual indicando fecha y número consecutivo.

- Carga de muestras: En un gabinete de seguridad biológica se abrió la placa de 96 pozos retirando la película de aluminio adherida. Se identificaron los pozos de A1 – H1 Y A7 - H7. A continuación se colocaron 15 μ L de proteinasa K en los pozos a trabajar, como se ilustra a continuación:

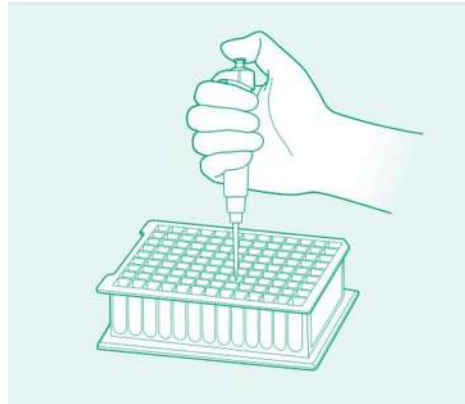


Figura 3. Carga de muestra en las placas precargadas de 96 pozos.

En seguida, se colocaron 200 μ l de muestra o control negativo de extracción en los pozos A1- H1 y A7- H7. Las placas se cubrieron con un cubretapas de acrílico para transferirlas al equipo EXM3000.

- Puesta en marcha: Se abrió la puerta frontal del equipo de extracción EXM3000 y se colocó en uno de los dos espacios designados la placa previamente cargada en el paso anterior y se removió la tapa de acrílico. Se colocó la manga protectora en la estructura magnética. Se cerró la puerta frontal. Una vez elegido el programa Zybio-B200-32, se selecciona la opción “Confirm”, y se inicia la corrida, que tiene una duración de 9 minutos.

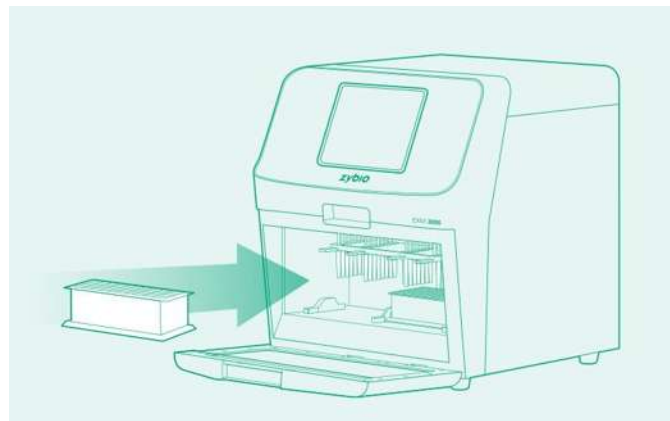


Figura 4. Introducción de la placa al equipo EXM3000 e inicio de la corrida.

- Concluir extracción: Al finalizar el proceso de extracción se retiraron las placas de extracción, como lo ilustra la **Figura 4**. Además, se desecharon los consumibles que resultaron contaminados durante el proceso, activamos la luz UV del EXM3000 por 30 minutos y posteriormente apagamos el equipo. Las muestras enriquecidas con ácidos nucleicos listas para ensayos analíticos posteriores se encontraban en los pozos A6- H6 y A12-H12.



Figura 5. Retiro de la placa del equipo EXM3000 y fin de corrida.

7.5 Preparación de mezcla maestra

Cada 25 μ l de volumen de reacción contenía 5 μ l de RNA templado , 0.5 μ l de mezcla de enzimas, 12.5 μ l de mezcla de reacción 2X, 0.5 μ l de oligonucleótido directo RSV/A 10 μ M, 0.5 μ l de oligonucleótido reverso RSV/A 10 μ M, 0.5 μ l de sonda RSV/A 5 μ M, 0.5 μ l de oligonucleótido directo RSV/B 10 μ M, 0.5 μ l de oligonucleótido reverso RSV/B 10 μ M, 0.5 μ l de sonda RSV/B 5 μ M, 0.5 μ l de oligonucleótido directo RNASE P 10 μ M, 0.5 μ l de oligonucleótido reverso

RNASE P A 10 μ M, 0.5 μ l de sonda RNASE P 5 μ M, y 2.5 μ l de agua libre nucleasa, esta mezcla fue preparada en un gabinete para PCR (UVP).

La RT-qPCR se realizó en el termociclador 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems), empleando el kit SuperScript III Platinum One-step RT-qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA).

7.6 Cargado de placas

La mezcla de reacción para RT-PCR en tiempo real múltiplex está compuesta por diversas sustancias que permitirán la detección específica de los grupos antigénicos A y B del RSV, y el control endógeno humano. Las sustancias que contiene la mezcla de reacción son oligonucleótidos y sondas de detección específicos que de acuerdo con las propiedades dinámicas de la RT-PCR en tiempo real múltiplex permitirán el diagnóstico diferencial. Para cada muestra o control a analizarse, se deben depositar 20 μ l de la mezcla de reacción explicada en el paso, dicho volumen debe depositarse en cada pocillo de las microplacas MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, para PCR de 96 pozos para PCR en tiempo real (Applied Biosystems, número de referencia: 4346906), dentro del gabinete de seguridad biológica del área blanca considerando el acomodo de las muestras y controles positivos y negativos de templado y de extracción. Los controles negativos de templado y de extracción deben añadirse también en el área blanca y previamente a la adición de muestras.

Una vez cargada la mezcla maestra y los controles negativos, la placa debe cubrirse con una hoja de papel aluminio.

A fin de mantener un orden adecuado, y si es necesario trabajar con más de una placa, es importante que a cada placa se le escriba un texto que la distinga de las demás placas preparadas y las iniciales de la persona que la realizó, finalmente se pasan las placas llenas y cubiertas con papel aluminio al área de laboratorio donde se adicionará el RNA templado.

Una vez transportada al área de adición de templados la placa que contiene los pocillos con la mezcla maestra y los controles negativos, se procede al cargado de muestras. Cada pocillo tiene procedente del paso anterior 20 µl de mezcla maestra de reacción por pocillo.

El cargado se realiza dentro de un gabinete de PCR muestra por muestra o usando la pipeta multicanal de volumen variable, y empleando puntas estériles de doble filtro, siempre usando 5 µl de templado procedente del paso de extracción de RNA total por muestra que se coloca en un pocillo.

7.7 Programación de condiciones de PCR

La RT-qPCR se inició por la transcripción reversa (50°C, 30 min) y la desnaturalización inicial (95°C, 5 min), seguida por 45 ciclos de amplificación a 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, 95°C por 15 segundos. Las señales de fluorescencia fueron colectadas a cada ciclo de amplificación a 60°C.

Las curvas de amplificación fueron analizadas a longitudes de onda de absorción para RSV A: 535-556 nm (HEX); RSV B: 494-520 nm (FAM), RNASE P: 590-610 nm (CAL Fluor Red 610). Debido a que el termociclador que se utilizó (AB 7500 Fast Real-Time PCR System) no contaba con los canales de lectura HEX ni CAL Fluor Red 610 se procedió a elegir los canales equivalentes 538-554 nm (VIC) y 586-610 nm (ROX). Se eligió el color rojo para marcador de RSV A, el color azul para RSV B y el verde para RNASE P (**Figura 6**).




| Target Name | Reporter | Quencher | Color |
|-------------|----------|----------|---|
| RSV A | VIC | None |  |
| RSV B | FAM | None |  |
| RNASE P | ROX | None |  |

Figura 6. Código de colores empleados para la detección de grupos antigénicos. Fueron asignados los siguientes colores para las curvas de amplificación: rojo (gen G de RSV/A), azul (gen G de RSV/B), verde (gen RNASE P de *Homo Sapiens*).

7.8 Análisis de resultados

Las corridas de RT-qPCR se llevaron a cabo en el termociclador en tiempo real 7500 Fast (Applied Biosystems), empleando el programa 7500 Software v2.3. Los ciclos de amplificación (Cq) fueron descargados después de haber ajustado la línea basal de fluorescencia (threshold) y fueron empleados posteriormente. Las bases de datos y resultados experimentales obtenidos en este trabajo fueron registradas en hojas de cálculo (Excel, Microsoft Office 2013). Se empleó el programa GraphPad Prism 8 para generar figuras.

8. RESULTADOS

A fin de realizar el diseño de un sistema funcional de detección diferencial de los grupos antigénicos A y B del virus sincitial respiratorio humano a través de RT-qPCR multiplex, fue necesario inicialmente hacer uso de la base de datos de nucleótidos del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) del gobierno de los Estados Unidos de América (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide?cmd=search>). En un trabajo reciente de investigación sobre la genética del RSV en Estados (Goya et al., 2023), se secuenciaron y se hicieron disponibles genomas completos de RSV/A y RSV/B. De tal manera que en este trabajo se realizó la búsqueda y la descarga para RSV/A como para RSV/B de 20 secuencias codificantes para el gen G (**Tablas 2 y 3**).

Tabla 2. Secuencias codificantes en pacientes positivos al grupo antigénico A del RSV

| Número acceso (GenBank) | Fecha (Año-Mes) |
|-------------------------|-----------------|
| OP890312.1 | 2022-OCT |
| OP890314.1 | 2022-OCT |
| OP890315.1 | 2022-OCT |
| OP890316.1 | 2022-OCT |
| OP890318.1 | 2022-OCT |
| OP890319.1 | 2022-NOV |

| | |
|------------|----------|
| OP890320.1 | 2022-NOV |
| OP890322.1 | 2022-OCT |
| OP890325.1 | 2022-OCT |
| OP890327.1 | 2022-OCT |
| OP890328.1 | 2022-NOV |
| OP890329.1 | 2022-NOV |
| OP890330.1 | 2022-NOV |
| OP890331.1 | 2022-OCT |
| OP890333.1 | 2022-NOV |
| OP890334.1 | 2022-NOV |
| OP890335.1 | 2022-NOV |
| OP890336.1 | 2022-NOV |
| OP890338.1 | 2022-OCT |
| OP890339.1 | 2022-OCT |

***La totalidad de muestras corresponden a Washington, EUA (Goya et al., 2023)**

Tabla 3. Secuencias codificantes en pacientes positivos al grupo antigénico B del RSV

| Número acceso (GenBank) | Fecha (Año-Mes) |
|--------------------------------|------------------------|
| OP890341.1 | 2022-NOV |
| OP890342.1 | 2022-NOV |
| OP890343.1 | 2022-OCT |
| OP890344.1 | 2022-OCT |
| OP890345.1 | 2022-OCT |
| OP890346.1 | 2022-OCT |
| OP890347.1 | 2022-NOV |
| OP890348.1 | 2022-NOV |
| OP890349.1 | 2022-OCT |
| OP890350.1 | 2022-OCT |

| | |
|------------|----------|
| OP965698.1 | 2021-AGO |
| OP965704.1 | 2022-MAR |
| OP965705.1 | 2021-AGO |
| OP965706.1 | 2021-SEP |
| OP965707.1 | 2021-SEP |
| OP965708.1 | 2022-FEB |
| OP965709.1 | 2022-FEB |
| OQ357795.1 | 2022-DIC |
| OQ357796.1 | 2022-DIC |
| OQ357797.1 | 2022-DIC |

***La totalidad de muestras corresponden a Washington, EUA (Goya et al., 2023)**

A continuación, a través del uso del programa MegAlign (DNASTAR, LaserGene) se realizó un alineamiento de las secuencias codificantes del gen G de los grupos RSV/A y RSV/B de las secuencias descritas en las Tablas 2 y 3 mediante el algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994), y se logró la identificación de regiones con alta diversidad genética entre grupos antigénicos (**Figura 7**). Dichas regiones se encuentran las posiciones 192 a 317 en el caso de RSV/A y 789 y 922 en RSV/B (**Figuras 8 y 9**). Dichas regiones se eligieron candidatas para el diseño de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis específicos para la detección molecular de RSV/A o RSV/B.

Majority

GAAGAGACATCAGCACTACACTGTTCTGCTCGCCACAGGCCTTCAGAACACACAGGTCAAAGGGACACCCCTCCC

| | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 | 790 | 800 |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| RSV_A_OP890312.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890314.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890315.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890316.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890318.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890319.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890320.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890322.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890325.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890327.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890328.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890329.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890330.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890331.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890333.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890335.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890336.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890338.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_A_OP890339.1.seq | A | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP890341.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP890342.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP890343.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP890344.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP890345.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP890346.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP890347.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP890348.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP890349.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP890350.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP965698.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP965704.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP965705.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP965706.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP965707.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP965708.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OP965709.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OQ357795.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OQ357796.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |
| RSV_B_OQ357797.1.seq | G | A | A | A | A | A | A | A |

continúa

| Majority | AXCAAATGXXX | |
|----------------------|----------------------------|-----|
| | 970 | |
| RSV_A_OP890312.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890314.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890315.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890316.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890318.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890319.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890320.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890322.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890325.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890327.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890328.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890329.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890330.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890331.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890333.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890334.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890335.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890336.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_A_OP890338.1.seq | GC AAAA TG | 965 |
| RSV_A_OP890339.1.seq | GC AAAA TGA | 966 |
| RSV_B_OP890341.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP890342.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP890343.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP890344.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP890345.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP890346.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP890347.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP890348.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP890349.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP890350.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP965698.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP965704.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP965705.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP965706.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP965707.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP965708.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OP965709.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OQ357795.1.seq | | 933 |
| RSV_B_OQ357796.1.seq | TCAT AT GCCTTAG | 954 |
| RSV_B_OQ357797.1.seq | | 933 |

Figura 7. Alineamiento genómico de los genes que codifican para la glicoproteína G de los grupos antigénico A y B del RSV. Se muestra el alineamiento mediante Clustal W (MegAlign, LaserGene, DNASTAR) de la región codificante para la glicoproteína G (gen G) de los grupos antigénicos A y B del RSV (Tablas 2 y 3 Goya et al., 2023). Se muestran nucleótidos idénticos en color negro mientras que en color blanco se muestran nucleótidos distintos.

