

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADUACIÓN

“Detección y caracterización del *Parechovirus A* en muestras de pacientes con infección respiratoria aguda durante los años 2011 al 2019 en Panamá”

PRESENTADO POR:

Marian del Carmen Alventas Alvarez

8-955-450

ASESOR PRINCIPAL:

Dra. Leyda Ábrego Sánchez

ASESORES:

M.Sc. Zeuz Capitán

M.Sc. Humberto Cornejo

**Trabajo de Graduación para optar
por el Grado Académico de
Licenciatura en Biología con orientación en
Microbiología y Parasitología.**

FECHA:

Diciembre, 2024.

DEDICATORIA

Este trabajo de graduación está dedicado a mis padres Isa y Omar, que, con su amor infinito, su esfuerzo y su guía no sería la mujer y profesional en la que me estoy convirtiendo hoy en día, gracias por siempre confiar en mí, en mis capacidades y jamás ponerme un limitante en la vida. De igual manera, va dedicado para mis hermanos Ana Paula y Andrés, para que puedan ver en mi un ejemplo a seguir, y que en un futuro sean unos excelentes profesionales, mucho mejores que yo.

A mis abuelos Tilcia, Adalberto y Manuel, por siempre creer en mí, y estar orgullosos de cada pequeño acontecimiento a lo largo de mi vida. A mi eterno ángel, Lupe Aracelys, sé que desde donde estás eres mi protectora y guía, y que cada día te sientes más orgullosa de mí. A mis tíos y a mi madrina, por brindarme sus consejos y su apoyo incondicional.

A mi eterno amor, por ser mi pilar en los momentos difíciles, por brindarme las palabras necesarias cuando sentía no poder más, y por siempre alentarme en alcanzar cada uno de mis propósitos.

Este trabajo es un sincero agradecimiento a cada persona que, con sus consejos, su confianza y su cálido apoyo, me acompañó durante mi formación universitaria y en la elaboración de este proyecto. Sus palabras fueron mi brújula, sus gestos, mi fuerza. A todos ellos, dedico este logro.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero darle las gracias a Dios y a mi Virgencita por la culminación de mi carrera universitaria y por la satisfacción de haber realizado este trabajo; gracias por siempre guiar mi camino, por cuidar mis noches en vela y por cada una de las experiencias y por las personas que han enriquecido mi vida.

A la Dra. Leyda Ábrego por ser más que una tutora durante estos casi dos años; gracias por las enseñanzas, por sus lecciones de vida, por sus regaños que fueron completamente necesarios, y sobre todo por brindarme su cariño y confianza, por ser una amiga y madre durante todo este proceso.

A mis asesores Zeuz Capitán Barrios, MSc. y Humberto Cornejo, MSc., por confiar en mí para la realización de este trabajo, por cada uno de los minutos invertidos, y por cada una de sus enseñanzas durante mis años de estudio.

A la Universidad de Panamá, a la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, y en especial a la Escuela de Biología, agradezco profundamente por haberme brindado una formación integral durante estos 6 años. Sus conocimientos y herramientas han sido fundamentales para mi desarrollo profesional.

De igual manera, agradecer al Instituto Conmemorativo Gorgas de la Salud, específicamente al Departamento de Virología y Biotecnología, dirigido por la Dra. Sandra López, por brindarme sus instalaciones y equipos para llevar a cabo la realización de esta investigación. De igual manera a cada uno de los colaboradores que me brindaron su apoyo, especialmente a la Sra. Ruth, el Sr. Valenzuela, Sra. Rita, Sra. Marlene, a Brechla Moreno, MSc., Lic. Yaneth y a Danilo Franco, MSc.

Al Sistema Nacional de Investigación (SIN), al Ministerio de Economía y Finanzas (MEF) y a la Secretaría Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación (SENACYT) quienes me proporcionaron los fondos para la realización de este trabajo.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	13
TAXONOMÍA	13
CICLO DE VIDA Y REPLICACIÓN	15
ESTRUCTURA GENÓMICA	15
PATOGENIA	17
MANIFESTACIONES CLÍNICAS:	17
TRANSMISIÓN	19
EPIDEMIOLOGÍA	19
DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN	20
TRATAMIENTO	20
IMPORTANCIA DEL VIRUS	21
OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
CAPÍTULO II: MÉTODOS Y MATERIALES	22
TIPO DE MUESTRA:	22
DETECCIÓN DEL VIRUS MEDIANTE RT-PCR	22
EXTRACCIÓN DE ARN	23
AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA DE PeV-A	24
RT-PCR	27
PCR Semi-anidada	29
ELECTROFORESIS	31
SECUENCIACIÓN	31
PRIMERA PURIFICACIÓN	31
REACCIÓN DE PURIFICACIÓN	32
SEGUNDA PURIFICACIÓN	32
ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN	34
CAPÍTULO III: RESULTADOS	38

DETECCIÓN DE PeV-A MEDIANTE RT-PCR:	38
AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA DE PeV-A	44
SECUENCIACIÓN	46
ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	46
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIÓN	59
RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras:

Figura 1. Vista esquemática del genoma de <i>Parechovirus</i>	16
Figura 2. Estructura del virión de PeV-A y sus proteínas estructurales.	17
Figura 3. Estructura del virión de PeV-A.	17
Figura 4. “Bebés calientes, rojos y enojados”	21
Figura 5. Algunos de los pasos del análisis y del proceso de reacción de la detección.	23
Figura 6. Búsqueda de las muestras de carácter respiratorio y análisis previo.	24
Figura 7. Organización del genoma completo de PeV-A.	25
Figura 8. Proceso de elaboración las muestras para la técnica de RT-PCR.	28
Figura 9. Proceso de elaboración de las muestras para PCR Semi-anidada.	30
Figura 10. Kits utilizados para realizar la secuenciación de los productos amplificados. ...	33
Figura 11. Preparación del equipo 3130xl Genetic Analyzer.	33
Figura 12. Imagen del software Sequencing Analysis 5.3.1.	34
Figura 13. Proceso del análisis y edición de las secuencias consenso obtenidas.	34
Figura 14. Proceso del análisis y alineamiento de las secuencias obtenidas.	35
Figura 15. Software Mega7.	35
Figura 16. Opciones escogidas para el análisis de los árboles filogenéticos.	36
Figura 17. Árbol filogenético realizado por Leal et al.,2019.	37
Figura 18. Gráfica correspondiente a la placa de análisis #9.	39
Figura 19. Gráfica representativa de los géneros de los casos positivos.	40
Figura 20. Gráfica representativa de la edad en cada uno de los casos positivos.	41
Figura 21. Gráfica representativa de la condición clínica de los casos positivos.	41
Figura 22. Gráfica representativa de las regiones y provincias de la Rep. de Panamá.	42
Figura 23. Gráfica representativa de los años del estudio.	42
Figura 24. Gráfica representativa de los síntomas presentados por los casos positivos. ..	43
Figura 25. Gráfica representativa de los meses donde obtuvimos muestras positivas.	43
Figura 26. Gráfica representativa de coinfecciones de otros virus respiratorios.	44
Figura 27. Electroforesis en gel #1	45
Figura 28. Electroforesis en gel #2.	45
Figura 29. Organización del genoma completo de PeV-A.	46
Figura 30. Herramienta BLAST del National Library of Medicine (NCBI).	48
Figura 31. BLAST de la muestra PeVh-PAM-07-2016-F10, obtenido del NCBI.	48
Figura 32. BLAST de la muestra PeVh-PAM-07-2016-F8, obtenido en el NCBI.	49
Figura 33. BLAST de la muestra PeVh-PAM-10-2017-F10, obtenida en el NCBI.	49
Figura 34. BLAST de la muestra PeVh-PAM-11-2017-F10, obtenida en el NCBI.	50
Figura 35. BLAST de la muestra PeVh-PAM-09-2017-F10, obtenida en el NCBI.	50
Figura 36. BLAST de la muestra PeVh-PAM-12-2018-F10, obtenida en el NCBI.	51
Figura 37. BLAST de la muestra PeVh-PAM-15-2019-F10, obtenida en el NCBI.	51
Figura 38. BLAST de la muestra PeVh-PAM-15-2019-F4, obtenida en el NCBI.	52
Figura 39. Alineamiento de las secuencias de referencia con las secuencias a analizar. ...	52
Figura 40. Árbol filogenético del Fragmento 4.	53
Figura 41. Árbol filogenético del Fragmento 8.	54

Figura 42. Árbol filogenético del Fragmento 10..	55
--	----

Tablas:

Tabla 1 Listado completa de cepas prototipo de PeV-A.....	14
Tabla 2. Listado de los serotipos de PeV-A y sus principales manifestaciones clínicas	14
Tabla 3 Características clínicas y de laboratorio de los cinco estudios de cohorte clínico.	18
Tabla 4. Reactivos y volúmenes utilizados para preparar las 13 placas con muestras.	22
Tabla 5. Tabla de las temperaturas utilizadas con las 13 placas.	23
Tabla 6. Lista de cebadores utilizados en la PCR 1 y en la PCR semi-anidada	26
Tabla 7. Tabla de reactivos y volúmenes utilizados para realizar los mix de los 10 fragmentos de PCR.....	27
Tabla 8. Cebadores utilizados en la PCR 1.....	27
Tabla 9. Temperaturas de annealing óptimas para cada los cebadores.....	28
Tabla 10. Protocolo del termociclador # 1.	28
Tabla 11. Cebadores utilizados en la PCR semi-anidada.....	29
Tabla 12. Tabla de reactivos y volúmenes utilizados para realizar los mix de los 10 fragmentos de PCR semi-anidada.....	29
Tabla 13. Temperaturas de annealing óptimas para cada los cebadores.	30
Tabla 14. Protocolo del termociclador # 1..	30
Tabla 15. Protocolo del termociclador para la purificación de los productos amplificados.	31
Tabla 16. Protocolo de reactivos y volúmenes del kit de secuenciación	32
Tabla 17. Protocolo de reactivos y volúmenes para el control positivo de la reacción de secuenciación.	32
Tabla 18. Protocolo de reactivos y volúmenes del kit BigDye XTerminator Purification.	33
Tabla 19. Tabla de los ID de las muestras positivas al análisis RT-PCR.....	38
Tabla 20. Información de las muestras positivas.....	40
Tabla 21. Muestras positivas a las que se le realizaron los análisis.	44
Tabla 22. Tabla de las 12 secuencias obtenidas durante el análisis.....	46
Tabla 23. Tabla de las 8 secuencias consenso obtenidas.	47
Tabla 24. Análisis de los árboles filogenéticos.....	56