Posteriormente, haciendo énfasis en las regiones con alta diversidad genética identificadas mediante el uso del programa RealTime Design Software (<https://www.biosearchtech.com/support/tools/design-software/realtimedesign-software>) de la empresa Biosearch Technologies (Novato, California, Estados Unidos de América) se realizó el diseño de oligonucleótidos y sondas de hidrolisis específicos para los grupos RSV/A y RSV/B. Las posiciones genómicas de los oligonucleótidos y sondas para detectar el grupo antigénico RSV/A y RSV/B fueron

localizadas mediante el alineamiento que se realizó en el programa MegAlign (DNASTAR, LaserGene) usando el algoritmo Clustal W (Figuras 8 y 9).

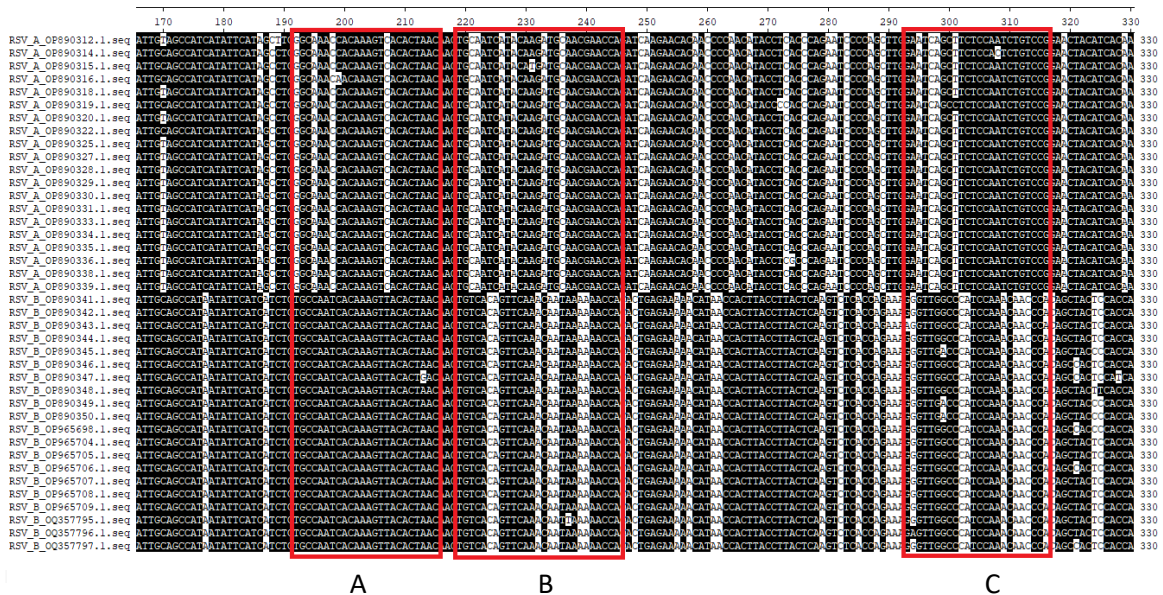


Figura 8. Ubicación genómica de oligonucleótidos y sonda de hidrólisis para la detección de RSV A. Se muestra el alineamiento mediante Clustal W (MegAlign, LaserGene, DNASTAR) de regiones polimórficas del gen que codifica a la proteína G de los grupos antigénicos A y B del virus sincitial respiratorio humano, en donde se ubican los oligonucleótidos directo (A), reverso (C) y sonda de hidrólisis (B) para la detección de RSV A. Dichos oligonucleótidos fueron diseñados mediante el software Real Time Design, (LGC, Biosearch Technologies).

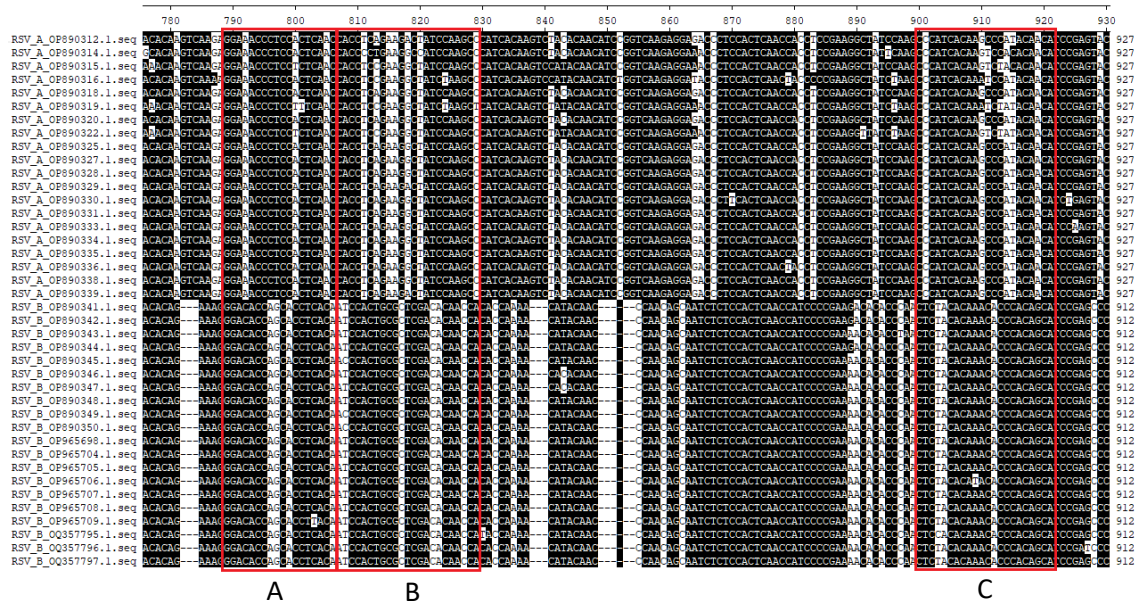


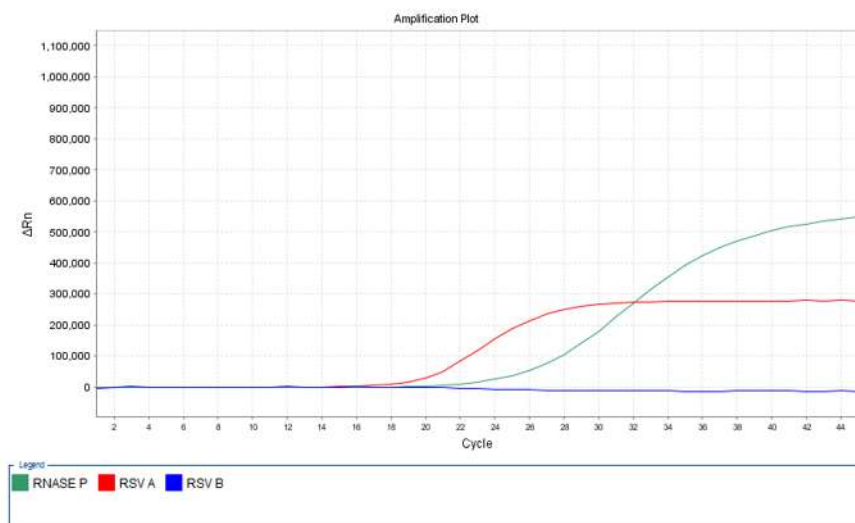
Figura 9. Ubicación genómica de oligonucleótidos y sonda de hidrólisis para la detección de RSV B. Se muestra el alineamiento mediante Clustal W (MegAlign, LaserGene, DNASTAR) de regiones polimórficas del gen que codifica a la proteína G de los grupos antigénicos A y B del virus sincitial respiratorio humano, en donde se ubican los oligonucleótidos directo (A), reverso (C) y sonda de hidrólisis (B) para la detección de RSV B. Dichos oligonucleótidos fueron diseñados mediante el software Real Time Design, (LGC, Biosearch Technologies).

Como parte del sistema de detección multiplex existe la necesidad de la inclusión de marcadores con diferentes fluoróforos, en este caso se incluyeron HEX, FAM y CAL Fluor Red 610, se muestran tamaños de amplicones y propiedades fisicoquímicas (Tabla 4).

Tabla 4. Oligonucleótidos y sondas para la detección de RSV/A Y RSV/B

| Organismo | Gen/ Número de acceso GeneBank* | 5'-Oligonucleótido directo-3' 5'-Oligonucleótido reverso-3' 5'(Fluoróforo)-Sonda de hidrólisis-3(Quencher)' | Longitud (pb),Tm (°C), GC % | Tamaño Amplicón (pb) |
|---------------------|---------------------------------|--|--|----------------------|
| RSV A | <i>gen G</i> / OP890312.1 | GGCAAACCACAAAGTCACACTAAC CGGACAGATTGGAGAAGCTGATTC HEX- TGCAATCATACAAGATGCAACGAACCA -BHQ1 | 24, 66.5, 45.8 24, 67.1, 50 27, 69.7, 40.7 | 125 |
| RSV B | <i>gen G</i> / OP890341.1 | GGACACCAGCACCTCACA TGCTGTGGGTGTTTGTGTAGAG FAM- ATCCACTGCGCTCGACACAACCA -BHQ1 | 18, 66.7, 61.1 22, 66.8, 50 23. 69.7, 56.5 | 124 |
| <i>Homo sapiens</i> | Ribonucleasa P / NM_006413.4 | AGATTTGGACCTGCGAGCG GAGCGGCTGTCTCCACAAGT CAL Fluor Red 610- TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG- BHQ2 | 19, 65.9, 57.9 20, 66.9, 60 23, 69.9, 60.9 | 65 |

A



B

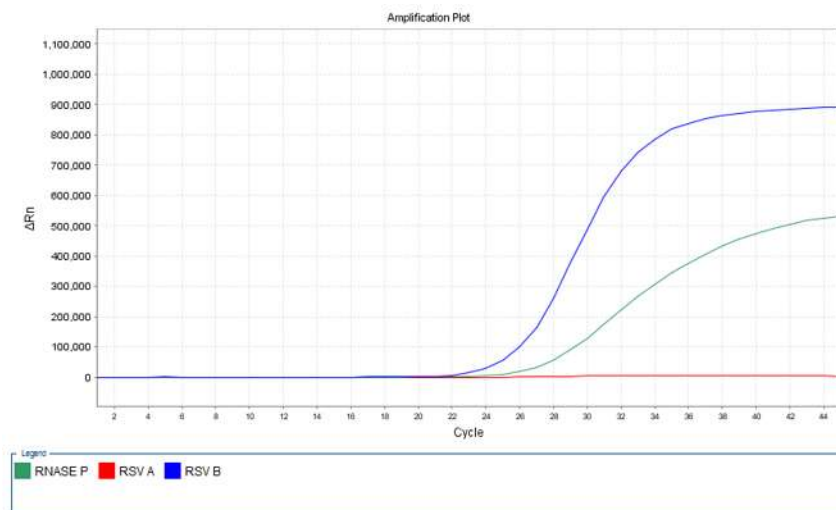
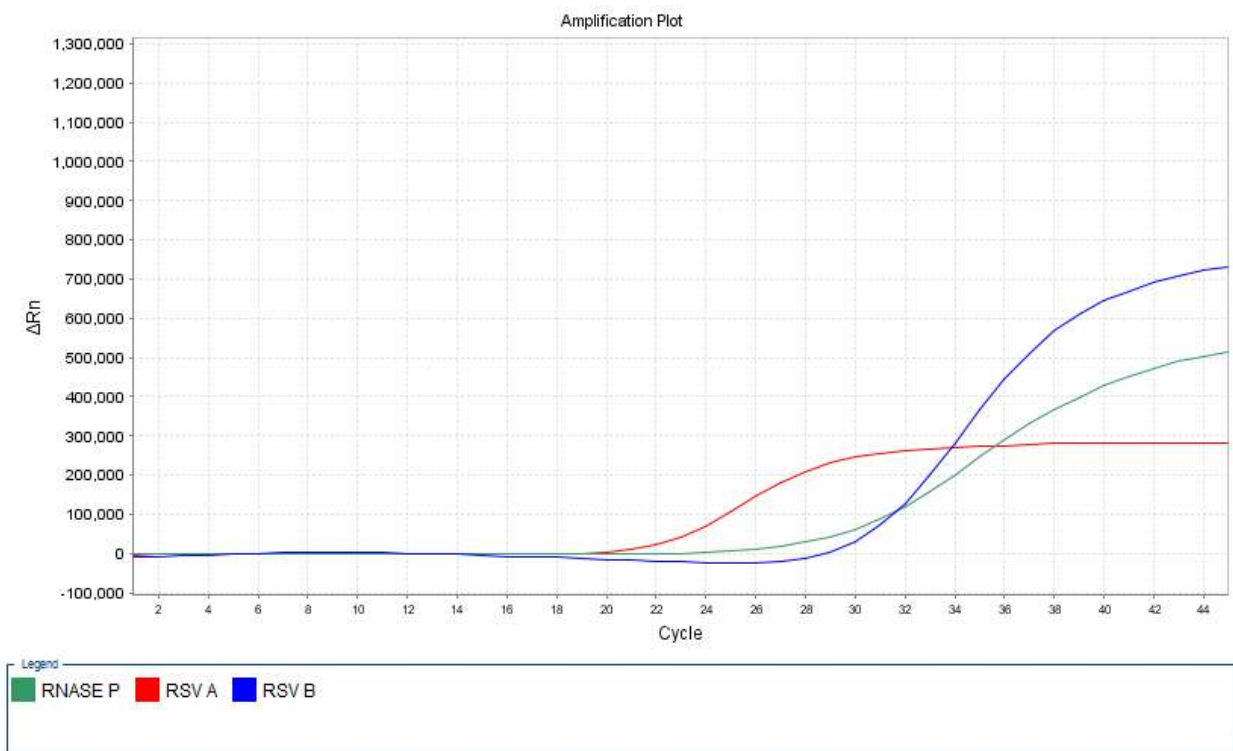


Figura 10. Gráficas de amplificación mediante RT-qPCR de muestras positivas a RSV/A y RSV/B. Se muestran las curvas de amplificación de RT-qPCR en escala lineal en color rojo (RSV A), azul (RSV/B) y verde (RNASE P control interno humano) para una muestra positiva a RSV/A (A) y RSV/B (B). Los oligonucleótidos y sondas específicos para RSV/A y RSV/B (Tabla 4) fueron dirigidos al gen G.



AB1

Figura 11. Gráfica de amplificación mediante RT-qPCR de una muestra positiva a coinfección RSV/A y RSV/B. Se muestran las curvas de amplificación de RT-qPCR en escala lineal en color rojo (RSV A), azul (RSV/B) y verde (RNASE P control interno humano). Los oligonucleótidos y sondas específicos para RSV/A y RSV/B (Tabla 4) fueron dirigidos al gen G.

A fin de comparar los resultados obtenidos por el sistema de detección propuesto en el presente trabajo, recibimos el apoyo por parte del Laboratorio de Virus Respiratorios, del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), Secretaría de Salud. Se procedió a analizar las muestras 39 (RSV/A), 58 (RSV/B) y 59 (RSV/A+ RSV/B) mediante RT-qPCR empleando el sistema propuesto por Hu et al., 2003, en este sistema los blancos moleculares corresponden al gen F. Los oligonucleótidos y sondas que se emplearon son los siguientes:

Primers:

Iniciador directo RSV/A: 5'GCTCTTAGCAAAGTCAAGTTGAATGA3'; iniciador reverso RSV/A: 5'TGCTCCGTTGGATGGTGTATT3'; sonda RSV/A: 5'6-FAM-ACA CTCAACAAAGATCAACTTCTGTCATCCAGC-TAMRA-3'; iniciador directo RSV/B

RSV/B: 5 GAT GGC TCT TAG CAA AGT CAA GTT AA 3
Forward

RSV/B: 5 TGT CAA TAT TAT CTC TAC TAC GTT GAA 3 Reverse

RSV/B: 5 6FAM TGA TAC ATT AAA TAA GGA TCA GCT GCT GTC ATC CA
TAMRA 3 Probe

Las mezclas maestras se prepararon como a continuación se explica:

Cada 25 µl de volumen de reacción contenía 5 µl de RNA templado, 0.5 µl de mezcla de enzimas qScript, 12.5 µl de mezcla de reacción 2X, 0.5 µl de oligonucleótido directo RSV/A o RSV/B 40 µM, 0.5 µl de oligonucleótido reverso RSV/A o RSV/B 40 µM, 0.5 µl de sonda RSV/A o RSV/B 10 µM, y 5.5 µl de agua libre nucleasa, esta mezcla fue preparada en un gabinete para PCR (UVP).

Las condiciones de RT-qPCR fueron las siguientes:

La RT-qPCR se inició por la transcripción reversa (50°C, 30 min) y la desnaturalización inicial (95°C, 5 min), seguida por 45 ciclos de amplificación a 95°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos. Las señales de fluorescencia fueron colectadas a cada ciclo de amplificación a 55°C.

Los resultados que se obtuvieron fueron concordantes comparando la metodología propuesta en este trabajo y la empleada en el InDRE.

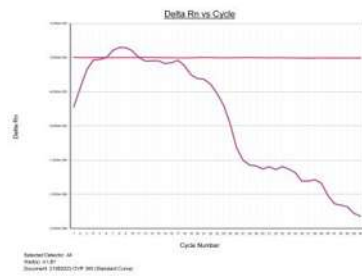
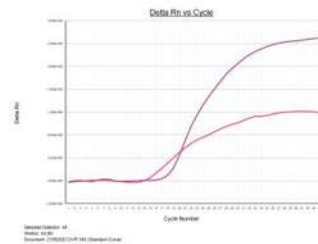
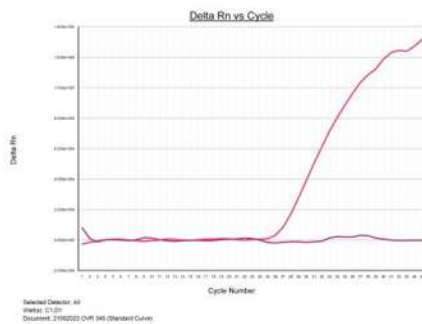
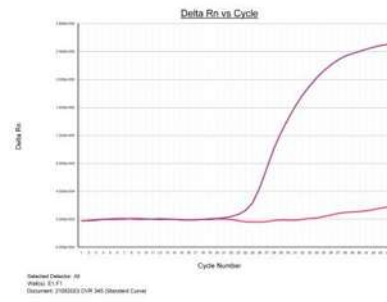
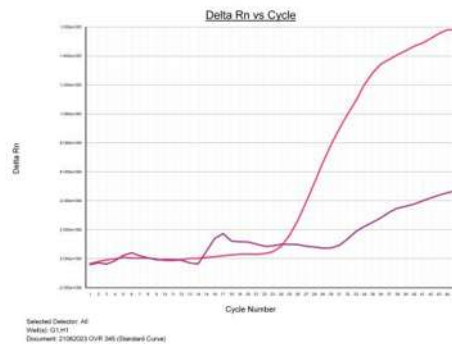
A**B****C****D****E**

Figura 12. Gráficas de amplificación mediante RT-qPCR del sistema de confirmación de detección RSV/A y RSV/B. Se muestran las curvas de amplificación de RT-qPCR obtenidas en el Laboratorio de Virus Respiratorios del InDRE, en escala lineal en color rosa (RSV A), morado (RSV/B). **(A)** Control negativo. **(B)** Control positivo. **(C)** muestra 59 positiva a RSV/A. **(D)** Muestra 59 positiva a RSV/B. **(E)** Muestra positiva a RSV/A + RSV/B.

Tabla 5. Género, edad, municipio de residencia y resultados de ciclos de amplificación mediante RT-qPCR (Cq) del gen G para muestras positivas a RSV/A y RSV/B.

| Folio | Resultado (Cq) | | Rp | Edad (años) | Sexo | Municipio de residencia (jurisdicción sanitaria) | Fecha de toma |
|-------|----------------|-------|-------|-------------|-----------|--|---------------|
| | RSV A | RSV B | | | | | |
| 1 | | 18.33 | 22.63 | 2 | Femenino | Contepec (3) | 06/04/2022 |
| 2 | | 19.26 | 25.18 | 9 | Masculino | Huetamo (3) | 21/07/2022 |
| 3 | | 18.97 | 22.71 | 1 | Masculino | Maravatío (1) | 21/07/2022 |
| 4 | | 16.1 | 25.68 | 22 | Femenino | Maravatío (1) | 15/08/2022 |
| 5 | 17.24 | | 23.12 | 1 | Masculino | Tarímbaro (1) | 27/08/2022 |
| 6 | 19.69 | | 23.01 | 85 | Femenino | Uruapan (5) | 27/08/2022 |
| 7 | 18.85 | | 24.63 | 2 | Masculino | Morelia (1) | 06/09/2022 |
| 8 | | 18.18 | 19.52 | 2 | Femenino | Contepec (3) | 14/09/2022 |
| 9 | 25.5 | | 28.12 | 31 | Masculino | Foráneo | 21/09/2022 |
| 10 | 23.57 | | 26.84 | 3 | Femenino | Morelia (1) | 29/09/2022 |
| 11 | | 17.56 | 26.34 | 3 | Femenino | Contepec (3) | 04/10/2022 |
| 12 | 18.32 | | 21.2 | 8 | Femenino | Morelia (1) | 09/10/2022 |
| 13 | 16.77 | | 21.78 | 36 | Femenino | Foráneo | 07/10/2022 |
| 14 | | 22.47 | 23.12 | 1 | Masculino | Uruapan (5) | 05/10/2022 |
| 15 | 25.05 | | 24.24 | 1 | Femenino | Uruapan (5) | 05/10/2022 |
| 16 | | 29.47 | 29.27 | 1 | Femenino | Uruapan (5) | 04/10/2022 |
| 17 | | 17.89 | 22.38 | 5 | Masculino | Erongaricuario (4) | 09/10/2022 |
| 18 | | 18.83 | 24.65 | 7 | Masculino | Morelia (1) | 09/10/2022 |

Continuación de la tabla 5

| | | | | | | | |
|----|-------|-------|-------|----|-----------|--------------------|------------|
| 19 | | 17.64 | 21.66 | 49 | Femenino | Morelia (1) | 10/10/2022 |
| 20 | 24.69 | | 23.53 | 16 | Masculino | Morelia (1) | 10/10/2022 |
| 21 | | 23.42 | 25.36 | 26 | Femenino | Morelia (1) | 10/10/2022 |
| 22 | | 21.59 | 20.38 | 53 | Femenino | Senguio (3) | 07/10/2022 |
| 23 | 19.19 | | 23.14 | 1 | Masculino | Morelia (1) | 09/10/2022 |
| 24 | | 24.48 | 25.53 | 3 | Masculino | Zacapu (4) | 10/10/2022 |
| 25 | 20.84 | | 22.18 | 50 | Femenino | Morelia (1) | 11/10/2022 |
| 26 | 17.29 | | 22.54 | 7 | Femenino | Tzintzuntzan (4) | 07/10/2022 |
| 27 | | 18.89 | 24.63 | 3 | Femenino | Zamora (2) | 12/10/2022 |
| 28 | | 28.33 | 25.54 | 1 | Masculino | Contepec (3) | 12/10/2022 |
| 29 | 20.83 | | 21.54 | 29 | Masculino | Morelia (1) | 14/10/2022 |
| 30 | 33.93 | | 27.57 | 6 | Masculino | Morelia (1) | 14/10/2022 |
| 31 | 15.94 | | 22.61 | 1 | Femenino | Pátzcuaro (4) | 14/10/2022 |
| 32 | 21.29 | | 22.49 | 6 | Femenino | Morelia (1) | 17/10/2022 |
| 33 | 22.7 | | 24.05 | 1 | Femenino | Tarímbaro (1) | 02/10/2022 |
| 34 | 22.72 | | 24.44 | 2 | Femenino | Morelia (1) | 31/10/2022 |
| 35 | 28.81 | | 26.5 | 2 | Masculino | Uruapan (5) | 02/10/2022 |
| 36 | | 19.43 | 26.11 | 2 | Femenino | Morelia (1) | 11/10/2022 |
| 37 | | 37.51 | 23.13 | 1 | Femenino | Contepec (3) | 17/10/2022 |
| 38 | 20.92 | | 25.88 | 23 | Femenino | Morelia (1) | 18/10/2022 |
| 39 | 22.81 | | 24.4 | 4 | Masculino | Morelia (1) | 30/10/2022 |
| 40 | | 22.25 | 24.52 | 1 | Femenino | Uruapan (5) | 31/10/2022 |
| 41 | 18.64 | | 23.62 | 4 | Femenino | Chilchota (2) | 14/11/2022 |
| 42 | 18.89 | | 23.69 | 2 | Femenino | Morelia (1) | 19/10/2022 |
| 43 | 18.62 | | 22.14 | 1 | Femenino | Morelia (1) | 22/10/2022 |
| 44 | 21.62 | | 23.97 | 1 | Masculino | Uruapan (5) | 16/10/2022 |
| 45 | 16.87 | | 23.26 | 1 | Masculino | Uruapan (5) | 18/10/2022 |
| 46 | 16.37 | | 20.66 | 7 | Femenino | Morelia (1) | 22/10/2022 |
| 47 | 23.05 | | 28.92 | 1 | Femenino | Morelia (1) | 22/10/2022 |
| 48 | 22.87 | | 26.96 | 1 | Masculino | San Lucas (3) | 23/10/2022 |
| 49 | 23.73 | | 25.52 | 2 | Masculino | Pátzcuaro (4) | 21/10/2022 |
| 50 | | 18.33 | 27.55 | 1 | Masculino | Gabriel Zamora (5) | 21/10/2022 |
| 51 | 26.12 | | 25.91 | 2 | Masculino | Pátzcuaro (4) | 14/10/2022 |
| 52 | 15.89 | | 23.04 | 2 | Femenino | Morelia (1) | 28/10/2022 |
| 53 | 25.24 | | 24.15 | 1 | Femenino | Uruapan (5) | 29/10/2022 |
| 54 | 23.07 | | 22.82 | 5 | Masculino | Jacona (2) | 29/10/2022 |
| 55 | 21.78 | | 26.21 | 1 | Masculino | Tarímbaro (1) | 30/10/2022 |
| 56 | | 16.7 | 22.65 | 3 | Femenino | Zitácuaro (3) | 28/10/2022 |

Continuación de la tabla 5

| | | | | | | | |
|----|-------|-------|-------|----|-----------|------------------------|------------|
| 57 | | 16.72 | 23.68 | 1 | Femenino | Zitácuaro (3) | 28/10/2022 |
| 58 | | 20.72 | 26.27 | 7 | Femenino | Zitácuaro (3) | 28/10/2022 |
| 59 | 20.36 | 29.2 | 26.52 | 2 | Masculino | Gabriel Zamora (5) | 28/10/2022 |
| 60 | | 16.14 | 21.43 | 1 | Masculino | Maravatío (1) | 02/11/2022 |
| 61 | | 20.97 | 20.92 | 1 | Femenino | Contepec (3) | 01/11/2022 |
| 62 | | 20.9 | 27.38 | 87 | Femenino | Pátzcuaro (4) | 31/10/2022 |
| 63 | | 19.47 | 22.06 | 1 | Femenino | Uruapan (5) | 01/11/2022 |
| 64 | 21.23 | | 22.64 | 1 | Femenino | Indaparapeo (1) | 31/10/2022 |
| 65 | 22.11 | | 26.66 | 1 | Masculino | Morelia (1) | 31/10/2022 |
| 66 | | 19.94 | 24.75 | 1 | Masculino | Salvador Escalante (4) | 31/10/2022 |
| 67 | 19.52 | | 21.37 | 2 | Femenino | Morelia (1) | 31/10/2022 |
| 68 | 22.15 | | 24.24 | 1 | Masculino | Morelia (1) | 01/11/2022 |
| 69 | 28.2 | | 25.75 | 40 | Femenino | Morelia (1) | 01/11/2022 |
| 70 | 17.67 | | 22.47 | 2 | Femenino | Uruapan (5) | 28/10/2022 |
| 71 | | 22.86 | 25.42 | 1 | Masculino | Uruapan (5) | 27/10/2022 |
| 72 | | 17.9 | 25.02 | 1 | Masculino | Tancítaro (5) | 02/11/2022 |
| 73 | 20.54 | | 23.29 | 3 | Masculino | Uruapan (5) | 01/11/2022 |
| 74 | 25.77 | | 28.19 | 2 | Femenino | Ziracuaretiro (5) | 29/10/2022 |
| 75 | | 15.97 | 22.18 | 1 | Masculino | Tancítaro (5) | 31/10/2022 |
| 76 | | 22.84 | 26.89 | 1 | Masculino | Uruapan (5) | 29/10/2022 |
| 77 | | 18.85 | 22.31 | 1 | Masculino | Uruapan (5) | 31/10/2022 |
| 78 | | 22.81 | 24.72 | 1 | Masculino | Morelia (1) | 05/11/2022 |
| 79 | | 26.76 | 25.6 | 1 | Masculino | Carácuaro (4) | 05/11/2022 |
| 80 | 17.02 | | 23.67 | 83 | Femenino | Cherán (5) | 05/11/2022 |
| 81 | 16.23 | | 21.75 | 6 | Masculino | Puruándiro (6) | 05/11/2022 |
| 82 | 19.35 | | 22.42 | 10 | Masculino | Morelia (1) | 04/11/2022 |
| 83 | 25.06 | | 24.11 | 26 | Masculino | Morelia (1) | 07/11/2022 |
| 84 | 22.2 | | 27.77 | 1 | Femenino | Pátzcuaro (4) | 01/11/2022 |
| 85 | 19.35 | | 23.2 | 6 | Masculino | Morelia (1) | 07/11/2022 |
| 86 | | 18.46 | 23.41 | 1 | Masculino | Pátzcuaro (4) | 05/11/2022 |
| 87 | 16.3 | | 21.9 | 1 | Femenino | Pátzcuaro (4) | 01/11/2022 |
| 88 | 27.89 | | 29.61 | 1 | Femenino | Pátzcuaro (4) | 01/11/2022 |
| 89 | 25.48 | | 22.97 | 1 | Femenino | Tacámbaro (4) | 04/11/2022 |
| 90 | 26.45 | | 26.54 | 36 | Masculino | Morelia (1) | 06/11/2022 |
| 91 | 30.69 | | 27.95 | 2 | Femenino | Jacona (2) | 04/11/2022 |
| 92 | | 18.87 | 22.67 | 1 | Masculino | Tacámbaro (4) | 03/11/2022 |