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
<i>PeV-A</i>	<i>Parechovirus</i> humano
<i>nm</i>	Nanómetros, unidad de medida del SI. Equivale a una mil millonésima parte de un metro.
<i>SNC</i>	Sistema Nervioso Central
<i>PeV-B</i>	<i>Parechovirus</i> B o Ljungan
<i>RT-PCR</i>	Transcripción reversa- reacción en cadena de polimerasa
<i>LCR</i>	Líquido cefalorraquídeo
<i>ARN</i>	Ácido ribonucleico
<i>UTR</i>	Untranslated región, por sus siglas en inglés, región no traducida
<i>VPg</i>	Viral protein genom-linked, por sus siglas en inglés, proteína viral ligada al genoma.
<i>IRES</i>	Internal ribosome entry site, por sus siglas en inglés, sitio de entrada al ribosoma
<i>EV</i>	Enterovirus
<i>μl</i>	Microlitros, unidad de medida del SI. Equivale a la millonésima parte de un litro.
<i>FDA</i>	Administración de Alimentos y Medicamentos
<i>rn</i>	Recién nacidos
<i>PCR</i>	Reacción de cadena de polimerasa

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *PARECHOVIRUS A* EN MUESTRAS DE PACIENTES CON INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA DURANTE LOS AÑOS 2011 A 2019 EN PANAMÁ.

RESUMEN

Parechovirus humano (PeV-A) es un virus de ARN perteneciente a la familia Picornaviridae, que es asociado a infecciones respiratorias, gastrointestinales y del SNC, particularmente en niños pequeños. En América Latina, los datos sobre su epidemiología y detección son muy limitados. En Panamá ya se había confirmado la presencia del virus, pero se desconocía los tipos circulantes. Por esta razón, con este estudio nos propusimos analizar 1,183 muestras de pacientes con infección respiratoria aguda provenientes del programa de Fortalecimiento en la vigilancia epidemiológica de influenza y otros virus respiratorios. Estas muestras fueron analizadas mediante la técnica de RT-PCR y secuenciación genética; de las muestras analizadas obtuvimos 16 muestras positivas, la mayoría de estas muestras pertenecían principalmente a niños menores de un año, mostrando una mayor incidencia en hombres. Los casos abarcaron varias regiones del país y se distribuyeron en la mayoría de los meses del año, mostrando una circulación generalizada del virus.

Nuestros resultados revelaron una circulación significativa de PeV-A en Panamá, con la detección de los genotipos PeV-A1, PeV-A4 y PeV-A6. Además, observamos una alta frecuencia de coinfecciones con otros virus respiratorios. Estos hallazgos sugieren que los PeV-A son un agente etiológico importante de las infecciones respiratorias agudas en nuestro país y subrayan la necesidad de incluirlos en los paneles de diagnóstico. A pesar de las limitaciones del estudio, nuestros resultados aportan valiosa información para futuras investigaciones y para el desarrollo de estrategias de prevención y control de estas infecciones.

ABSTRACT

Human *Parechovirus* (PeV-A) is an RNA virus belonging to the Picornaviridae family, which is associated with respiratory, gastrointestinal and CNS infections, particularly in young children. In Latin America, data on its epidemiology and detection are very limited. In Panama, the presence of the virus had already been confirmed, but the circulating types were unknown. For this reason, with this study we proposed to analyze 1,183 samples from patients with acute respiratory infection from the program to Strengthen Epidemiological Surveillance of Influenza and Other Respiratory Viruses. These samples were analyzed using the RT-PCR technique and genetic sequencing; from the samples analyzed, we obtained 16 positive samples, most of these samples belonged mainly to children under one year of age

and showing a higher incidence in men. The cases covered several regions of the country and were distributed in most months of the year, showing widespread circulation of the virus. Phylogenetic analyses showed that PeV-A1, PeV-A4, and PeV-A6 are the types circulating in Panama, and that these can occur in co-infections with other respiratory viruses. This study highlights the importance of implementing more robust surveillance and diagnostic strategies in Panama to improve the detection and clinical management of the different respiratory infections. In addition, it contributes to the PeV-A data in the region and is a guide for future research.

INTRODUCCION

El *Parechovirus A* (PeV-A) es un virus que pertenece a la familia Picornaviridae, específicamente el género *Parechovirus* (Izumita et al., 2018). Los Picornaviridae son una familia de virus de ARN de cadena única lineal, con sentido positivo y con forma icosaédrica; esta familia se introdujo en 1963 y se divide en 6 géneros: Enterovirus, Rinovirus, *Hepatovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus* y *Parechovirus*; de estos los géneros Enterovirus y Rinovirus suelen ser los más importantes a nivel médico, ya que producen una amplia gama de enfermedades, que pueden ir desde el resfriado común hasta parálisis grave. (Bello Corredor, Mas Lago, 2001).

En 1956, durante un brote diarreico se descubrió por primera vez *Parechovirus A*, solo que en ese momento fueron clasificados como especies del género Enterovirus, específicamente como *Echovirus 22* y *23*, posteriormente, en 1999 fueron reclasificados en un género nuevo, *Parechovirus* (Sasidharan, Harrison, Banerjee, Selvarangan, 2019).

A lo largo del tiempo PeV-A ha sido objeto de creciente interés en el ámbito médico debido a que está asociado a enfermedades gastrointestinales y respiratorias leves en niños pequeños, da lugar a infecciones a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) y sepsis neonatal (Vergnano et al., 2015).

El género *Parechovirus* está clasificado en 6 especies: *Parechovirus A* o *Parechovirus* humano, *Parechovirus B* o Ljungan, *Parechovirus C* (conocido como virus Sebokele), *Parechovirus D* (conocido como *Parechovirus* del hurón), *Parechovirus E* (conocido como *Parechovirus* del halcón) y *Parechovirus F* (conocido como *Parechovirus* del Geco). PeV-A consta de 19 tipos donde los tipos A1 y A3 son los que se encuentran mayormente asociados a las infecciones a nivel mundial, y desde el 2006 el tipo A4 se ha involucrado también con infecciones (Sasidharan, Harrison, Banerjee, , Selvarangan, 2019); y la especie PeV-B, conocido también como virus Ljungan, está siendo evaluada debido a su papel como posible agente zoonótico (Tolf et al., 2009).

A la hora de aplicar métodos diagnósticos para detectar PeV-A, no se puede realizar cultivo celular ya que no es lo suficientemente sensible, por lo que se opta por realizar métodos moleculares como la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR); esta técnica cada día es más rápida, barata y requiere poco material biológico por lo que se pueden usar muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), heces, moco, tejido, etc. (Tolf et al., 2009).

En Panamá ya se ha demostrado la presencia de PeV-A como patógeno, pero se desconocen cuáles son los serotipos circulantes. Hasta la fecha el PeV-A ha sido relacionado con casos de infecciones virales durante los años 2013 y 2014 en el Hospital del Niño Dr. José Renán Esquivel de la ciudad de Panamá. Donde se dieron

casos de Infecciones virales en neonatos febriles con sepsis clínica (Gutiérrez et al; 2023).

Un 78% de los neonatos analizados no obtuvieron un diagnóstico definitivo, por lo que se cree que este porcentaje puede corresponder a infecciones virales por *Parechovirus*, Adenovirus, entre otros; sin embargo, no fueron comprobados mediante estudios moleculares (Norero et al; 2015); en el estudio de Gutiérrez et al; 2023, se analizaron 200 muestras pediátricas correspondientes a los años 2014 y 2015, de las cuales 64 eran de tipo respiratorio; de estas, 2 resultaron positivas para PeV-A, con una incidencia de 3.0%.

Por esta razón, este estudio comprende más años de análisis que contribuyan a un mayor conocimiento sobre la frecuencia de este virus en muestras respiratorias en las diferentes regiones del país.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

TAXONOMÍA

El género *Parechovirus* está compuesto por seis (6) especies, *Parechovirus* A (conocido como *Parechovirus* humano), *Parechovirus* B (conocido como virus Ljungan), *Parechovirus* C (conocido como virus Sebokele) y *Parechovirus* D (conocido como *Parechovirus* del hurón) *Parechovirus* E (conocido como *Parechovirus* del halcón) y *Parechovirus* F (conocido como *Parechovirus* del Geco). (Sridhar, Karelehto, Brouwer, Pajkrt, Wolthers, 2019). El *Parechovirus* A, consta de 19 tipos (PeV-1 a PeV-19) que son los que se encuentran asociados con infecciones humanas (Tabla 1), y los tipos PeV-A1 y PeV-A3 son los mayores causantes frecuentes de las infecciones alrededor del mundo. El *Parechovirus* B o virus de Ljungan se ha caracterizado por ser patógeno en animales (Sasidharan, Harrison, Banerjee, Selvarangan, 2019). En Estados Unidos en el año 1956, se aislaron 2 virus no identificados que provenían de muestras de heces de niños que presentaban diarrea; estos virus se clasificaron previamente como *Echovirus* 22 y 23. Para luego, en 1999, gracias a los avances moleculares se encontraron diferencias genómicas con los restos de *Echovirus*, por lo que se reclasificaron como PeV-A1a y PeV-A1b pertenecientes a un género nuevo de la familia *Picornaviridae* llamado *Parechovirus* (Sasidharan, Harrison, Banerjee, Selvarangan, 2019). En Japón en el año 2004 se descubrió PeV-A3, en 2006 PeV-A4 en Países Bajos, y así sucesivamente gracias a los desarrollos moleculares hasta obtener los 19 tipos que se mantiene actualmente.