Continuación de la tabla 5

| | | | | | | | |
|-----|-------|-------|-------|----|-----------|--------------------|------------|
| 93 | 17.24 | | 21.27 | 3 | Femenino | Uruapan (5) | 06/11/2022 |
| 94 | 23.64 | | 26.27 | 1 | Femenino | Uruapan (5) | 02/11/2022 |
| 95 | 18.68 | | 22.62 | 4 | Masculino | Morelia (1) | 06/11/2022 |
| 96 | 19.94 | | 24.12 | 1 | Femenino | Morelia (1) | 08/11/2022 |
| 97 | 19 | | 23.42 | 2 | Femenino | Charo (1) | 05/11/2022 |
| 98 | 17.1 | | 22.8 | 6 | Masculino | Morelia (1) | 07/11/2022 |
| 99 | 16.61 | | 21.5 | 1 | Femenino | Morelia (1) | 05/11/2022 |
| 100 | 20.41 | | 23.7 | 1 | Masculino | Morelia (1) | 06/11/2022 |
| 101 | 20.08 | | 24.97 | 3 | Masculino | Arteaga (8) | 07/11/2022 |
| 102 | | 16.78 | 21.82 | 1 | Masculino | Tacámbaro (4) | 05/11/2022 |
| 103 | | 20.06 | 22.49 | 51 | Femenino | Uruapan (5) | 10/11/2022 |
| 104 | | 17.93 | 26.72 | 1 | Masculino | Tangamandapio (2) | 09/11/2022 |
| 105 | 19.82 | | 24.47 | 2 | Femenino | Zamora (2) | 09/11/2022 |
| 106 | 32.01 | | 25.97 | 19 | Femenino | Morelia (1) | 10/11/2022 |
| 107 | 20.22 | | 24.48 | 6 | Masculino | Turicato (4) | 11/11/2022 |
| 108 | 17.63 | | 21.17 | 3 | Femenino | Morelia (1) | 11/11/2022 |
| 109 | 23.32 | | 23.7 | 8 | Masculino | Morelia (1) | 11/11/2022 |
| 110 | 30.83 | | 25.89 | 2 | Femenino | Morelia (1) | 11/11/2022 |
| 111 | | 17.73 | 25.47 | 1 | Masculino | Ocampo (3) | 11/11/2022 |
| 112 | 20.53 | | 23.76 | 4 | Masculino | Morelia (1) | 11/11/2022 |
| 113 | 15.74 | | 19.95 | 1 | Masculino | Tacámbaro (4) | 13/11/2022 |
| 114 | 21.79 | | 25.71 | 1 | Femenino | Morelia (1) | 10/11/2022 |
| 115 | | 22.94 | 21.78 | 4 | Masculino | Maravatío (1) | 05/11/2022 |
| 116 | 17.32 | | 20.35 | 18 | Masculino | Morelia (1) | 11/11/2022 |
| 117 | 16.23 | | 20.84 | 21 | Femenino | Morelia (1) | 11/11/2022 |
| 118 | 31.02 | | 24.36 | 37 | Femenino | Morelia (1) | 14/11/2022 |
| 119 | 19.22 | | 22 | 35 | Femenino | Morelia (1) | 14/11/2022 |
| 120 | 15.75 | | 20.87 | 54 | Femenino | Morelia (1) | 14/11/2022 |
| 121 | | 22.63 | 26.04 | 1 | Masculino | Gabriel Zamora (5) | 07/11/2022 |
| 122 | | 23.05 | 22.19 | 1 | Masculino | Uruapan (5) | 04/11/2022 |
| 123 | | 27.37 | 25.58 | 1 | Femenino | Uruapan (5) | 02/11/2022 |
| 124 | | 18.21 | 24.59 | 1 | Femenino | Uruapan (5) | 07/11/2022 |
| 125 | 17.2 | | 23.48 | 1 | Masculino | Tacámbaro (4) | 12/11/2022 |
| 126 | 17.42 | | 23.83 | 3 | Femenino | Tacámbaro (4) | 11/11/2022 |
| 127 | 19.24 | | 24.78 | 1 | Masculino | Pátzcuaro (4) | 09/11/2022 |
| 128 | | 18.82 | 25.94 | 4 | Femenino | Pátzcuaro (4) | 10/11/2022 |

Continuación de la tabla 5

| | | | | | | | |
|-----|-------|-------|-------|----|-----------|-------------------|------------|
| 129 | 17.44 | | 22.3 | 1 | Masculino | Uruapan (5) | 06/11/2022 |
| 130 | 23.54 | | 23.65 | 3 | Femenino | Uruapan (5) | 10/11/2022 |
| 131 | 24.26 | | 23.49 | 1 | Masculino | Uruapan (5) | 14/11/2022 |
| 132 | 20.96 | | 26.37 | 1 | Masculino | Uruapan (5) | 08/11/2022 |
| 133 | 28.54 | | 23.21 | 3 | Femenino | Tarímbaro (1) | 10/11/2022 |
| 134 | 17.01 | | 21.83 | 2 | Masculino | Paracho (5) | 10/11/2022 |
| 135 | | 20.47 | 24.88 | 8 | Masculino | Cuitzeo (1) | 12/11/2022 |
| 136 | 27.9 | | 26.19 | 65 | Femenino | Morelia (1) | 13/11/2022 |
| 137 | 32.97 | | 24.39 | 35 | Femenino | Morelia (1) | 11/11/2022 |
| 138 | | 22.25 | 22.2 | 1 | Masculino | Chavinda (2) | 09/11/2022 |
| 139 | 16 | | 19.4 | 1 | Femenino | Zamora (2) | 13/11/2022 |
| 140 | 23.81 | | 20.4 | 3 | Femenino | Zamora (2) | 11/11/2022 |
| 141 | 19.97 | | 21.57 | 4 | Masculino | Jacona (2) | 15/11/2022 |
| 142 | 19.72 | | 22.83 | 47 | Masculino | Tuxpan (3) | 16/11/2022 |
| 143 | 21.22 | | 22.45 | 1 | Masculino | Pátzcuaro (4) | 14/11/2022 |
| 144 | 19.33 | | 23.4 | 1 | Femenino | Erongarícuaro (4) | 16/11/2022 |
| 145 | 20.83 | | 22.36 | 2 | Femenino | Pátzcuaro (4) | 16/11/2022 |
| 146 | 23.44 | | 21.68 | 1 | Masculino | Tacámbaro (4) | 14/11/2022 |
| 147 | 33.41 | | 24.36 | 59 | Masculino | Tacámbaro (4) | 13/11/2022 |
| 148 | 30.41 | | 22.35 | 84 | Femenino | Uruapan (5) | 05/11/2022 |
| 149 | 22.25 | | 24.1 | 11 | Femenino | Zitácuaro (3) | 13/11/2022 |
| 150 | 18.72 | | 23.16 | 8 | Femenino | Charo (1) | 15/11/2022 |
| 151 | 21.73 | | 24.65 | 34 | Femenino | Morelia (1) | 12/11/2022 |
| 152 | 24.8 | | 24.79 | 49 | Femenino | Tarímbaro (1) | 15/11/2022 |
| 153 | 22.13 | | 26.7 | 62 | Masculino | Morelia (1) | 11/11/2022 |
| 154 | 16 | | 20.58 | 2 | Masculino | Morelia (1) | 06/11/2022 |
| 155 | | 21.72 | 24.37 | 1 | Femenino | Tumbiscatío (8) | 21/11/2022 |
| 156 | 23.69 | | 26.45 | 1 | Masculino | Tarímbaro (1) | 21/11/2022 |
| 157 | | 27.02 | 23.54 | 19 | Femenino | Hidalgo (3) | 22/11/2022 |
| 158 | 23.73 | | 26.75 | 1 | Femenino | Huetamo (3) | 18/11/2022 |
| 159 | | 21.03 | 26.67 | 1 | Femenino | Tuzantla (3) | 16/11/2022 |
| 160 | 14.33 | | 18.29 | 1 | Masculino | Tacámbaro (4) | 20/11/2022 |
| 161 | 27.72 | | 22.53 | 3 | Masculino | Zamora (2) | 20/11/2022 |
| 162 | 20.75 | | 23.93 | 1 | Masculino | Jacona (2) | 18/11/2022 |
| 163 | 17.59 | | 23.29 | 1 | Femenino | Zamora (2) | 18/11/2022 |
| 164 | 20.52 | | 26.31 | 78 | Femenino | Uruapan (5) | 19/11/2022 |
| 165 | 19.9 | | 24.31 | 48 | Masculino | Morelia (1) | 24/11/2022 |

Continuación de la tabla 5

| | | | | | | | |
|-----|-------|-------|-------|----|-----------|------------------------|------------|
| 166 | 25.25 | | 23.67 | 20 | Masculino | Morelia (1) | 24/11/2022 |
| 167 | | 26.63 | 25.5 | 2 | Masculino | Uruapan (5) | 20/11/2022 |
| 168 | 32.41 | | 24.44 | 1 | Masculino | Tarímbaro (1) | 23/11/2022 |
| 169 | | 29.66 | 32.63 | 1 | Masculino | Salvador Escalante (4) | 18/11/2022 |
| 170 | 21.83 | | 23.91 | 1 | Masculino | Pátzcuaro (4) | 18/11/2022 |
| 171 | 21.92 | | 22.05 | 29 | Masculino | Foráneo | 24/11/2022 |
| 172 | 20.84 | | 24.89 | 1 | Masculino | Morelia (1) | 24/11/2022 |
| 173 | 18.68 | | 23.64 | 1 | Masculino | Charo (1) | 24/11/2022 |
| 174 | 20.71 | | 21.82 | 2 | Femenino | Zinapécuaro (1) | 25/11/2022 |
| 175 | 19.15 | | 24.06 | 62 | Masculino | Morelia (1) | 25/11/2022 |
| 176 | 33.09 | | 26.93 | 38 | Masculino | Uruapan (5) | 21/11/2022 |
| 177 | | 17.31 | 23.56 | 3 | Masculino | Zamora (2) | 20/11/2022 |
| 178 | 26.94 | | 26.84 | 4 | Femenino | Zinapécuaro (1) | 23/11/2022 |
| 179 | | 30.28 | 26.75 | 1 | Masculino | Uruapan (5) | 18/11/2022 |
| 180 | | 18.57 | 23.45 | 1 | Masculino | Uruapan (5) | 21/11/2022 |
| 181 | 18.69 | | 23.25 | 1 | Masculino | Salvador Escalante (4) | 24/11/2022 |
| 182 | 17 | | 24.01 | 1 | Masculino | Zamora (2) | 25/11/2022 |
| 183 | 17.33 | | 23.92 | 53 | Masculino | Morelia (1) | 25/11/2022 |
| 184 | 28.88 | | 27.74 | 24 | Femenino | Tarímbaro (1) | 29/11/2022 |
| 185 | 23.04 | | 28.53 | 47 | Masculino | Morelia (1) | 29/11/2022 |
| 186 | | 18.46 | 22.05 | 1 | Masculino | Maravatío (1) | 22/11/2022 |
| 187 | 18.28 | | 24.81 | 1 | Masculino | Morelia (1) | 26/11/2022 |
| 188 | 19.6 | | 26.22 | 1 | Masculino | Morelia (1) | 26/11/2022 |
| 189 | 30.57 | | 28.7 | 53 | Masculino | Morelia (1) | 30/11/2022 |
| 190 | | 17.72 | 28.07 | 40 | Femenino | Morelia (1) | 30/11/2022 |
| 191 | 23.41 | | 23.28 | 3 | Femenino | Nahuatzen (5) | 29/11/2022 |
| 192 | 21.08 | | 23.12 | 7 | Femenino | Pátzcuaro (4) | 30/11/2022 |
| 193 | 19.12 | | 23.98 | 73 | Femenino | Lagunillas (4) | 30/11/2022 |
| 194 | 18.89 | | 23.87 | 1 | Femenino | Indaparapeo (1) | 04/12/2022 |
| 195 | 18.15 | | 21.64 | 3 | Masculino | Queréndaro (1) | 03/12/2022 |
| 196 | 29.08 | | 24.52 | 3 | Masculino | Morelia (1) | 03/12/2022 |
| 197 | 18.58 | | 23.97 | 24 | Femenino | Morelia (1) | 05/12/2022 |
| 198 | 30.96 | | 24.02 | 53 | Femenino | Morelia (1) | 05/12/2022 |
| 199 | | 26.94 | 27.19 | 52 | Femenino | Uruapan (5) | 02/12/2022 |
| 200 | 23.22 | | 28.36 | 2 | Femenino | Salvador Escalante (4) | 04/12/2022 |