Tipo	Cepa
PeV-A1a	Harris
PeV-A1b	BNI-788 St
PeV-A2	Williamson
PeV-A3	A308/99
PeV-A4	K251176-02
PeV-A5	CT86-6760
PeV-A6	NII561-2000
PeV-A7	PAK5045
PeV-A8	BR/217/2006
PeV-A9	BAN2004-10902
PeV-A10	BAN2004-10903
PeV-A11	BAN2004-10905
PeV-A12	BAN2004-10904
PeV-A13	BAN2024-10901
PeV-A14	451564
PeV-A15	BAN-11614
PeV-A16	BAN-11615
PeV-A17	M36/CI/2014
PeV-A18	GhanaA36 886
PeV-A19	P02-4058

Tabla 1 Listado completa de cepas prototipo de PeV-A.
Sridhar, Karelehto, Brouwer, Pajkrt, & Wolthers, 2019.

De los 19 tipos, los más comunes son los tipos A1, A3, A4 y A6, donde los tipos A1, A4 y A6 son detectados regularmente en niños pequeños de aproximadamente 2 años, en quienes se manifiestan enfermedades gastrointestinales y respiratorias asintomáticas o leves. El tipo A3 manifiestan síntomas más graves en el Sistema Nervioso Central como meningoencefalitis, sepsis neonatal, miocarditis. Otros genotipos como A2, A5, A7, A8 y A10 se presentan en niños como enfermedad gastrointestinal pero menos graves. También se han informado en estudios recientes los genotipos A13, A14, A16 y A17 [(Kung et al., 2020) (Pham et al., 2021) (Sasidharan, Harrison, Banerjee, Selvarangan, 2019) (Sridhar, Karelehto, Brouwer, Pajkrt, Wolthers, 2019) (Wang et al., 2020)].

TIPO DE PeV-A	MANIFESTACIONES CLÍNICAS
PeV-A1/ PeV-A2	Infecciones gastrointestinales y respiratorias leves. Serotipo A2 poco común.
PeV-A3	Infecciones graves, como sepsis neonatal, encefalitis, meningitis y miocarditis. Serotipo más virulento.
PeV-A4	Infecciones gastrointestinales y respiratorias. Menos virulento que A3.
PeV-A5/ PeV-A6	Infecciones respiratorias y gastroenteritis, pero son menos comunes y no se asocian con enfermedades graves.
PeV-A7	Infecciones respiratorias. Enfermedades neurológicas leves.
PeV-A8	Infecciones respiratorias y gastrointestinales, pero su asociación con enfermedades graves no es tan clara
PeV-A9	Infecciones respiratorias. Poco común.
PeV-A10/PeV-A11	Infecciones gastrointestinales y respiratorias leves.
PeV-A12 a PeV-A16	Infecciones gastrointestinales y respiratorias. Poco comunes.
PeV-A17 a PeV-A19	Identificados recientemente, se conocen poco. Infecciones gastrointestinales y respiratorias

Tabla 2. Listado de los serotipos de PeV-A y sus principales manifestaciones clínicas.
(Abedi et al., 2015) (Benschop et al., 2003) (Ito et al., 2010) (Shah and Robinson; 2014)

CICLO DE VIDA Y REPLICACIÓN

No se conoce a ciencia cierta cómo inicia la entrada de PeV-A, se cree que debe ser similar a los demás géneros de *Picornaviridae*.

Por lo que se cree que el virus se une al receptor en la superficie de la célula huésped y se inicia la endocitosis. Luego la porción del genoma de ARN se separa y se libera en el citoplasma, para que los ribosomas del huésped traduzcan el ARN viral en el precursor de la poliproteína. Se induce entonces una remodelación integral de la membrana intracelular, dando como resultado la formación de vesículas lipídicas de una o dos capas llamadas orgánulos de replicación, donde como su nombre lo indica, tiene lugar la replicación. El nuevo ARN sirve como molde para rondas adicionales de replicación o para traducir en una sola poliproteína grande de manera independiente de la caperuza. Esta poliproteína se adhiere a las proteínas estructurales y no estructurales. A diferencia de muchos otros *Picornavirus*, la proteína de la cápside PeV-A VP0 no se escinde en VP2 y VP4 dentro del virión maduro. Otra característica única de PeV-A es que la proteína no estructural 2A no tiene actividad proteolítica e induce la detención de la traducción en el huésped. Al final del ciclo de replicación, el ARN es encapsulado por proteínas estructurales y forma nuevas partículas infecciosas. El último paso en el ciclo de vida de PeV-A es su liberación de la célula huésped.

La diseminación del virus puede ocurrir a través de varios mecanismos. Tradicionalmente, se pensaba que los virus sin envoltura se liberaban mediante lisis celular. Sin embargo, varios informes independientes sugieren que es un mecanismo de terminación no lítico alternativo; algunos salen de células infectadas dentro de vesículas formadas a partir de la célula huésped. Se sabe que PeV-A se libera a través de lisis celular (*Sridhar, Karelehto, Brouwer, Pajkrt, Wolthers, 2019*).

ESTRUCTURA GENÓMICA

El virión de PeV-A consta de aproximadamente 30nm de diámetro, está compuesto por un genoma de ARN cadena simple con sentido positivo, el cual se encuentra protegido por una cápside proteica que carece de una envoltura lipídica. Su genoma consta de una longitud aproximada de 7,100 a 8,500 nucleótidos (nt) (*Stanway Hyypiä, 1999*), contiene un solo marco de lectura abierto que se encuentra rodeado por regiones no traducidas (UTR). El 700 nt 5'UTR se encarga de formar estructuras primarias y secundarias del ARN que son necesarias al momento de la replicación uniéndose a la proteína viral VPg (actúa como primer durante la síntesis de ARN). Dentro del 5'UTR existe un sitio de entrada ribosomal interna (IRES) donde se facilita la traducción directa independiente de la caperuza de una sola poliproteína grande que se adhiere a tres proteínas estructurales (VP0, VP3 Y VP1) y siete

proteínas no estructurales (2A-2C y 3A-3C) (Figura 1). El 300nt 3'UTR termina con una cola poliadenilada.

La cápside de los *Picornaviridae* toma forma icosaédrica; en esta, se encuentran 3 proteínas que se ensamblan y forman un protómero, cinco protómeros forman un pentámero, por lo que se estarían formando 12 pentámeros que dan como resultado el icosaedro (Figura 2).

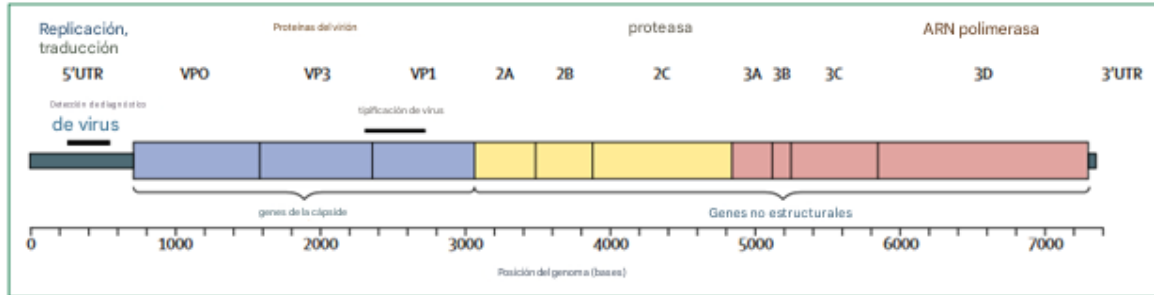


Figura 1. Vista esquemática del genoma de *Parechovirus*. Kadambari, Harvala, Simmonds, Pollard, Sadarangani, 2018.

Gracias a las estructuras atómicas de Pe-A se han evidenciado diferencias del género *Parechovirus* del resto de los géneros de *Picornaviridae*. Se ha podido evidenciar que la cápside de PeV-A es plana, también, que se pierde el bolsillo hidrofóbico VP1. La proteína VP0 no se adhiere en las proteínas VP2 y VP4 en el virión maduro. Se ha podido determinar, que las señales de empaquetamiento del ARN son las encargadas de guiar el ensamblaje de la cápside. Y que en PeV-A no se observa la presencia de procápsidas (partículas vacías desprovistas de ARN) [(Kadambari, Harvala, Simmonds, Pollard, Sadarangani, 2018) (Sridhar, Karelehto, Brouwer, Pajkrt, Wolthers, 2019)].

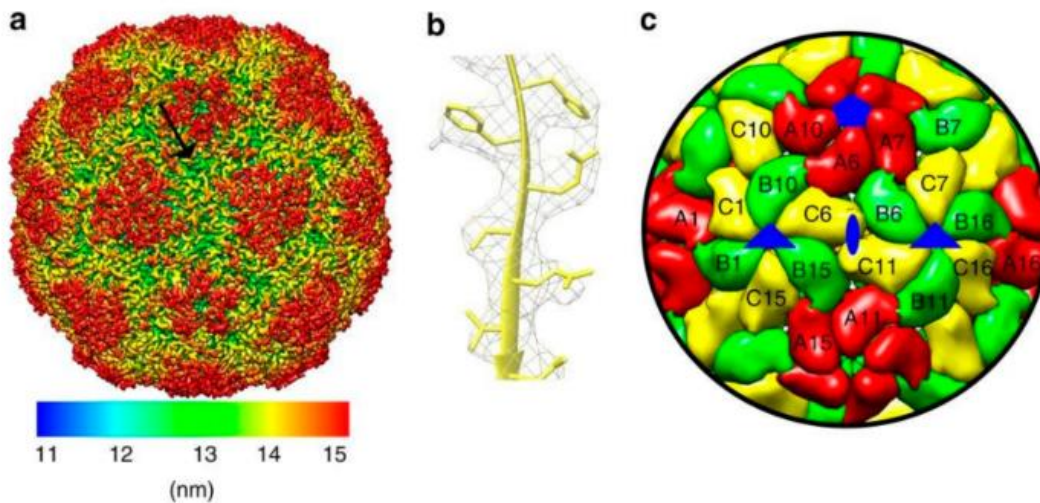


Figura 2. Estructura del virión de PeV-A y sus proteínas estructurales. a) doble eje de simetría de PeV-A3 (*Parechovirus A*). b) Ajuste representativo del modelo atómico de VP0. C) modelo de la cápside donde se muestra las posiciones de las proteínas estructurales VP0 (amarilla), VP1 (rojo) y VP3 (verde); los puntos azules representan los ejes de simetría, que son 3: pentágono quintuple, triángulo triple y elipse doble.