Continuación de la tabla 5

| | | | | | | | |
|-----|-------|-------|-------|----|-----------|------------------------|------------|
| 201 | 18.91 | | 24.97 | 1 | Masculino | Pátzcuaro (4) | 01/12/2022 |
| 202 | 18.91 | | 25.06 | 1 | Masculino | Hidalgo (3) | 30/11/2022 |
| 203 | 21.34 | | 24.63 | 45 | Femenino | Morelia (1) | 04/12/2022 |
| 204 | | 22.39 | 27.21 | 1 | Femenino | Zamora (2) | 03/12/2022 |
| 205 | 18.76 | | 21.78 | 1 | Masculino | Chilchota (2) | 03/12/2022 |
| 206 | | 29.39 | 23.65 | 1 | Femenino | Ocampo (3) | 03/12/2022 |
| 207 | | 21.9 | 23.9 | 1 | Masculino | Zitácuaro (3) | 03/12/2022 |
| 208 | | 17.46 | 24.07 | 1 | Femenino | Tuzantla (3) | 01/12/2022 |
| 209 | 19.57 | | 25.37 | 1 | Femenino | Angangueo (3) | 03/12/2022 |
| 210 | | 24.37 | 27.95 | 1 | Masculino | Zitácuaro (3) | 03/12/2022 |
| 211 | 21.51 | | 25.45 | 1 | Masculino | Uruapan (5) | 27/11/2022 |
| 212 | 25.63 | | 24.69 | 1 | Masculino | Apatzingán (7) | 01/12/2022 |
| 213 | 16.3 | | 20.06 | 5 | Masculino | Uruapan (5) | 02/12/2022 |
| 214 | 22.24 | | 23.54 | 2 | Masculino | Salvador Escalante (4) | 03/12/2022 |
| 215 | 34.52 | | 24.12 | 25 | Femenino | Morelia (1) | 02/12/2022 |
| 216 | 18.82 | | 23.32 | 1 | Femenino | Tzitzio (1) | 03/12/2022 |
| 217 | 26.35 | | 23.8 | 1 | Femenino | Morelia (1) | 05/12/2022 |
| 218 | 19.33 | | 20.96 | 3 | Masculino | Charo (1) | 05/12/2022 |
| 219 | 21.43 | | 27.28 | 1 | Masculino | Pátzcuaro (4) | 07/12/2022 |
| 220 | 21.68 | | 25.25 | 1 | Femenino | Pátzcuaro (4) | 04/12/2022 |
| 221 | | 21.68 | 25.25 | 38 | Femenino | Maravatío (1) | 03/12/2022 |
| 222 | | 24.52 | 23.93 | 4 | Masculino | Maravatío (1) | 03/12/2022 |
| 223 | | 27.63 | 22.42 | 10 | Masculino | Maravatío (1) | 05/12/2022 |
| 224 | 24.54 | | 26.31 | 26 | Femenino | Morelia (1) | 05/12/2022 |
| 225 | 31.51 | | 22.43 | 25 | Femenino | Lázaro Cárdenas (8) | 05/12/2022 |
| 226 | 20.81 | | 24.78 | 49 | Femenino | Morelia (1) | 07/12/2022 |
| 227 | 19.46 | | 23.87 | 69 | Femenino | Tarímbaro (1) | 09/12/2022 |
| 228 | 20.25 | | 23.96 | 1 | Femenino | Queréndaro (1) | 10/12/2022 |
| 229 | 19.17 | | 23.76 | 87 | Femenino | Sahuayo (2) | 11/12/2022 |
| 230 | | 18.7 | 24.78 | 2 | Femenino | Hidalgo (3) | 05/12/2022 |
| 231 | 23.45 | | 25.42 | 3 | Masculino | Uruapan (5) | 12/12/2022 |
| 232 | 19.6 | | 23.54 | 6 | Femenino | Quiroga (4) | 12/12/2022 |
| 233 | 25.01 | | 25.87 | 41 | Femenino | Morelia (1) | 13/12/2022 |
| 234 | 17.19 | | 23.81 | 4 | Femenino | Salvador Escalante (4) | 09/12/2022 |
| 235 | 18.49 | | 23.92 | 5 | Femenino | Álvaro Obregón (1) | 13/12/2022 |

Continuación de la tabla 5

| | | | | | | | |
|-----|-------|-------|-------|----|-----------|--------------------------|------------|
| 236 | 17.79 | | 25.68 | 1 | Femenino | Cuitzeo (1) | 13/12/2022 |
| 237 | 15.84 | | 19.87 | 1 | Masculino | Pátzcuaro (4) | 13/12/2022 |
| 238 | 18.88 | | 25.5 | 35 | Femenino | Morelia (1) | 14/12/2022 |
| 239 | 24.01 | | 26.32 | 1 | Femenino | Ocampo (3) | 19/12/2022 |
| 240 | 30.31 | | 28.57 | 3 | Masculino | Ocampo (3) | 19/12/2022 |
| 241 | 21.42 | | 26.7 | 1 | Masculino | Zitácuaro (3) | 18/12/2022 |
| 242 | | 22.8 | 28.41 | 1 | Masculino | Zitácuaro (3) | 18/12/2022 |
| 243 | | 22.61 | 27.28 | 1 | Masculino | Zitácuaro (3) | 21/12/2022 |
| 244 | 32.15 | | 29.3 | 1 | Masculino | Ocampo (3) | 22/12/2022 |
| 245 | 20.3 | | 24.08 | 33 | Femenino | Zinapécuaro (1) | 22/12/2022 |
| 246 | | 19.64 | 26.63 | 35 | Masculino | Maravatío (1) | 19/12/2022 |
| 247 | 23.15 | | 24.37 | 1 | Femenino | Morelia (1) | 02/01/2022 |
| 248 | 16.45 | | 20.74 | 1 | Femenino | Morelia (1) | 07/01/2022 |
| 249 | 22.44 | | 22.36 | 3 | Masculino | Heroica de Zitácuaro (3) | 28/12/2022 |
| 250 | 22.54 | | 22.38 | 3 | Masculino | Heroica de Zitácuaro (3) | 28/12/2022 |
| 251 | 20.17 | | 23.52 | 4 | Femenino | Puruándiro (6) | 28/12/2022 |
| 252 | 20.4 | | 23.3 | 1 | Femenino | Morelia (1) | 04/01/2023 |
| 253 | 26.12 | | 24.78 | 57 | Femenino | Morelia (1) | 05/01/2023 |
| 254 | 29.02 | | 22.46 | 1 | Masculino | Foráneo | 03/01/2023 |
| 255 | | 27.21 | 25.3 | 2 | Femenino | Ciudad Hidalgo (3) | 07/01/2023 |
| 256 | 21.62 | | 21.84 | 34 | Masculino | Aguililla (7) | 30/12/2023 |
| 257 | 19 | | 23.57 | 57 | Femenino | Morelia (1) | 09/01/2023 |
| 258 | 26.5 | | 29.36 | 1 | Femenino | Morelia (1) | 07/01/2023 |
| 259 | | 26.48 | 26.44 | 51 | Femenino | Morelia (1) | 14/01/2023 |
| 260 | 27.84 | | 29.3 | 2 | Masculino | Morelia (1) | 10/01/2023 |
| 261 | 21.55 | | 23.34 | 1 | Femenino | Morelia (1) | 16/01/2023 |
| 262 | 23.8 | | 23.96 | 89 | Femenino | Maravatío (1) | 20/01/2023 |
| 263 | | 16.66 | 26.82 | 1 | Femenino | Maravatío (1) | 22/01/2023 |
| 264 | 22.09 | | 23.75 | 4 | Femenino | Foráneo | 28/01/2023 |
| 265 | 22.1 | | 26.92 | 1 | Masculino | Morelia (1) | 01/02/2022 |

Los resultados referentes a la detección de los grupos antigénicos RSV/A y RSV/B mediante los ensayos de RT-qPCR realizados en la presente investigación nos indican que del total de 265 muestras positivas a RSV se encontraron 189

muestras positivas a RSV/A (71.32%), 75 muestras positivas a RSV/B (28.30%), y una muestra positiva a co-infección RSV/A+ RSV/B (0.38%) (**Figura 13**).

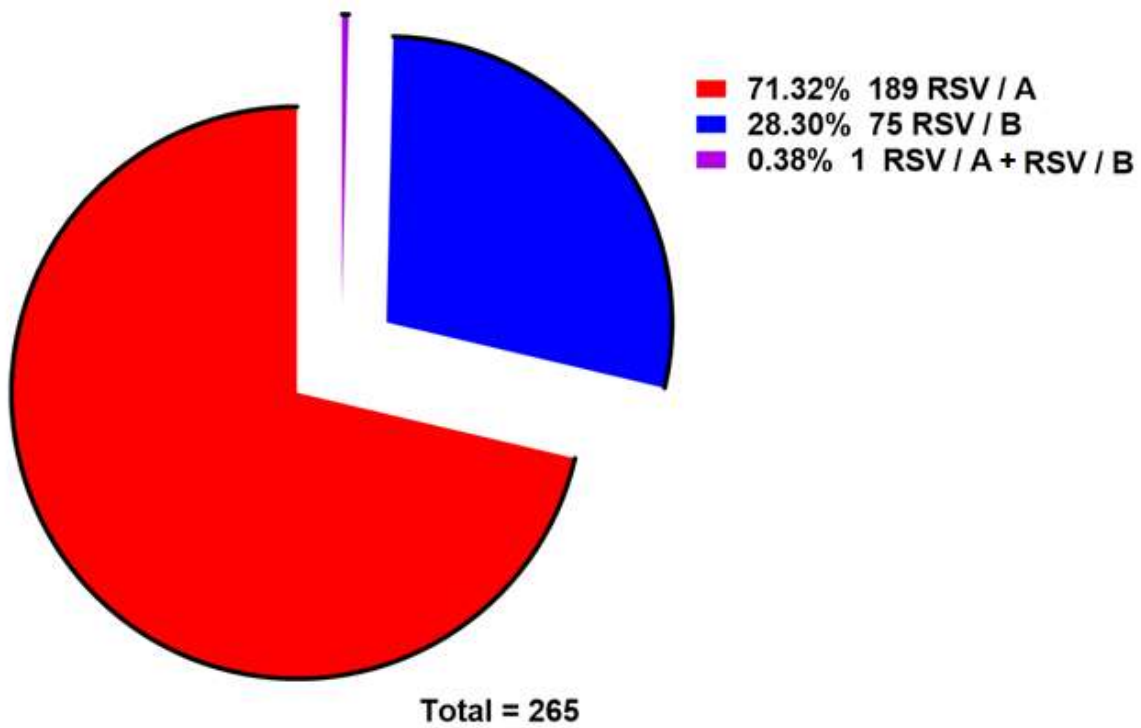


Figura 13. Porcentajes de grupos antigénicos de RSV detectados en el brote 2022-2023 del estado de Michoacán. Se muestra el porcentaje de detección del grupo antigénico RSV/A (rojo), RSV/B (azul) y coinfección RSV/A+RSV/B (morado) en muestras correspondientes al estado de Michoacán en el periodo 2022-2023.

Se realizó el análisis numérico de los ciclos de amplificación (Cq) de los genes que codifican para la glicoproteína G de RSV, para el caso de las muestras positivas a los grupos antigénicos RSV/A (n = 190) y RSV/B (n = 76), y para todas las muestras (n= 265) en el caso del control interno endógeno humano, RNASE P. Cabe mencionar que los datos de amplificación de la muestra a la que fue detectada la coinfección RSV/A/B fueron incluidos para su análisis en ambos grupos RSV/A y RSV/B, y por lo tanto la suma de ambos grupos es 266. A continuación se muestran los resultados de media aritmética y entre paréntesis la desviación estándar que se encontraron, RSV/A: 21.90 (4.41); RSV/B: 21.60

(4.28); RNASE P de pacientes positivos a RSV/A: 24.09 (2.14); RNASE P de pacientes positivos a RSV/B: 24.70 (2.26) (**Figura 14**).

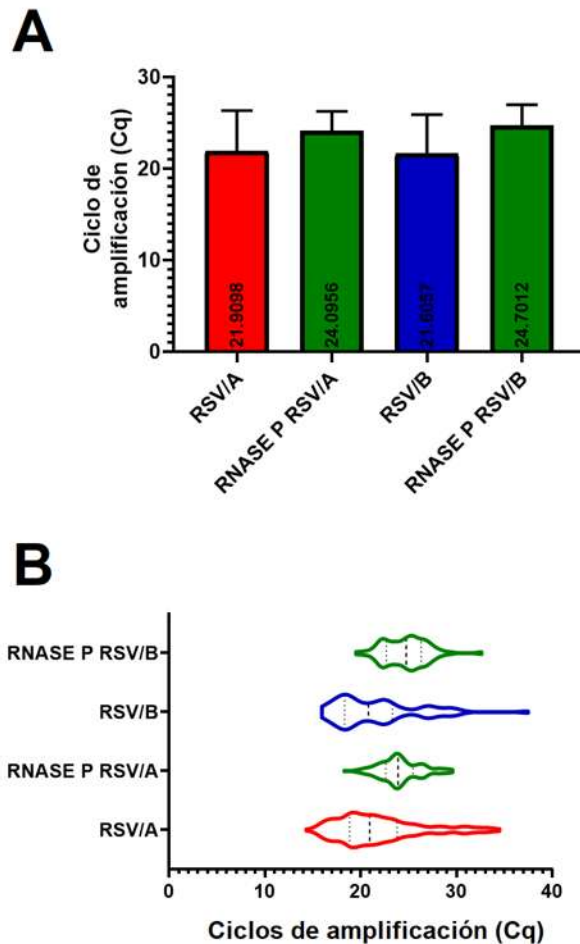


Figura 14. Análisis de los ciclos de amplificación mediante RT-qPCR del gen que codifica para la glicoproteína G y control endógeno de 265 muestras positivas a RSV. (A) Se muestran la media y la desviación estándar de los ciclos de amplificación mediante RT-qPCR correspondientes al gen G de 190 muestras positivas al grupo antigénico A (color rojo), 76 muestras positivas al grupo antigénico B (color azul), y 265 muestras correspondientes al gen humano RNASE P (color verde). (B) Se muestra la distribución de los ciclos de amplificación

mediante RT-qPCR del gen G de los grupos antigénicos RSV/A (rojo), RSV/B (azul) y el control endógeno humano RNASE P (verde).

Al realizar el análisis de los ciclos de amplificación (Cq) obtenidos mediante la detección del gen G del grupo antigénico RSV/A se encontró como media aritmética el valor de 21.90 (rango 14.33–34.52) y una desviación estándar de 4.41, mientras que para el grupo antigénico RSV/B la media aritmética fue 21.60 (rango 15.97–37.51), con una desviación estándar de 4.28 **(Figura 14)**. Estos valores son similares a los reportados en la literatura (Reina et al., 2018).

Al realizar un análisis numérico de las 265 muestras positivas a RSV estudiadas en la presente investigación encontramos que 138 correspondieron al género femenino (52.08%), mientras que 127 correspondieron al género masculino (47.92%) **(Tabla 5 y Figura 13)**. A continuación, fue de nuestro interés averiguar la distribución de dichas 265 muestras en función a su origen por Jurisdicción Sanitaria (J. S.), encontrando que la J. S. 1 le correspondieron 116 muestras (43.77%); mientras que en la J. S. 2 fueron 18 muestras (6.79%); para la J. S. 3 fueron 34 muestras (12.83%), para la J. S. 4 fueron 41 muestras (15.47%); en la J. S. 5 correspondieron 44 muestras (16.60%); en la J.S. 6 fueron 2 muestras (0.75%); en la J.S. 7 correspondieron 2 muestras (0.75%), en la J.S. 8 fueron 3 muestras (1.13%); y 5 muestras foráneas (1.89%) **(Tabla 5 y Figura 15)**. El análisis de la totalidad de edades de los 265 pacientes evaluadas en el presente trabajo indican que el valor menor y también más frecuente fue 1 año de edad, y el paciente con edad más avanzada fue 89 años, el promedio de edad fue 12.55 años **(Tabla 5 y Figura 16)**.

A continuación, fue de nuestro interés determinar la distribución de RSV/A y RSV/B por jurisdicción sanitaria. El análisis que se realizó permitió encontrar los siguientes resultados: en la Jurisdicción Sanitaria (J.S.) 1 se detectaron 98 muestras positivas a RSV/A (84.48%) y 18 para RSV/B (15.51%); en el caso de la J.S.2 fueron RSV/A: 13 muestras (72.22%), RSV/B: 5 muestras (27.77%); en el caso particular de la J.S.3 el grupo RSV/B (22 muestras, 64.70%) fue más frecuente que RSV/A (12 muestras, 35.29%), siendo esta jurisdicción la única que

tuvo esta tendencia. Para el caso de la J.S.4 se detectaron 31 muestras positivas a RSV/A (75.60%) y 10 para RSV/B (24.39%); en el caso de J.S.5 fue posible detectar 24 muestras positivas a RSV/A (54.54%), 19 muestras para RSV/B (43.18%) y una muestra con co-infección RSV/A/B (2.27%); tanto para la J.S.6 como para la J.S.7 se detectaron 2 muestras positivas para RSV/A (100%) y ninguna para RSV/B (0%); en el caso de la J.S.8 se detectaron 2 muestras positivas a RSV/A (66.66%) y una muestra para RSV/B (33.33%); finalmente se procesaron 5 muestras foráneas las cuales en su totalidad correspondieron a RSV/A (**Figura 15**).

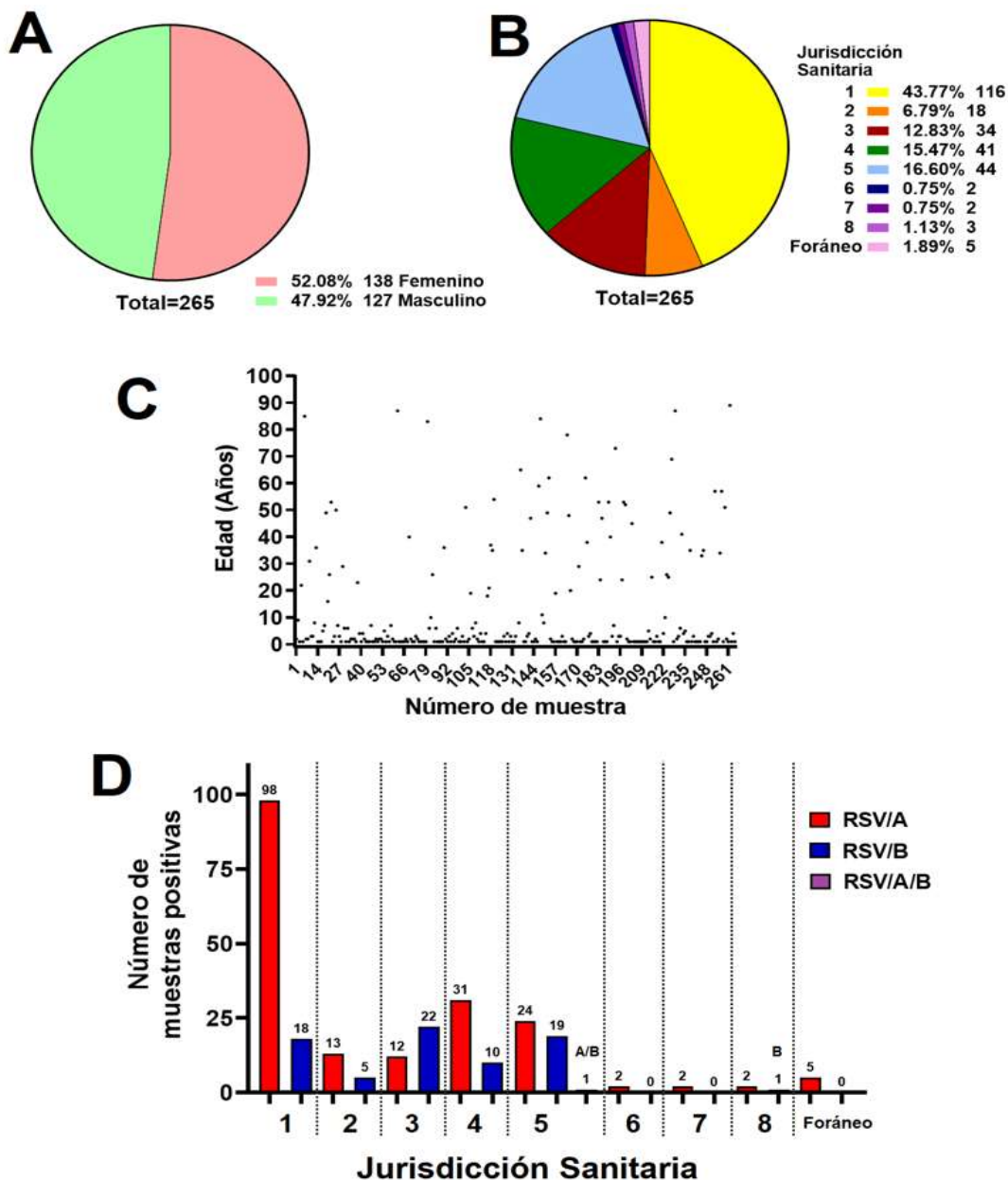


Figura 15. Distribución por género, edad y Jurisdicción Sanitaria de muestras positivas a RSV en el brote 2022- 2023 del estado de Michoacán. Para el total de 265 muestras positivas a RSV en el brote 2022-2023 en Michoacán: (A) Se muestra el porcentaje de distribución por género: femenino (rosa) y masculino (verde). (B) Porcentaje de distribución de muestras por jurisdicción sanitaria. (C) Distribución por edad de la totalidad de muestras. (D) Número total y distribución de muestras positivas a RSV/A (rojo), RSV/B (azul) y RSV A/B (morado) por jurisdicción sanitaria del estado de Michoacán.

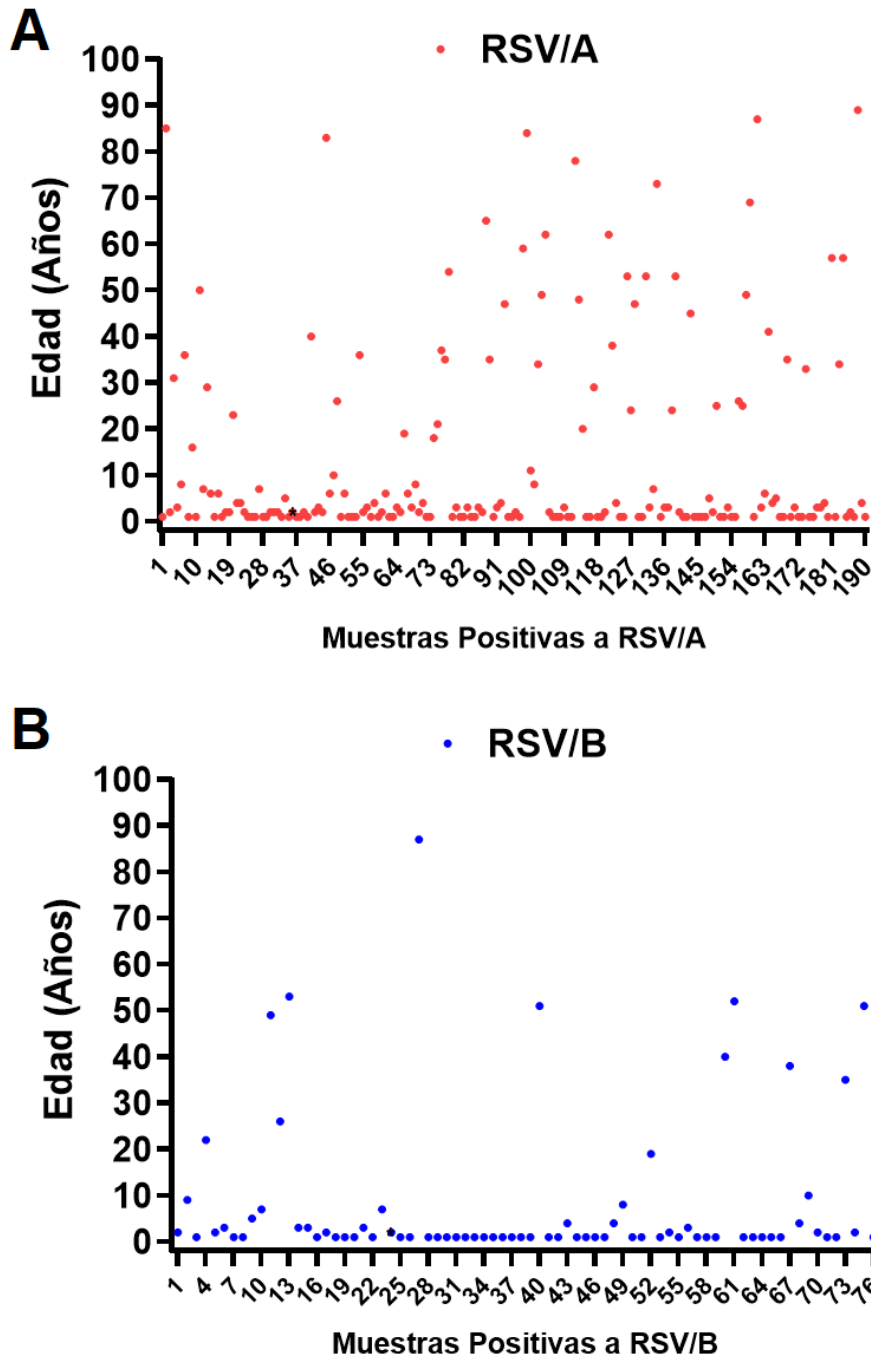


Figura 16. Distribución por edad de muestras positivas a RSV/A y RSV/B del brote 2022-2023 en el estado de Michoacán. (A) Se presenta la distribución de las muestras positivas a RSV/A (rojo). (B) Se presenta la distribución de las muestras positivas a RSV/B (azul). El asterisco para ambos paneles demuestra la localización de la muestra cuyo resultado fue la presencia de la coinfección RSV A + RSV/B.

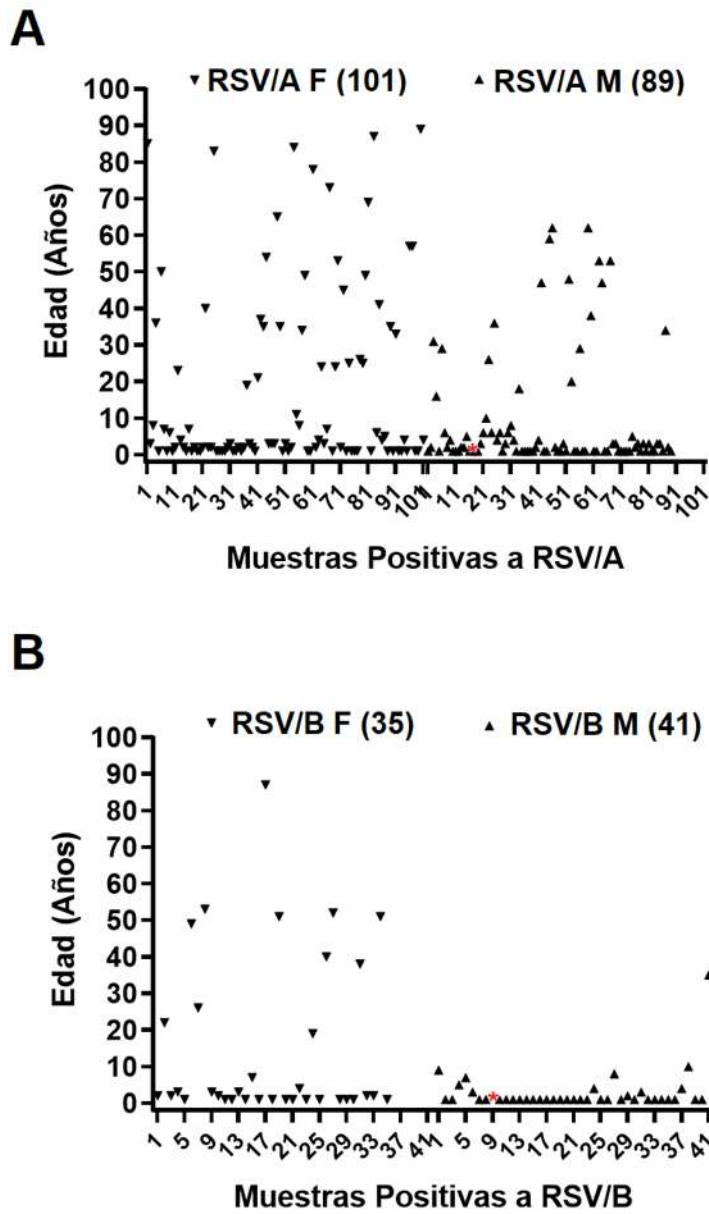


Figura 17. Distribución por género y edad de muestras positivas a RSV/A y RSV/B del brote 2022-2023 en el estado de Michoacán. Se muestra la distribución de muestras positivas a RSV por edad y género Femenino (letra F, triángulos invertidos) y Masculino (letra M, triángulos) para RSV/A (A) o RSV/B (B). El asterisco rojo para ambos paneles demuestra la localización de la muestra cuyo resultado fue la presencia de la coinfección RSV/A + RSV/B.