Sridhar, Karelehto, Brouwer, Pajkrt, Wolthers, 2019.

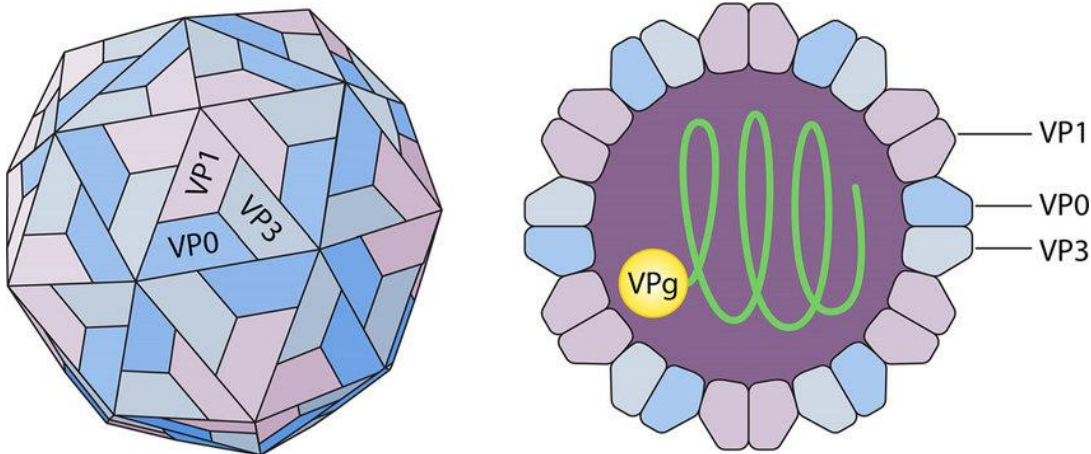


Figura 3. Estructura del virión de PeV-A.
Walls, Tony. (2017).

PATOGENIA

Actualmente no se ha podido determinar a ciencia cierta cómo se desarrolla la patogenicidad de PeV-A, debido a los escasos modelos la comprensión es limitada. Se desconoce el sitio exacto de replicación primaria, el tropismo celular inicial, así como cuáles son sus órganos dianas (Sridhar, Karelehto, Brouwer, Pajkrt, Wolthers, 2019).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS:

PeV-A causa un amplio espectro de enfermedades que van desde ser asintomáticos, a enfermedades autolimitadas y hasta producirse casos graves, capaces de causar la muerte (Vergnano et al., 2015). En la actualidad no se ha podido establecer una asociación entre los síntomas y los tipos de PeV-A. Los síntomas asociados a PeV-A1 son gastroenteritis aguda, síntomas del tracto respiratorio superior, fiebre y erupción cutánea frecuentemente presentada en menores de 6 meses a 5 años. PeV-A3 suele presentarse en menores de 3 meses, se ha podido observar brotes de sepsis neonatal, síndromes del SNC como la parálisis flácida aguda, meningitis y encefalitis; y en algunos adultos se ha podido determinar que provoca mialgia y miocarditis, a pesar de que la detección en adultos es rara (Sridhar, Karelehto, Brouwer, Pajkrt, Wolthers, 2019). La miocarditis en este tipo de infecciones se ve como un síntoma grave, pero se

considera un evento raro tanto en menores como en adultos (*Kadambari, Harvala, Simmonds, Pollard, Sadarangani, 2018*).

Debido a una evaluación hecha por “Kadambari, et. al, 2018” de los estudios más grandes de PeV-A, se ha podido determinar que las manifestaciones clínicas más comunes, sin llegar a ser graves, de una infección por PeV-A son fiebre, irritabilidad, mala alimentación, taquicardia y erupción cutánea (*Tabla 2*); también se ha podido asociar la erupción maculopapular con este tipo de infecciones. En otros estudios, también se ha podido demostrar que PeV-A puede causar un compromiso en la materia blanca cerebral, capaz de reducir la capacidad física y de aprendizaje del infectado prolongándose hasta los 7 años del menor.

Tabla comparativa sobre de las características clínicas y de laboratorios de los cinco estudios clínicos de cohortes más grandes y sobresalientes sobre PeVH hasta la fecha					
Características	Autores				
	Khatami et al, Australia (n=118)	Vergnano et al, Reino Unido (n=50)	Wildenbeest et al, Países Bajos (n=138)	Sharp et al, Estados Unidos (n=66)	Selvanrangan et al, Estado Unidos (n=58)
Demografía	Cohorte clínica retrospectiva menor de 12 meses (con una mediana de 39 días) en comparación con 4 meses en 2013, en cinco hospitales durante el brote de PeVH; El 75% de los lactantes tenía menos de 60 días; el 55% eran hombres; El 25% ingresó en una UCI.	Cohorte clínica retrospectiva de menos de 12 meses entre 2008 y 2012, en tres hospitales; El 48% de los lactantes tenía menos de 30 días de edad; el 56% eran hombres; El 50% ingresó en una UCI.	Estudio molecular universal de muestras de heces recolectadas entre 2004 y 2008, en dos hospitales; El 43% de los lactantes con PeVH1 y el 69% con PeVH3 tenían menos de 6 meses; El 59 % de los lactantes con PeVH1 y el 65 % con PeVH3 eran varones; Se desconoce el número de admisiones a la UCI.	Estudio molecular universal en muestras de LCR recolectadas durante 5 meses en 2009, en un hospital; El 100% de los lactantes tenían menos de 5 meses; El 60% de los lactantes eran varones; El 12% de los lactantes ingresaron en una UCI.	Estudio molecular universal en muestras de LCR entre 2006 y 2008, en un centro terciario; los lactantes tenían una edad media de 6,6 semanas; El 70% de los lactantes eran varones; Se desconoce el número de admisiones a la UCI.
Tipo de virus (% en infantes)	PeVH3 100%	No probado	PeVH1 (81%), PeVH3 (19%)	PeVH3 (51 [77%] de 66 muestras de LCR positivas)	PeVH3 (52 [98%] de 53 muestras de LCR positivas)
Principales características clínicas en la presentación (% en infantes)	Taquicardia (98%), fiebre (94%), irritabilidad (93%), taquipnea (91%), mala perfusión (55%).	Malnutrición (96%), fiebre (82%), apariencia enfermiza (74%), irritabilidad (64%), moteado (54%)	PeVH1: síntomas gastrointestinales (97%), infección en el sistema respiratorio superior (39%). PeVH3: síntomas gastrointestinales (80%), fiebre (53%), síntomas en la piel (37%), síntomas neurológicos (32%).	Fiebre (91%), irritabilidad (91%)	Irritabilidad (98%), fiebre (95%), erupción no específica (59%)
Mediciones de laboratorio en la presentación (% en infantes)	Ausencia de pleocitosis en LCR (96%); PCR menor de 10 mg/dL (69%); TTPA más 50 s/PT (54%); Recuento de glóbulos blancos menor de 1×10^9 células por litro (19%); plaquetas menor 510×10^9 plaquetas por L (10%); AST/ALY más de 100 U/L (33%).	Ausencia de pleocitosis en LCR (95%); trastornos de la coagulación (95%, sólo 18 bebés evaluados); PCR menos de 10 mg/dL (80%); AST/ALT más 100 U/L (45%).	No medido	Ausencia de pleocitosis del LCR (98%)	Ausencia de pleocitosis del LCR (88%)
Seguimiento del caso, después del alta médica	Durante los 6 meses de seguimiento, cuatro infantes presentaron retraso en la motricidad gruesa.	Un infante muerto. 6 de 19 (32%) presentaron retraso en el desarrollo; 3 presentaron secuelas neurológicas identificables hasta los 18 meses de edad.	No medido	No medido	No medido
<p>PeVH= Parechovirus humano. UCI= Unidad de terapia intensiva. LCR= líquido cefalorraquídeo. PCR= proteína C-reactiva. TTPA= tiempo de tromboplastina parcial activado. AST= aspartato transaminasa. ALT= alanina transaminasa.</p>					

Tabla 3 Características clínicas y de laboratorio de los cinco estudios de cohorte clínico de PeV-A más recientes y grandes hasta la fecha.
Kadambari, et. al, 2018

TRANSMISIÓN

Las principales vías de transmisión de PeV-A son la ruta fecal-oral y la vía respiratoria por medio de aerosoles, fómites, gotitas respiratorias. Debido a las vías de transmisión se ha aumentado la frecuencia en la transmisión intrafamiliar (*Izumita et al., 2018*).

Se ha logrado estimar que PeV-A puede persistir de 1 a 3 semanas en el tracto respiratorio, y de 2 a 8 semanas en las heces, que serían los puntos clave de la transmisión familiar de este tipo de virus. De igual manera, al ser una infección que ataca principalmente a niños menores, cuando se presentan en adultos suele presentarse en síntomas leves o son asintomáticos por lo que estos familiares serían uno de los principales focos de infección a través de cualquiera de las rutas a los recién nacidos y a los niños pequeños. En un estudio de Li et al., 2014, se encontraron evidencia que los parques públicos infantiles son un reservorio potencial de la transmisión de este tipo de virus, por lo que se recomienda realizar desinfecciones periódicas en estas instalaciones, sobre todo cuando hay brotes de enfermedades respiratorias y gastrointestinales en la población [(*Izumita et al., 2018*) (*Sridhar, Karelehto, Brouwer, Pajkrt, Wolthers, 2019*)].

EPIDEMIOLOGÍA

A pesar de los avances tecnológicos, aún se desconoce la verdadera carga viral de las infecciones por PeV-A. En Latinoamérica y en otros países de ingresos bajos no existen datos publicados sobre la presencia de PeV-A ni sobre la carga de enfermedad, estos datos son necesarios para poder identificar las poblaciones en riesgo, el conocer cuáles con los tipos predominantes y las manifestaciones clínicas que provocan (*Hayes et al., 2020*).