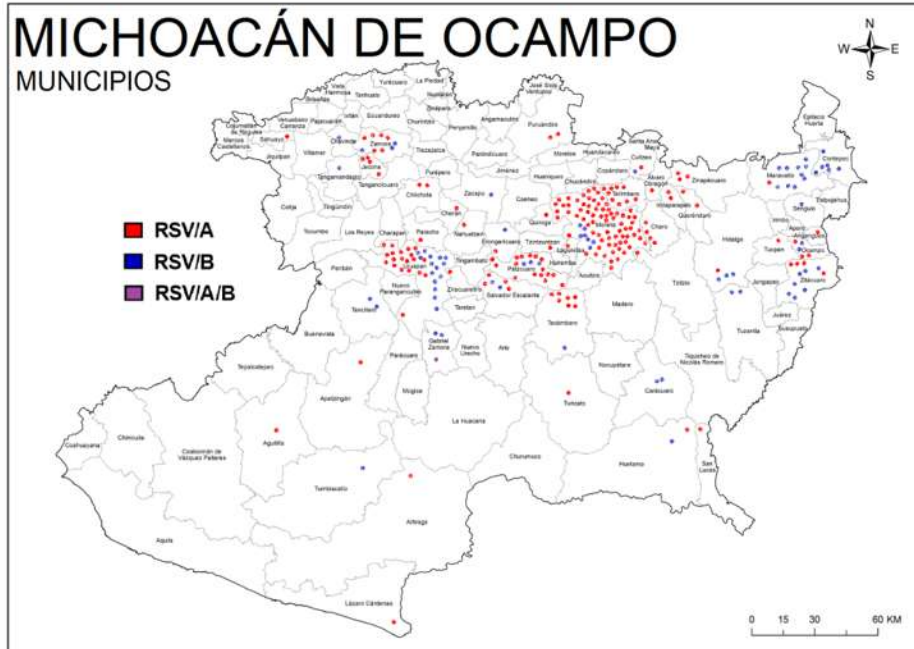
A**B**

Figura 18. Mapa de municipios del estado de Michoacán de Ocampo. (A) Muestra la distribución de muestras positivas a RSV/A (punto rojo), RSV/B (punto azul) y RSV/A + RSV/B (punto morado) por municipio en el brote 2022-2023 en el estado de Michoacán. (B) Demuestra las jurisdicciones sanitarias del estado de Michoacán.

9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo logramos identificar 189 muestras correspondientes al grupo antigénico RSV/A, 75 muestras de RSV/B y 1 muestra con coinfección simultánea de RSV/A+RSV/B (Figura 13). Existe escasa información en la literatura referente a coinfecciones RSV/A+RSV/B, existe el reporte de Lu et al., 2019 en donde al analizar 1146 muestras positivas a RSV, reportan la identificación de aproximadamente 1% de casos positivos a coinfección RSV/A+RSV/B, mientras que en este trabajo reportamos 0.38% de positividad a la coinfección. En la literatura existen estudios globales y multianuales que manifiestan que los grupos antigénicos RSV/A y RSV/B co-circulan, con dominancia variante de los grupos antigénicos dependiente de los años (Fodha et al., 2007, Otieno et al., 2017, Esposito et al., 2015). Sin embargo, de manera similar a lo que encontramos en esta investigación, las infecciones por el grupo antigénico RSV/A aparentemente son más frecuentes y pareciera que están asociadas a una mayor transmisibilidad que el grupo antigénico RSV/B (Al-Sharif et al., 2020). En el presente trabajo los porcentajes de detección de RSV/A (72.39%) y RSV B (27.24%) son similares a los reportados en la literatura, en un estudio en Arabia Saudita en el 2020 se encontró en mayor proporción el grupo antigénico RSV/A (64%) comparado con el grupo RSV/B (36%). De manera similar en un estudio realizado en el estado Massachusetts Estados Unidos a finales del 2022, que es contemporáneo a nuestro estudio, se secuenciaron 77 genomas completos de RSV encontrando 91% de RSV/A y 9% de RSV/B (Adams et al., 2023). Es importante mencionar que los resultados obtenidos en el presente trabajo referentes a la epidemiología molecular de RSV son diferentes a los reportados en un estudio reciente realizado en Austria en el periodo 2022-2023 que incluyó 658 muestras positivas a RSV, de las cuales 612 muestras (91.61%) correspondieron a RSV/B y 56 muestras (8.38%) correspondieron a RSV/A (Redlberger-Fritz et al., 2023).

El método molecular novedoso que se propone en la presente investigación está dirigido a la detección de los grupos antigénicos A y B del RSV a través de la

detección específica de regiones del gen G (Figuras 8 y 9). Existen reportes en la literatura en donde métodos de detección de los grupos antigénicos A y B del RSV están dirigidos a regiones del gen N (Van Elden et al., 2003), el gen F (Hu et al., 2003, Halabi et al., 2022). Es importante resaltar que el diseño de este sistema molecular de detección requirió del empleo del alineamiento de secuencias genómicas recientes (Tablas 2 y 3), y los ensayos de desempeño nos indican que es un método funcional actualizado, esta característica es deseable en métodos de detección debido a la frecuente tasa de mutación genética que ha sido reportada para el RSV (Zlateva et al., 2004; Pandya et al., 2019).

El análisis de los ciclos de amplificación es relevante, debido a que se ha reportado que existe una relación directa entre el valor de Cq y la carga viral del virus sincitial respiratorio humano (Borg et al., 2003). La medición de la carga viral es una buena herramienta para la evaluación, seguimiento y pronóstico de infecciones respiratorias virales agudas.

Las medias de los ciclos de amplificación (Cq) mediante RT-qPCR del gen G de los grupos antigénicos RSV/A (21.90) y RSV/B (21.60) detectadas en el presente trabajo son menores respecto a reportes previos (Figura 14). Concretamente las medias de los ciclos de amplificación reportadas en 150 pacientes positivos a RSV/A fue 23.75 (rango 17.02–33.76) y 24.49 para 150 positivos para RSV/B (rango 15.29–36.68), en un estudio multianual realizado en España comprendiendo el periodo 2015-2017 (Reina et al., 2018).

De manera interesante la jurisdicción número 3, que abarca los municipios en el oriente de Michoacán, fue la única que presentó un número mayor de casos de RSV/B en comparación con RSV/A, lo que sugiere una distribución antigénica del RSV en el estado de Michoacán dependiente de la localización geográfica.

De manera interesante en el presente trabajo, se detectó que el para el caso de RSV/B (Figura 17), la tasa de detección en adultos del género masculino fue menos frecuente que para el caso de RSV/B en caso de mujeres adultas o del caso de RSV/A en hombres adultos. Esto pudiera ser consecuencia a diferencias

en la inmunidad preexistente entre los grupos mencionados como ha sido sugerido en estudios de prevalencia de RSV/A o RSV/B en reportes previos (Lu et al., 2019).

Es importante hacer notar que existen diversas investigaciones que manifiestan la importancia del estudio de la diversidad genética del gen G de RSV esto con fines terapéuticos por la posible generación de vacunas (Tripp et al., 2018). Es por lo anterior que el presente trabajo representa una aportación al conocimiento a la comunidad científica interesada al estudio, prevención o tratamiento del RSV.

10. CONCLUSIÓN

En la presente investigación se logró diseñar un novedoso sistema funcional de detección diferencial de los grupos antigénicos A y B del virus sincitial respiratorio humano a través de RT-qPCR multiplex. Dicho sistema de detección molecular es reproducible, específico, sensible y presenta un amplio rango dinámico de detección para RSV/A y RSV/B. A través de dicho sistema de detección se realizó la detección molecular de los grupos antigénicos RSV/A y RSV/B presentes en 268 muestras provenientes del brote 2022-2023 en el estado de Michoacán, encontrándose el grupo antigénico RSV/A en un total de 1 muestras (71.32%), por otro lado, el grupo antigénico RSV/B en un total de 75 muestras (28.30%), y 1 muestra con coinfección con los dos grupos antigénicos RSV/A y RSV/B (0.38%).

11. PERSPECTIVAS

- Identificar los genotipos de los grupos antigénicos RSV/A y RSV/B presentes en las 265 muestras descritas en el presente trabajo.
- Secuenciar y analizar filogenéticamente los genomas completos en la coinfección RSV A y RSV B detectada en el paciente 59.
- Validar el método molecular diseñado en el presente trabajo.

12. REFERENCIAS

Adams G., Moreno G.K., Petros B.A., Uddin R., Levine Z., Kotzen B., Messer K.S., Dobbins S.T., DeRuff K.C., Loreth C.M., Brock-Fisher T., Schaffner S.F., Chaluvadi S., Kanjilal S., Luban J., Ozonoff A., Park D.J., Turbett S.E., Siddle K.J., MacInnis B.L., Sabeti P.C., Lemieux J.E.,. (2023) Viral Lineages in the 2022 RSV Surge in the United States *N Engl J Med.* 388(14):1335-1337. doi: 10.1056/NEJMc2216153.

Afonso C.L., Amarasinghe G.K., Bányai K., Bào Y., Basler C.F., Bavari S., Bejerman N., Blasdel K.R., Briand F.X., Briese T., Bukreyev A., Calisher C.H., Chandran K., Chéng J., Clawson A.N., Collins P.L., Dietzgen R.G., Dolnik O., Domier L.L., Dürrwald R., Dye J.M., Easton A.J., Ebihara H., Farkas S.L., Freitas-Astúa J., Formenty P., Fouchier R.A., Fù Y., Ghedin E., Goodin M.M., Hewson R., Horie M., Hyndman T.H., Jiāng D., Kitajima E.W., Kobinger G.P., Kondo H., Kurath G., Lamb R.A., Lenardon S., Leroy E.M., Li C.X., Lin X.D., Liú L., Longdon B., Marton S., Maisner A., Mühlberger E., Netesov S.V., Nowotny N., Patterson J.L., Payne S.L., Paweska J.T., Randall R.E., Rima B.K., Rota P., Rubbenstroth D., Schwemmler M., Shi M., Smither S.J., Stenglein M.D., Stone D.M., Takada A., Terregino C., Tesh R.B., Tian J.H., Tomonaga K., Tordo N., Towner J.S., Vasilakis N., Verbeek M., Volchkov V.E., Wahl-Jensen V., Walsh J.A., Walker P.J., Wang D., Wang L.F., Wetzel T., Whitfield A.E., Xiè J.T., Yuen K.Y., Zhang Y.Z., Kuhn J.H. (2016) Taxonomy of the order Mononegavirales. *Arch Virol.* 161(8):2351-60. doi: 10.1007/s00705-016-2880-1.

Aherne, W., Bird, T., Court, S.D., Gardner, P.S., McQuillin, J. (1970). Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J Clin Pathol* 23(1):7-18. doi: 10.1136/jcp.23.1.7.

Althaus, C. F., Gianella, S., Rieder, P., von Wyl, V., Kouyos, R.D., Niederöst, B., Schmid, A., Metzner, K.J., Joos, B., Günthard, H.F., Fischer, M. (2010). Rational design of HIV-1 fluorescent hydrolysis probes considering phylogenetic variation

and probe performance. *J Virol Methods*, 165(2), 151-160. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.01.012

Archer, C.T., Kim, J.F., Jeong, H., Park, J.H., Vickers, C.E., Lee, S.Y., Nielsen, L.K.(2011). The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. *BMC Genomics* 12:9. doi: 10.1186/1471-2164-12-9.

Baraldi, E., Lisi, G.C., Costantino, C., Heinrichs, J.H., Manzoni, P., Riccò, M., Roberts, M., Vassilouthis N. (2022). RSV disease in infants and young children: Can we see a brighter future?. *Hum Vaccin Immunother.*; 18(4): 2079322. doi: 10.1080/21645515.2022.2079322

Baraldi E, Lanari M, Manzoni P, Rossi GA, Vandini S, Rimini A, Romagnoli C, Colonna P, Biondi A, Biban P, et al. Inter-Society consensus document on treatment and prevention of bronchiolitis in newborns and infants. *Ital J Pediatr.* 2014;40(1):65. doi: 10.1186/1824-7288-40-65.

Beaudoin, J.D., Perreault, J.P. (2010). 5'-UTR G-quadruplex structures acting as translational repressors. *Nucleic Acids Res* 38(20), 7022-7036. doi: 10.1093/nar/gkq557.

Belda, I., Ruiz, J., Santos, A., Van Wyk, N., Pretorius, I.S. (2019). *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Genet* 35(12), 956-957. doi: 10.1016/j.tig.2019.08.009.

Bermingham, A., Collins, P.L., (1999) The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(20),11259-11264. doi: 10.1073/pnas.96.20.11259

Blount Jr, R.E., Morris, J.A., Savage, R.E. (1956) Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* 92(3), 544-549. doi: 10.3181/00379727-92-22538.

Borg, I., Rohde, G., Löseke, S., Bittscheidt, J., Schultze-Werninghaus, G., Stephan V., Bufe, A. (2003). Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in pulmonary diseases. *Eur Respir J* 21(6), 944–951. 10.1183/09031936.03.00088102.