Las infecciones por PeV-A se presenta en toda la población; al menos un 95% de la población adulta son seropositivos para anticuerpos específicos para PeV-A1. Pero se ha podido demostrar que las infecciones por PeV-A se adquieren en la primera infancia, ya que la edad media de adquisición de la infección es de 18 meses y que el 20% de los niños infectan después de su primer año de vida. Sabemos que PeV-A se considera como un virus cosmopolita, ya que se ha detectado en el 2% de las muestras recolectadas en niños con sospecha clínica de infecciones virales.

La prevalencia genotípica varía a nivel mundial, en Estados Unidos, Asia y Europa predominan los tipos A1, A3 y A4. En la región de India y Pakistán se presenta mayor diversidad de genotipos como los A14, A10, A13, A16, A11, que son poco comunes; en África A1, A2 y A3 son los más frecuentes, pero se detectan casi todos los genotipos [(*Sridhar, Karelehto, Brouwer, Pajkrt, Wolthers, 2019*) (*Patil et al., 2017*)].

DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

PeV-A es capaz de detectarse a partir de muestras de heces, hisopados nasofaríngeos, sangre, mucosa y líquido cefalorraquídeo (LCR) (Sridhar, Karelehto, Brouwer, Pajkrt, Wolthers, 2019). Conociendo que los rendimientos de las pruebas moleculares varían según el tipo de virus, el diagnóstico molecular basado en la reacción de cadena de polimerasa (PCR) es el mejor enfoque para la detección de PeV-A; cada día esta prueba suele ser más económica, rápida y requiere poca cantidad de material biológico [(Kung et al., 2020) (Vergnano et al., 2015)]. El gen de PeV-A, se divide en regiones capaces de codificar las proteínas estructurales, VP0, VP3 y VP1. Estas se ensamblan para crear las partículas del virus y proteínas como ARN polimerasa y proteasa que son utilizadas durante la replicación. En el genoma, la PCR actúa dirigiéndose a la 5'UTR para la detección del virus, ya que es la región mejor conservada, mientras que las regiones VP1 y VP3 se utilizan para la tipificación del virus (Kadambari, Harvala, Simmonds, Pollard, Sadarangani, 2018).

TRATAMIENTO

En la actualidad, a la hora de tratar una infección por PeV-A se enfocan en una atención primaria de los síntomas que se vayan presentando y tratar de administrar una inmunización pasiva como si se tratara de una infección por Enterovirus o Rinovirus, ya que no existen tratamientos antivirales específicos que actúen en contra de la infección por PeV-A. Pero se ha podido demostrar que los tratamientos convencionales contra EV no funcionan en los casos de infección por PeV-A debido a las diferencias en la morfología de la cápside, las funciones de la proteasa y el factor del huésped.

Por el momento no existen ensayos clínicos de tratamiento en fase 2 o fase 3. El plenocaril es un antibiótico inhibidor de la cápside de EV, inhibidor del revestimiento de ARN viral y de los viriones de la progenie durante la replicación, sin embargo, estudios han demostrado que en PeV-A3 su sitio de unión se encuentra bloqueado, por lo que no tendría efecto sobre la replicación de PeV-A.

La inmunoglobulina intravenosa ha demostrado eficacia en infecciones similares, pero los datos han sido restringidos a informes de casos y no estudios como tal; en uno de estos casos se pudo evidenciar el uso exitoso de este tratamiento en un bebé con miocarditis severa y miocardiopatía dilatada causada por PeV-A1.

El Itraconazol (IZT) es un agente antifúngico del cual se ha podido demostrar mediante pruebas *in vitro* que tiene actividad antiviral contra PeV-A3, pero no contra PeV-A1 y PeV-A6; este antiviral ha sido aprobado por la FDA y presenta un perfil saludable para paciente pediátricos, pero necesita más investigaciones en cuanto a la patogenia de PeV-A para realizar protocolos antivirales exitosos [(Rhoden et al., 2018)(Kadambari, Harvala, Simmonds, Pollard, Sadarangani, 2018) (Sridhar, Karelehto, Brouwer, Pajkrt, Wolthers, 2019)].

IMPORTANCIA DEL VIRUS

Al ser un virus que afecta principalmente a niños pequeños (≥ 5 años) debe existir una buena educación sobre la higiene, especialmente en guarderías y entornos donde hay bebés, es crucial para prevenir su propagación. Ya que los síntomas van desde leves, como fiebre, tos, dificultad respiratoria, diarrea, entre otros; pueden causar enfermedades graves como meningitis, encefalitis y sepsis que pueden llevar a complicaciones neurológicas y, en casos severos, a la muerte. (Walls, Tony;2017).



Figura 4. “Bebés calientes, rojos y enojados”; esta frase es una característica en los cuartos de emergencia cuando se presentan infantes con sepsis neonatal producida por PeV-A. Walls, Tony. (2017).

OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

Detectar y caracterizar el virus *Parechovirus* humano en muestras provenientes de pacientes con infección respiratoria aguda durante los años 2011 al 2019 en Panamá.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia del *Parechovirus* humano en muestras respiratorias con resultados negativos a los virus respiratorios más frecuentes.

2. Evaluar posibles casos de coinfección del *Parechovirus* humano con otros virus respiratorios.
3. Evaluar la frecuencia de *Parechovirus* humano según los datos epidemiológicos de cada paciente.
4. Caracterizar molecularmente las muestras positivas y compararlas filogenéticamente con las secuencias de otros países.

CAPÍTULO II: MÉTODOS Y MATERIALES

TIPO DE MUESTRA:

Se emplearon 1,183 muestras respiratorias recolectadas entre 2011 y 2019 en el marco del proyecto “Fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica de influenza y otros virus respiratorios”.

DETECCIÓN DEL VIRUS MEDIANTE RT-PCR

Se analizaron un total de 1,183 muestras previamente extraídas. Estos ARN se utilizaron para detectar mediante una RT-PCR en tiempo real, la presencia del virus PeV-A. Esta prueba se realizó siguiendo el protocolo descrito por *Benschop et al., 2010*. Utilizamos 2 microlitros de ARN extraído, 0.25 microlitros del set de primers ParechoF31 (5’CTGGGGCCAAAAGCCA-3’,441-457) y K30 (5’-GGTACCTTCTGGGCATCCTTC-3’,584-572) y de la sonda FAM-HPeV-MGB (5’-AACACTAGTTGTA(A/T)GGCCC-3’,577-556). LA RT-PCR se llevó a cabo mediante el kit de amplificación AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Applied Biosystem Life Technologies) del cual utilizamos 1.75 microlitros del agua libre de nucleasas, 5 microlitros del buffer 2x y 0.5 microlitros de la enzima mix (*Tabla 3*).

Seguidamente, realizamos el cálculo de mezcla de reacción para preparar 13 placas de 96 pocillos. Posteriormente agregamos el ARN y efectuamos la amplificación utilizando el equipo Quant Studio 5 que analizó las muestras a una serie de temperaturas específicas (*Tabla 4*) y en un tiempo determinado por el equipo mediante el software Quantum Design Analyse; este nos señaló mediante una curva de amplificación las muestras positivas.

Protocolo de reactivos del kit de amplificación AgPath-ID One-Step RT-PCR	
Reactivos	Volúmenes
H2O libre de nucleasas	1.75 µl
Buffer 2x	5 µl
Enzima mix	0.5 µl
HPeV Primer Forward (F31)	0.25 µl
HPeV Primer Reverse (K30)	0.25 µl
Sonda	0.25 µl
Muestra de ARN	2 µl

Tabla 4. Reactivos y volúmenes utilizados para preparar las 13 placas con muestras.

Protocolo de temperaturas del Quant Studio 5		
Nº de ciclos	Tiempo	Temperatura
1	10 minutos	45°C
1	10 minutos	95°C
45	15 segundos	94°C
45	30 segundos	58°C

Tabla 5. Tabla de las temperaturas utilizadas con las 13 placas a la hora de analizarlas en el equipo Quant Studio 5.

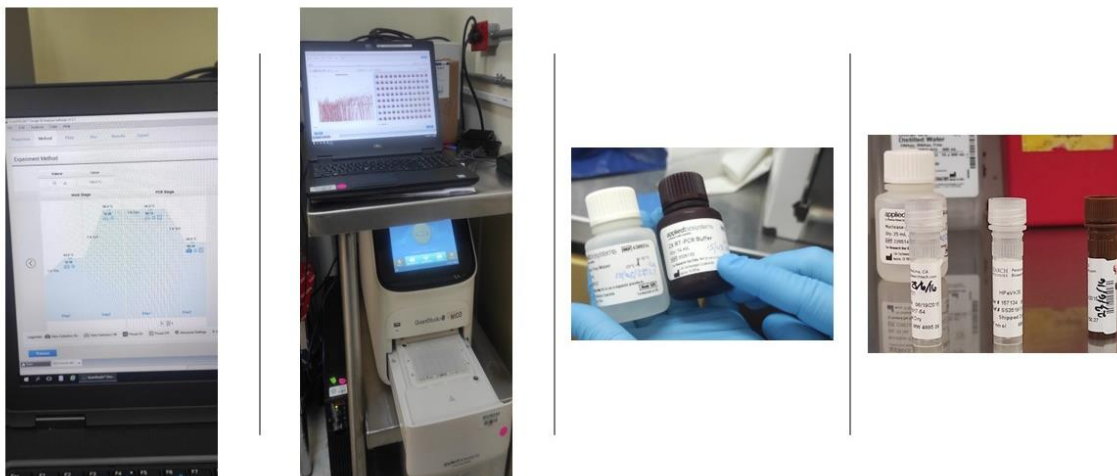


Figura 5. Algunos de los pasos del análisis y del proceso de reacción de la detección de PeV-A mediante RT-PCR en el equipo Quant Studio 5 en el Laboratorio de Extracción del Departamento de Virología y Biotecnología del ICGES.

EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción de ARN se realizó utilizando el kit QIAamp mini (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añadieron 5.6 μ L de carrier ARN. Posteriormente, se adicionaron 560 μ L de buffer AVL, seguido de 140 μ L de la muestra. La mezcla se homogenizó mediante vórtex durante unos segundos y se incubó a temperatura ambiente (20-25°C) durante 10 minutos.

Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó el tubo a 8000 rpm durante un minuto para eliminar las gotas adheridas a las paredes. Se añadieron 560 μ L de etanol absoluto a cada tubo, se mezcló mediante vórtex y se centrifugó nuevamente a 8000 rpm durante un minuto.

Se transfirieron 630 μ L de la mezcla a una columna QIAamp mini y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. La columna se colocó en un nuevo tubo de recolección, descartando el que contenía el filtrado. Este proceso se repitió hasta que la totalidad de la mezcla se cargó en la columna.

Se añadieron 500 μ L de solución de lavado AW1 a la columna y se centrifugó a 8000 rpm durante un minuto. Posteriormente, se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección y se añadieron 500 μ L de solución de lavado AW2. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos, descartando el tubo con el filtrado.

Finalmente, se colocó la columna en un tubo limpio y se añadieron 70 μ L de agua libre de nucleasas. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto para permitir la elución del ARN. Se realizó una última centrifugación a 8000 rpm durante 1 minuto para recolectar el ARN eluido. El ARN extraído se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis."



Figura 6. Búsqueda de las muestras de carácter respiratorio y análisis previo para la extracción del ADN.

AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA DE PeV-A

Para realizar la amplificación del genoma completo de PeV-A, se siguió el protocolo descrito por *Chieochansin, et al 2021*. Se realizó una primera RT-PCR y a partir del producto de esta se efectuó una PCR semi-anidada. Para esto utilizamos un listado de cebadores diseñados para 10 fragmentos de PCR superpuestos basados en la base de datos de GenBank (*Tabla 5*) (*Figura 7*). Los cebadores fueron resuspendidos en agua libre de nucleasas, ajustando su volumen de acuerdo con la concentración específica indicada en la hoja de datos de cada uno.

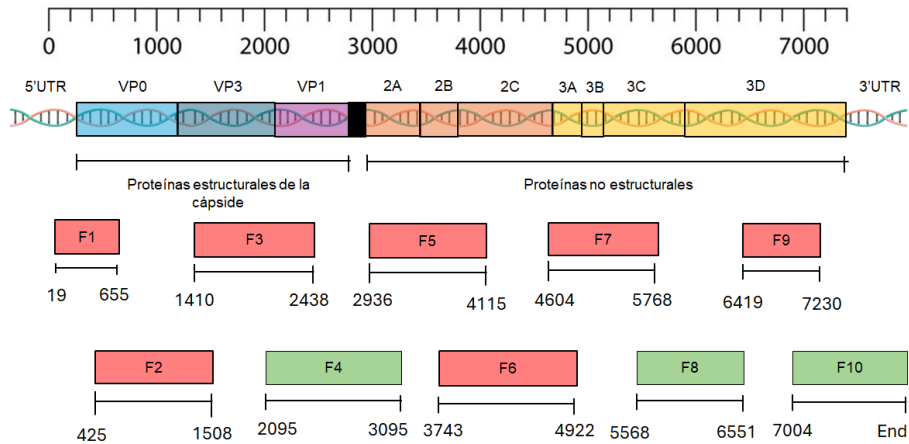


Figura 7. Organización del genoma completo de PeV-A y la ubicación de los 10 fragmentos resultantes de la PCR.

Fragmento de PCR	Nombre del cebador	Dirección	Secuencia del cebador (5'-3')	Posición (5'-3') con L02971	Gen	~Tamaño en 2da PCR (bp)
F1	HPeV-20-OS	Outer Sense	GAR AGC TTG SCC GTM GGG CCT TA	19-41		
	HPeV-588-IAS	Inner Antisense	CAG ATC CRY AGT GYC DCT TGT TAC C	606-582	5'UTR	563
	HPeV-660-OAS	Outer Antisense	TCC CCC YYB BRY BTG GCC CRY	675-655		
F2	HPeV- 423-OS	Outer Sense	ACA CGR TGC CYC YGG GGC C	425-443		
	HPeV- 447-IS	Inner Sense	GCC RAA AGC CRM GGT TTR RYA RAC C	440-460	VP0	1,068
	HPeV- 1527-OAS	Outer Antisense	TTY YGR AAR TCH ARY GBA RYA RRC TNC C	1536-1508		
F3	HPeV-1440-OS	Outer Sense	RRA CNG AYT CRT CDG AYY TAG GGC	1410-1433		
	HPeV-VP-OAS	Outer Antisense	ACW GTR AAR ATR TCH ACA TSA TDG	2524-2499	VP3	1,048
	HPeV-VP-IAS	Inner Antisense	DGG YCC ATC ATC YTG WGC TGA	2458-2438		
F4	HPeV-VP-OS	Outer Sense	GAY AAT GCY ATM AYA CWA TYT GTG A	2090-2115		
	HPeV-3231-OAS	Outer Antisense	TCA CAY TCY TCY TCA AYD AYC CAR TCT G	3231-3204	VP1	961
	HPeV-VP-IS	Inner Sense	TTY TCM ACH TGG ATG MGG AAR AC	2159-2181		

Fragmento de PCR	Nombre del cebador	Dirección	Secuencia del cebador (5'-3')	Posición (5'-3') con L02971	Gen	~Tamaño en 2da PCR (bp)
	HPeV-3117-IAS	Inner Antisense	CCH YCH ACW ATR ATD CCA TAR TGY TT	3120-3095		
F5	HPeV- 2973-OS	Outer Sense	YTN AGR TGY CCH AAY YTN TTY TTY CC	2936-2961		
	HPeV- 3945-IAS	Inner Antisense	YTT NAD NAR DGT DTG NAY CCA CCA	3919-3896	2A-2C	983
	HPeV- 4164-OAS	Outer Antisense	CAR CTR AAR CAN ATD GCC ATD ATD GG	4140-4115		
F6	HPeV- 3792-OS	Outer Sense	GCN GAR RTD GTD GCN GAR TCH ATG TC	3743-3768		
	HPeV- 4753-IAS	Inner Antisense	CYC TNC CRT TYT TNG ANA CYT CCC	4727-4740	2B-3A	984
	HPeV- 4971-OAS	Outer Antisense	YTC CAT YKG YTC RAT NAR NGT NGA CAT	4948-4922		
F7	HPeV- 4679-OS	Outer Sense	TTY CCN TAY ATH ATG CAY ATY MGR GC	4604-4629		
	HPeV- 5742-IAS	Inner Antisense	RCA CRT NCC TTT RCA DGA YTT NAC NGT	5719-5693	3A-3C	1,115
	HPeV- 5817-OAS	Outer Antisense	ATY TCH CCR TTN CCW GCD ATR TGC AT	5793-5768		
F8	HPeV- 5617-OS	Outer Sense	GNW CWG ARA RYA TGY TVA THT GGA TGA C	5568-5595		
	HPeV- 6564-IAS	Inner Antisense	TTN ADD GCR YTD ATC ATR AAR TGC	6540-6517	3C-3D	972
	HPeV- 6600-OAS	Outer Antisense	CCR TCR TAY TGD GAR TAR TCC ATY TCA TA	6579-6551		
F9	HPeV- 3D-OS	Outer Sense	GTN TAY AGR ATG ATH ATG ATG GAR A	6419-6443		
	HPeV- 3D-IAS	Inner Antisense	ATN ACM ACW TCA TAA TCA TCC AC	7221-7199	3D	806
	HPeV- 3D-OAS	Outer Antisense	YTT ART CAA CAC CAT GGG CAY YA	7253-7230		
F10	HPeV- 7053-OS	Outer Sense	TTY CCA GAG TCH ACW TTY ATA GTA GG	7004-7029		
	HPeV- 7089-IS	Inner Sense	ACT GAA AAY ATG ATA CAR CAY YTA ATG TGG	7040-7069	3D- 3'UTR	500
	HPeV-3'UTR	Outer Antisense	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTK SBV ADG T	End		

Tabla 6. Lista de cebadores utilizados en la PCR 1 y en la PCR semi-anidada para amplificar el genoma de PeV-A. La tabla se divide en el fragmento de PCR, los nombres de cada uno de los cebadores con su dirección, su primera secuencia, la posición, el gen y el tamaño que se debe esperar resultante en la PCR semi-anidada. *Chieochansin, Puenpa, Poovorawan, 2021*

RT-PCR

Se utilizó el kit Super Script III one-step RT-PCR System, para cada grupo de cebadores se realizó un mix (Tabla 7). Se siguieron las indicaciones dadas por el fabricante y 5 μ l de ARN para la prueba hasta obtener un volumen final de 50 μ l (Figura 8).

Kit Super Script III one-step qRT-PCR System	
Reactivos	Volúmenes
ARN	5 μ l
Primer Forward	1 μ l
Primer Reverse	1 μ l
Enzima	2 μ l
Master mix	25 μ l
Agua libre de nucleasas	16 μ l

Tabla 7. Tabla de reactivos y volúmenes utilizados para realizar los mix de los 10 fragmentos de PCR.

Listado de cebadores utilizados para la PCR 1		
Fragmento de PCR	Nombre del cebador	Dirección
F1	HPEV-20-OS	Outer sense
	HPEV-660-OAS	Outer antisense
F2	HPEV-423-OS	Outer sense
	HPEV-1527-OAS	Outer antisense
F3	HPEV-1440-OS	Outer sense
	HPEV-VP-OAS	Outer antisense
F4	HPEV-VP-OS	Outer sense
	HPEV-3231-OAS	Outer antisense
F5	HPEV-2973-OS	Outer sense
	HPEV-4164-OAS	Outer antisense
F6	HPEV-3792-OS	Outer sense
	HPEV-4971-OAS	Outer antisense
F7	HPEV-4679-OS	Outer sense
	HPEV-5817-OAS	Outer antisense
F8	HPEV-5617-OS	Outer sense
	HPEV-6600-OAS	Outer antisense
F9	HPEV-3D-OS	Outer sense
	HPEV-3D-OAS	Outer antisense
F10	HPEV-7053-OS	Outer sense
	HPEV-3'UTR	Outer antisense

Tabla 8. Cebadores utilizados en la PCR 1.