Boyce, T.G., Mellen, B.G., Mitchel, Jr E.F., Wright, P.F., Griffin, M.R., (2000) Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in Medicaid. *J Pediatr* 137(6),865-870. doi: 10.1067/mpd.2000.110531.

Cann, A.J., (2008) Replication of Viruses. *Encyclopedia of Virology*.:406–412. doi: 10.1016/B978-012374410-4.00486-6.

Chaitanya, K.V., (2019). Structure and Organization of Virus Genomes. In: *Genome and Genomics*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0702-1_1.

Challa, S., Scott, A.D., Yuzhakov, O., Zhou, Y., Tiong-Yip, C.L., Gao, N., Thresher, J, Yu, Q., (2015). Mechanism of action for respiratory syncytial virus inhibitor RSV604. *Antimicrob Agents Chemother* 59(2),1080-7. doi: 10.1128/AAC.04119-14.

Cherrie, A.H., Anderson, K., Wertz, G.W., Openshaw, P.J.M., (1992) Human cytotoxic T cells stimulated by antigen on dendritic cells recognize the N, SH, F, M, 22K, and 1b proteins of respiratory syncytial virus. *J Virol* 66, 2102–2110.

Collins, P.L., McIntosh, K., Chanock, R.M., (1996). Respiratory syncytial virus. In: Fields B N, Knipe D M, Howley P M, editors. *Fields virology*. 3rd ed. Vol. 1. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven, 1313–1351

Eshaghi. A, Duvvuri. V.R., Lai, R., Nadarajah, J.T., Li, A., Patel, S.N., Low, D.E., Gubbay, J.B. (2012). Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS One*. 2012;7(3), e32807. doi: 10.1371/journal.pone.0032807.

Falsey A.R., Walsh E.E. (2000). Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults *Clin Microbiol Rev*. 13(3): 371–384. doi: 10.1128/cmr.13.3.371-384.2000.

Fearns, R., Collins, P.L., (1999) Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* 73(7),5852-5864. doi: 10.1128/JVI.73.7.5852-5864.1999.

Fuentes, S., Tran, K.C., Luthra, P., Teng, M.N., He, B., (2007) Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *J Virol* 81(15), 8361-8366. doi: 10.1128/JVI.02717-06.

Glingston R.S., Deb R., Kumar S., Nagotu S. (2019) Organelle dynamics and viral infections: at cross roads. *Microbes Infect* 21(1):20-32. doi: 10.1016/j.micinf.2018.06.002.

Goya, S., Sereewit, J., Pfallmer, D., Nguyen, T.V., Bakhash, S.A.K.M., Sobolik, E.B., Greninger, A.L. (2023) Genomic Characterization of Respiratory Syncytial Virus during 2022-23 Outbreak, Washington, USA. *Emerg Infect Dis.* 29(4):865-868. doi: 10.3201/eid2904.221834.

Gutiérrez, Michelle, & López, Susana. (2010). Mecanismos de entrada de virus: una manera de conocer a la célula. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 13(1), 26-34. Recuperado en 26 de septiembre de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2010000100003&lng=es&tlng=es.

Halabi, K.C., Wang, H., Leber, A.L., Sánchez, P.J., Ramilo, O., Mejias, A. (2022). Respiratory syncytial virus and SARS-CoV-2 coinfections in children. *Pediatr Pulmonol. Dec*; 57(12):3158-3160. doi: 10.1002/ppul.26127. Epub 2022 Aug 30.

Hall, C.B., (1982). Respiratory syncytial virus: its transmission in the hospital environment. *Yale J Biol Med*, 55(3-4):219-23.

Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Auinger P, Griffin MR, Poehling KA, Erdman D, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med.* 2009;360(6):588–98. doi: 10.1056/NEJMoa0804877.

Horikami, S. M., Curran, J., Kolakofsky, D., Moyer., S.A., (1992). Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol* 66, 4901-4908.

Hummel, K.B., Lowe, L., Bellini, W.J., Rota, P.A. (2006) Development of quantitative gene-specific real-time RT-PCR assays for the detection of measles virus in clinical specimens. *J Virol Methods* 132(1-2):166-73. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.10.006.

Hu, A., Colella, M., Tam, J.S., Rappaport, R., Cheng, S.M. (2003). Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 41(1):149-54. doi: 10.1128/JCM.41.1.149-154.2003.

Jiao, X., Sui, H., Lyons, C., Tran, B., Sherman, B.T., Imamichi, T. (2019). Complete Genome Sequence of Herpes Simplex Virus 1 Strain McKrae. *Microbiol Resour Announc* 8(39):e00993-19. doi: 10.1128/MRA.00993-19.

Johnson, S.M., McNally, B.A., Ioannidis, I., Flano, E., Teng, M.N., Oomens, A.G., Walsh, E.E., Peeples, M.E., (2015) Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures. *PLoS Pathog* 11, e1005318. doi: 10.1371/journal.ppat.1005318.

Khailany, R.A., Safdar, M., Ozaslan, M. (2020). Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep* 19:100682. doi: 10.1016/j.genrep.2020.100682.

Linder, K.A., Malani P.N., (2017). Respiratory Syncytial Virus. *JAMA*. 317 (1): 98. doi: 10.1001/jama.2016.17882

Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for

detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4, 357-362.

Lo, M.S., Brazas, R.M., Holtzman, M.J., (2005). Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J Virol* 79(14), 9315-9319. doi: 10.1128/JVI.79.14.9315-9319.2005.

Louten, J., (2016). *Virus Structure and Classification. Essential Human Virology.* 19-29. doi: 10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8.

Lu, B., Liu, H., Tabor, D.E., Tovchigrechko, A., Qi, Y., Ruzin, A., Esser, M.T., Jin, H., (2019) Emergence of new antigenic epitopes in the glycoproteins of human respiratory syncytial virus collected from a US surveillance study, 2015-17. *Sci Rep* 9(1), 3898. doi: 10.1038/s41598-019-40387-y.

Lunge, V.R., Miller, B.J., Livak, K.J., Batt, C.A., (2002). Factors affecting the performance of 5' nuclease PCR assays for *Listeria monocytogenes* detection. *J Microbiol Methods* 51, 361-368.

Ma, L., Chung, W.K. (2014), Quantitative Analysis of Copy Number Variants Based on Real-Time LightCycler PCR. *Curr Protoc Hum Genet*, 80: 7.21.1-7.21.8.

Miao, C., Radu, G.U., Caidi, H., Tripp, R.A., Anderson, L.J., Haynes, L.M. (2009). Treatment with respiratory syncytial virus G glycoprotein monoclonal antibody or F(ab')₂ components mediates reduced pulmonary inflammation in mice. *J Gen Virol* 90, 1119–1123. doi: 10.1099/vir.0.009308-0.

Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S., (2023) Rethinking next-generation vaccines for coronaviruses, influenzaviruses, and other respiratory viruses. *Cell Host Microbe* 31(1):146-157. doi: 10.1016/j.chom.2022.11.016.

Muñoz-Escalante, J.C., Comas-García, A., Bernal-Silva, S., Noyola, D.E. (2021). Respiratory syncytial virus B sequence analysis reveals a novel early genotype. *Sci Rep* 11(1), 3452. doi: 10.1038/s41598-021-83079-2.

Muñoz-Escalante, J.C., Comas-García, A., Bernal-Silva, S., Robles-Espinoza, C.D., Gómez-Leal, G., Noyola, D.E., (2019). Respiratory syncytial virus A genotype classification based on systematic intergenotypic and intragenotypic sequence analysis. *Sci Rep* 9(1), 20097. doi: 10.1038/s41598-019-56552-2.

Nair H., Simões E.A., Rudan I., Gessner B.D., Azziz-Baumgartner E., Zhang J.S.F., Feikin D.R., Mackenzie G.A., Moïisi J.C., Roca A., Baggett H.C., Zaman S.M., Singleton R.J., Lucero M.G., Chandran A., Gentile A., Cohen C., Krishnan A., Bhutta Z.A., Arguedas A., Clara A.W., Andrade A.L., Ope M., Ruvinsky R.O., Hortal M., McCracken J.P., Madhi S.A., Bruce N., Qazi S.A., Morris S.S., El Arifeen S., Weber M.W., Scott J.A.G., Brooks W.A., Breiman R.F., Campbell H., Severe Acute Lower Respiratory Infections Working Group., (2013) Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 381(9875), 1380-1390. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61901-1.

National Institute for Health and Care Excellence (NICE). (2021) Bronchiolitis in children Funding National Institute for Health and Care Excellence Bronchiolitis in children contents [Internet]. London; 2021. [accessed 2021 Dec 20].

Nazarenko I, Pires R, Lowe B, Obaidy M, Rashtchian A., (2002). Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes. *Nucleic Acids Res* 30(9), 2089-2195. doi: 10.1093/nar/30.9.2089.

Pandya M.C., Callahan S.M., Savchenko K.G., Stobart C.C., (2019) A Contemporary View of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Biology and Strain-Specific Differences. *Pathogens* 8(2), 67. doi: 10.3390/pathogens8020067.

Prasad B.V., Schmid M.F. (2012) Principles of virus structural organization. *Adv Exp Med Biol.*;726:17-47. doi: 10.1007/978-1-4614-0980-9_3

Pray, L. (2008) Eukaryotic genome complexity. *Nature Education* 1(1):96

Pitzer VE, Viboud C, Alonso WJ, Wilcox T, Metcalf CJ, Steiner CA, Haynes AK, Grenfell BT, Kaderali L. Environmental drivers of the spatiotemporal dynamics of respiratory syncytial virus in the United States. *PLoS Pathog.* 2015;11(1):e1004591. doi: 10.1371/journal.ppat.1004591.

Redlberger-Fritz M., Springer D.N., Aberle S.W., Camp J.V., Aberle J.H., (2023) Respiratory syncytial virus surge in 2022 caused by lineages already present before the COVID-19 pandemic. *J Med Virol.* 95(6):e28830. doi: 10.1002/jmv.28830.

Reina, J., Morales, C., Busquets, M., & Norte, C. (2018). Usefulness of Ct value in acute respiratory infections caused by respiratory syncytial virus A and B and influenza virus A (H1N1)pdm09, A (H3N2) and B. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed.)*, 36(6), 332–335. doi:10.1016/j.eimce.2018.04.004

Rocca, A., Biagi, C., Scarpini, S., Dondi, A., Vandini, S., Pierantoni, L., Lanari, M., (2021). Passive Immunoprophylaxis against Respiratory Syncytial Virus in Children: Where Are We Now? *Int J Mol Sci* 22(7), 3703. doi: 10.3390/ijms22073703.

Rubio L., Guerri J., Moreno P. (2013) Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family Closteroviridae. *Front Microbiol* 4: 151. doi: 10.3389/fmicb.2013.00151

Salonen A., Ahola T., Kääriäinen L.C. (2005) Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Top Microbiol Immunol.*;285:139-73. doi: 10.1007/3-540-26764-6_5.

Shigeta, S., Hinuma, Y., Suto, T., Ishida, N. (1968). The cell to cell infection of respiratory syncytial virus in HEp-2 monolayer cultures. *J Gen Virol* 3(1):129-31. doi: 10.1099/0022-1317-3-1-129.

Shi T., McAllister D.A., O'Brien K.L., Simoes E.A.F., Madhi S.A., et al. (2017) 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. *Lancet* 390(10098):946-958. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30938-8.

Teng, M.N., Collins, P.L. (1998). Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles . *J Virol* 72, 5707 – 5716.

Tiong-Yip, C.L., Aschenbrenner, L., Johnson, K.D., McLaughlin, R.E., Fan, J., Challa, S., Xiong, H., Yu, Q., (2014) Characterization of a respiratory syncytial virus L protein inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 58(7), 3867-3873. doi: 10.1128/AAC.02540-14.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22):4673-80. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.

Todd A.K., Costa A.M., Waller G., Daley A.J., Barr I.G., Deng Y.M. (2021) Rapid detection of human respiratory syncytial virus A and B by duplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods*. 294:114171. doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114171.

Trento, A., Ábrego, L., Rodriguez-Fernandez, R., González-Sánchez, M.I., González-Martínez, F., Delfraro, A., Pascale, J.M., Arbiza, J., Melero, J.A., (2015) Conservation of G-Protein Epitopes in Respiratory Syncytial Virus (Group A) Despite Broad Genetic Diversity: Is Antibody Selection Involved in Virus Evolution? *J Virol* 89(15), 7776-7785. doi: 10.1128/JVI.00467-15

Tripp, R.A., Power, U.F., Openshaw, P.J.M., Kauvar L.M., (2018) Respiratory Syncytial Virus: Targeting the G Protein Provides a New Approach for an Old Problem. *J. Virol* 92,e01302-17. doi: 10.1128/JVI.01302-17.

Turnham H, Agbeko RS, Furness J, Pappachan J, Sutcliffe AG, Ramnarayan P. Non-Invasive respiratory support for infants with bronchiolitis: a national survey of practice. *BMC Pediatr.* 2017;17(1):20. doi: 10.1186/s12887-017-0785-0.

Van Elden, L.J., Van Loon, A.M., Van der Beek, A., Hendriksen, K.A., Hoepelman, A.I., Van Kraaij, M.G., Schipper, P., Nijhuis, M. (2003). Applicability of a real-time quantitative PCR assay for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *J Clin Microbiol* 41(9):4378-81. doi: 10.1128/JCM.41.9.4378-4381.2003.

Wang L., Piedra P.A., Avadhanula V., Durigon E.L., Machabishvili A., López M.R., Thornburg N.J., Peret T.C.T. (2019). Duplex real-time RT-PCR assay for detection and subgroup-specific identification of human respiratory syncytial virus. *J Virol Methods.* 271:113676. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.113676.

Ward, B.M. (2005), The longest micron; transporting poxviruses out of the cell. *Cellular Microbiology*, 7: 1531-1538. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00614.x>

Yu, J.M., Fu Y.H., Peng, X.L. (2021) Genetic diversity and molecular evolution of human respiratory syncytial virus A and B. *Sci Rep* 11, 12941 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92435-1>.

Zlateva K.T., Lemey P., Vandamme A. M., Van Ranst M. (2004) Molecular Evolution and Circulation Patterns of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A: Positively Selected Sites in the Attachment G Glycoprotein. *J. Virol.*;78:4675–4683. doi: 10.1128/JVI.78.9.4675-4683.2004.