Para realizar la reacción en el termociclador se debió primero calcular la mejor temperatura de alineamiento ya que se trabajó con diferente set de cebadores (tabla 8). En la tabla 9 se muestra las temperaturas de alineamiento utilizadas. Las condiciones de la reacción se ven en la tabla 10.

Temperaturas de <i>annealing</i> de los cebadores	
Temperaturas	Fragmentos de PCR
60°C	F1, F2
55°C	F6, F7
50°C	F3, F4, F5, F8, F9, F10

Tabla 9. Temperaturas de *annealing* óptimas para cada los cebadores divididos por fragmentos.

Protocolo del termociclador			
Pasos	Ciclos	Temperaturas	Tiempo
Paso 1	1 ciclo	55°C	30 minutos
		94°C	2 minutos
Paso 2	40 ciclos	94°C	30 segundos
		Calentamiento	30 segundos
		68°C	1 minuto 10 seg.
Paso 3	1 ciclo	68°C	5 minutos

Tabla 10. Protocolo del termociclador # 1. Este fue utilizado para los fragmentos F1-F2 y F6-F7. Para los fragmentos restantes utilizamos el mismo protocolo solo cambiando la temperatura a 50°C en otro termociclador.

El producto obtenido se guardó en un congelador a -80°C.



Figura 8. Proceso de elaboración las muestras para la técnica de RT-PCR con el kit Super Script III one-step qRT-PCR.

PCR Semi-anidada

Del producto de la RT-PCR anterior, se utilizaron 2 µl para la realizar la PCR semi-anidada. Para esto se utilizó el kit Phusion Hot Start Flex 2x Master Mix (Tabla 12). Para preparar esta reacción, se utilizaron los cebadores outer y uno inner, exceptuando al F4 que tiene ambos cebadores inner (Tabla 11).

Listado de cebadores utilizados para la PCR semi-anidada		
Fragmento de PCR	Nombre del cebador	Dirección
F1	HPeV-20-OS	Outer sense
	HPeV-588-IAS	Inner antisense
F2	HPeV-447-IS	Inner sense
	HPeV-1527-OAS	Outer antisense
F3	HPeV-1440-OS	Outer sense
	HPeV-VP-IAS	Inner antisense
F4	HPeV-VP-IS	Inner sense
	HPeV-3117-IAS	Inner antisense
F5	HPeV-2973-OS	Outer sense
	HPeV-3945-IAS	Inner antisense
F6	HPeV-3792-OS	Outer sense
	HPeV-4753-IAS	Inner antisense
F7	HPeV-4679-OS	Outer sense
	HPeV-5742-IAS	Inner antisense
F8	HPeV-5617-OS	Outer sense
	HPeV-6564-IAS	Inner antisense
F9	HPeV-3D-OS	Outer sense
	HPeV-3D-IAS	Inner antisense
F10	HPeV-7089-IS	Inner sense
	HPeV-3'UTR	Outer antisense

Tabla 11. Cebadores utilizados en la PCR semi-anidada.

Kit Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix	
Reactivos	Volúmenes
Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix	12.5 µl
Primer Forward	1.25 µ
Primer Reverse	1.25 µl
Muestra de ADN	2 µl
DMSO	0.75 µl
Agua libre de nucleasas	7.25 µl

Tabla 12. Tabla de reactivos y volúmenes utilizados para realizar los mix de los 10 fragmentos de PCR semi-anidada.

Para realizar la reacción en el termociclador se debió primero calcular la mejor temperatura de alineamiento ya que se trabajó con diferente set de cebadores (tabla

11). En la tabla 13 se muestra las temperaturas de alineamiento utilizadas. Las condiciones de la reacción se ven en la tabla 14.

Temperaturas de <i>annealing</i> de los cebadores	
Temperaturas	Fragmentos de PCR
60°C	F1, F2
55°C	F6, F7
50°C	F3, F4, F5, F8, F9, F10

Tabla 13. Temperaturas de *annealing* óptimas para cada los cebadores divididos por fragmentos.

Protocolo del termociclador			
Pasos	Ciclos	Temperaturas	Tiempo
Paso 1	1 ciclo	98°C	30 segundos
Paso 2	25-35 ciclos	98°C	5-10 segundos
		45-72°C	10-30 segundos
		72°C	15-30 segundos
Paso 3	1 ciclo	72°C	5-10 minutos

Tabla 14. Protocolo del termociclador # 1. Este fue utilizado para los fragmentos F1-F2 y F6-F7. Para los fragmentos restantes utilizamos el mismo protocolo solo cambiando la temperatura a 50°C.

El producto obtenido se guardó en un congelador a -80°C.



Figura 9. Proceso de elaboración de las muestras para la técnica de PCR Semi-anidada con el kit Phusion Hot Star Flex 2x Master Mix.

ELECTROFORESIS

Los productos de la PCR semi-anidada fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% y 3 µl de bromuro de etidio. Las muestras amplificadas se pudieron observar en un fotodocumentador de luz UV.

SECUENCIACIÓN

Una vez se visualizaron los productos amplificadas, estos fueron sometidos a secuenciación de Sanger, por capilaridad.

Primero llevamos los cebadores de los fragmentos amplificadas utilizados en la PCR semi-anidada de una concentración de 10mM a una concentración de 3.2mM (*Ecuación 1*), con un volumen final de 20 µl por cebador.

$$V_1C_1 = V_2C_2$$
$$V_1 = \frac{(20 \mu l)(3.2 \mu l)}{10mM}$$
$$V_1 = 6.4 \mu l \text{ por cada cebador}$$

Ecuación 1. Ecuación de volumen concentración utilizada para determinar el volumen a manejar por cada cebador.

Se aforaron con 13.6 µl de agua para que llegara el volumen final esperado.

PRIMERA PURIFICACIÓN

Antes de realizar la reacción de secuenciación, purificamos el producto amplificado resultante de la PCR semi-anidada; para esto utilizamos el Kit ExoSAP-IT Express PCR PProduct Cleanup.

Siguiendo las instrucciones del fabricante tomamos 5 µl del producto amplificado y 2 µl del reactivo ExoSAP-IT, lo mezclamos gentilmente mediante vortex por algunos segundos, que dio como resultado una reacción con un volumen final de 7 µl, que llevamos al termociclador en el siguiente protocolo de temperaturas (*Tabla 15*).

Cuando finalizamos el ciclo, guardamos las muestras a -20°C.

Protocolo del termociclador / ExoSAP-IT		
Temperatura	Tiempo	Función
37°C	4 minutos	Degradar exceso de cebadores y de nucleótidos
80°C	1 minuto	Inactiva al ExoSAP-ITv

Tabla 15. Protocolo del termociclador para la purificación de los productos amplificadas.

REACCIÓN DE PURIFICACIÓN

Con el producto purificado, realizamos la reacción de secuenciación, para ello utilizamos el Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (*Tabla 16*), en este kit uno de los reactivos contiene fluorescencia, por lo que trabajamos con la luz apagada.

Para esta reacción utilizamos platos de secuenciación, y por producto amplificado se emplearon dos pocillos, ya que en uno agregamos el primer Forward y en el otro el primer Reverse. Con este protocolo, utilizamos PGEM que es un reactivo del kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit que actuó como el control positivo de la secuenciación (*Tabla 17*).

Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit	
Reactivos	Volumenes
Agua	3.5 µl
Buffer 5x	3.5 µl
Primer (Forward o Reverse)	1 µl
Producto purificado	1 µl
BigDye	1 µl

Tabla 16. Protocolo de reactivos y volúmenes del kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1

Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit – Control Positivo	
Reactivos	Volúmenes
Agua	3.5 µl
Buffer 5x	3.5 µl
PGEM	1 µl
M13	1 µl
BigDye	1 µl

Tabla 17. Protocolo de reactivos y volúmenes para el control positivo de la reacción de secuenciación. En este caso el PGEM y el M13 toman la función como cebador y producto amplificado.

Terminada la reacción, procedimos a colocar los platos en el termociclador, y utilizamos las temperaturas ya específicas de cada fragmento.

SEGUNDA PURIFICACIÓN

Posteriormente, se purificó por segunda vez toda la reacción de secuenciación. Para esto utilizamos el Kit BigDye XTerminator Purification kit, con un volumen final de reacción de 10 µl (*Tabla 18*). Luego los platos se mezclaron con vortex durante 30 minutos, y después se centrifugaron a 1000 xg durante 2 min.

Kit BigDye XTerminator Purification kit	
Reactivos	Volúmenes
SAM Solution	45 µl
BigDye XTerminator	10 µl

Tabla 18. Protocolo de reactivos y volúmenes del kit BigDye XTerminator Purification.

Al terminar, analizamos los platos con el equipo 3130xl Genetic Analyzer.



Figura 10. Kits utilizados para realizar la secuenciación de los productos amplificados.

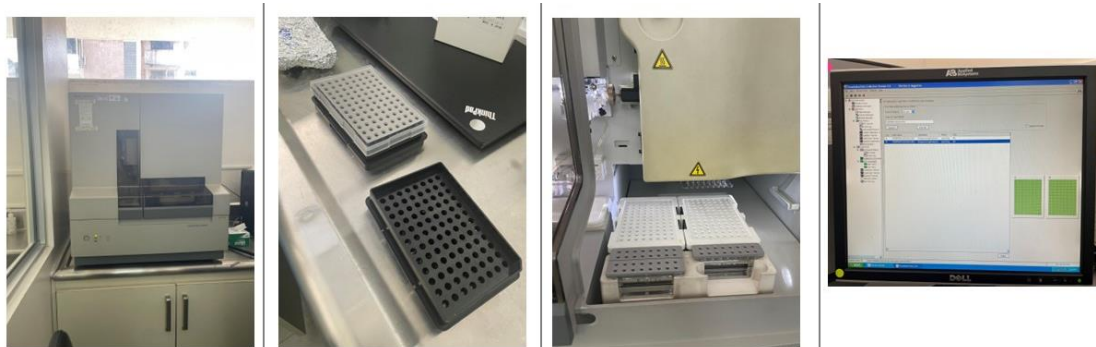


Figura 11. Preparación del equipo 3130xl Genetic Analyzer para el análisis de las placas.

ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN

- a. La lectura de la secuencia la realizamos a través del software *Sequencing Analysis 5.3.1*.

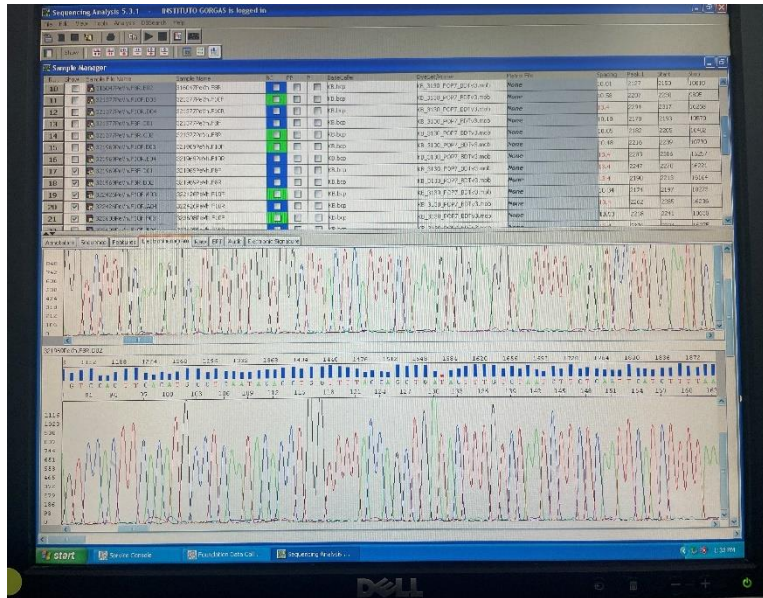


Figura 12. Imagen del software Sequencing Analysis 5.3.1.

- b. Editamos las secuencias obtenidas con el software *Sequencher 4.1.4*.

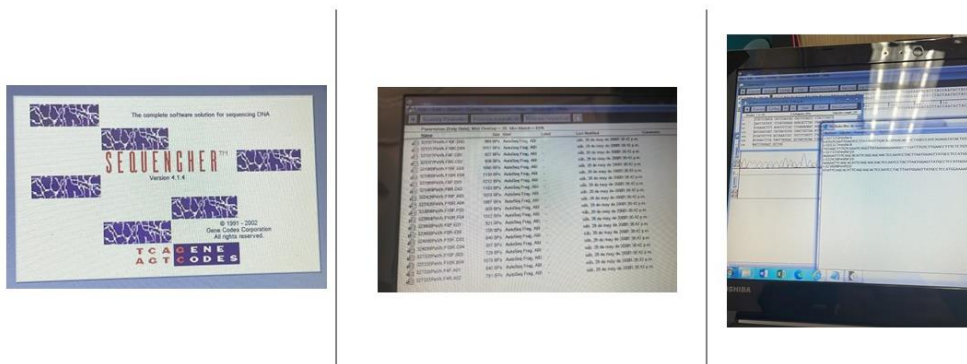


Figura 13. Proceso del análisis y edición de las secuencias consenso obtenidas.

- c. Con el software *BioEdit*, alineamos nuestras secuencias con secuencias de referencia.

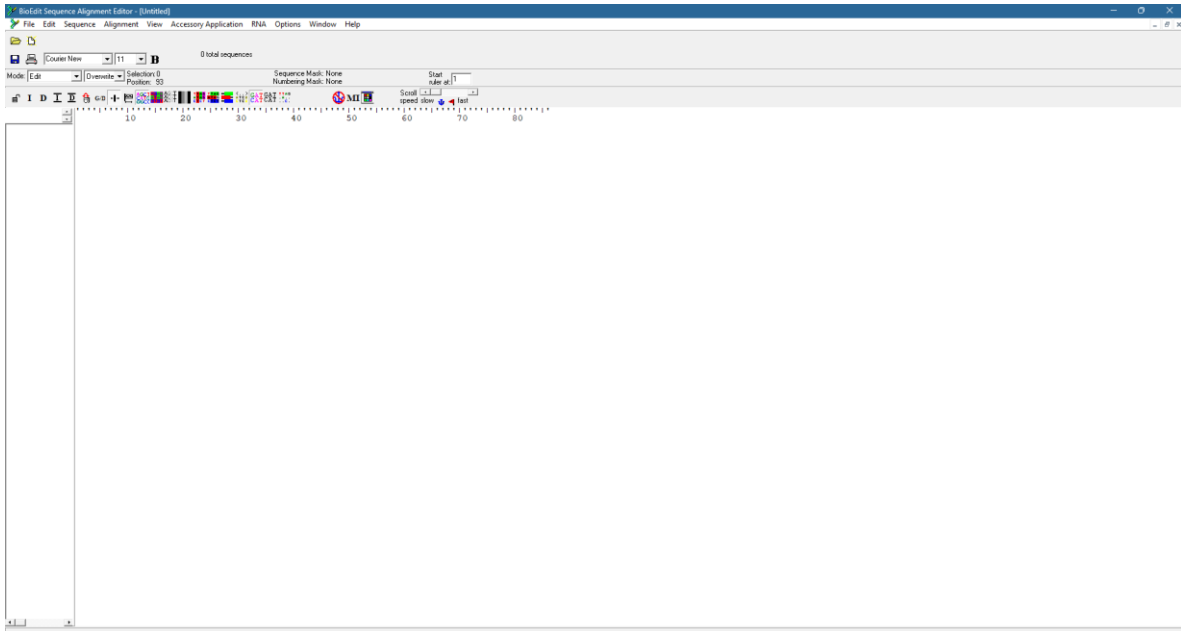


Figura 14. Proceso del análisis y alineamiento de las secuencias obtenidas.

- d. Empleamos el software *Mega7* para construir tres árboles filogenéticos que permitieran una mejor interpretación de los datos de secuencia alineados.

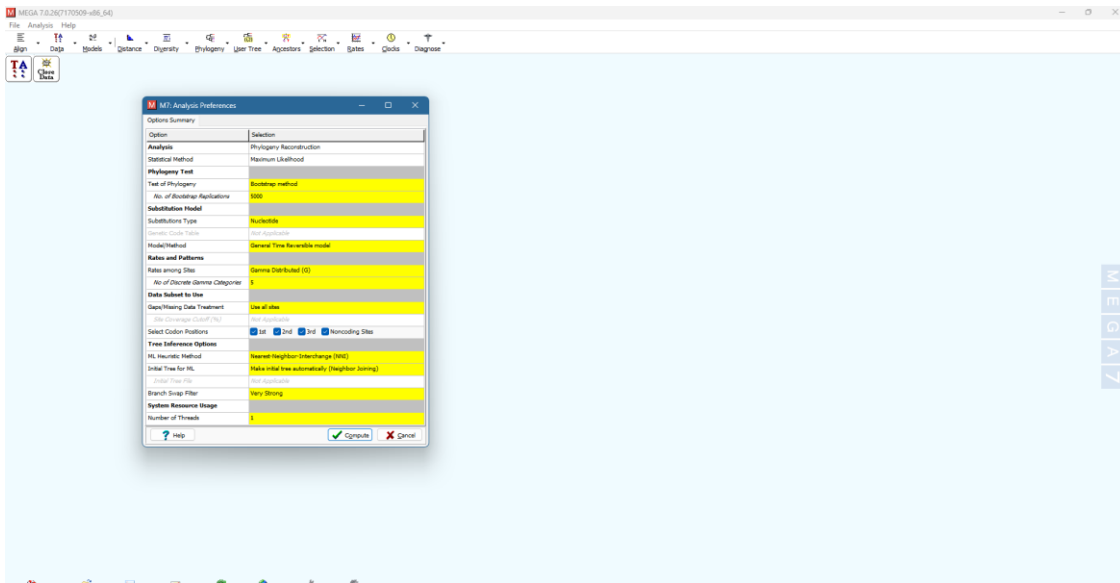


Figura 15. Software *Mega7* con las especificaciones requeridas para realizar la construcción de los 3 árboles filogenéticos. Cada árbol se realizó con 5000 réplicas de bootstraps.

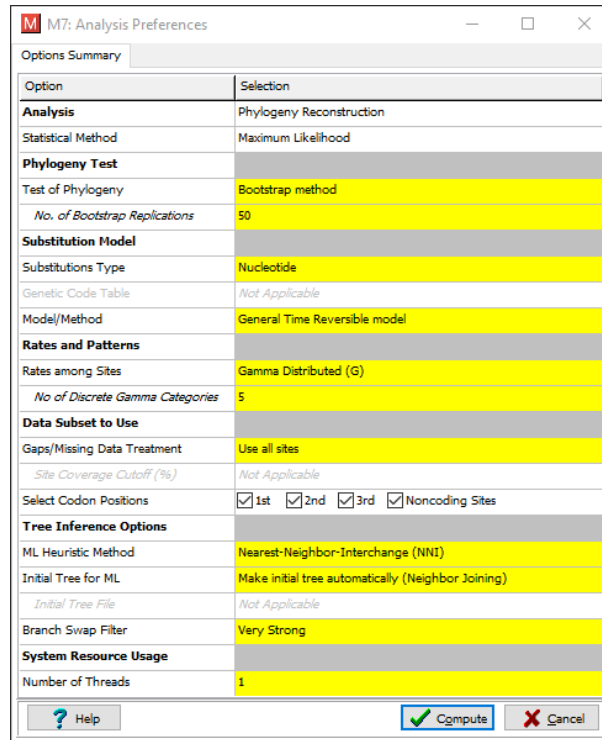


Figura 16. Opciones escogidas para el análisis de los árboles filogenéticos.

- e. Utilizamos secuencias de referencia del trabajo “Recombinant Strains of Human *Parechovirus* in Rural Áreas in the North of Brazil” de *Leal et al., 2019* (Figura 29)

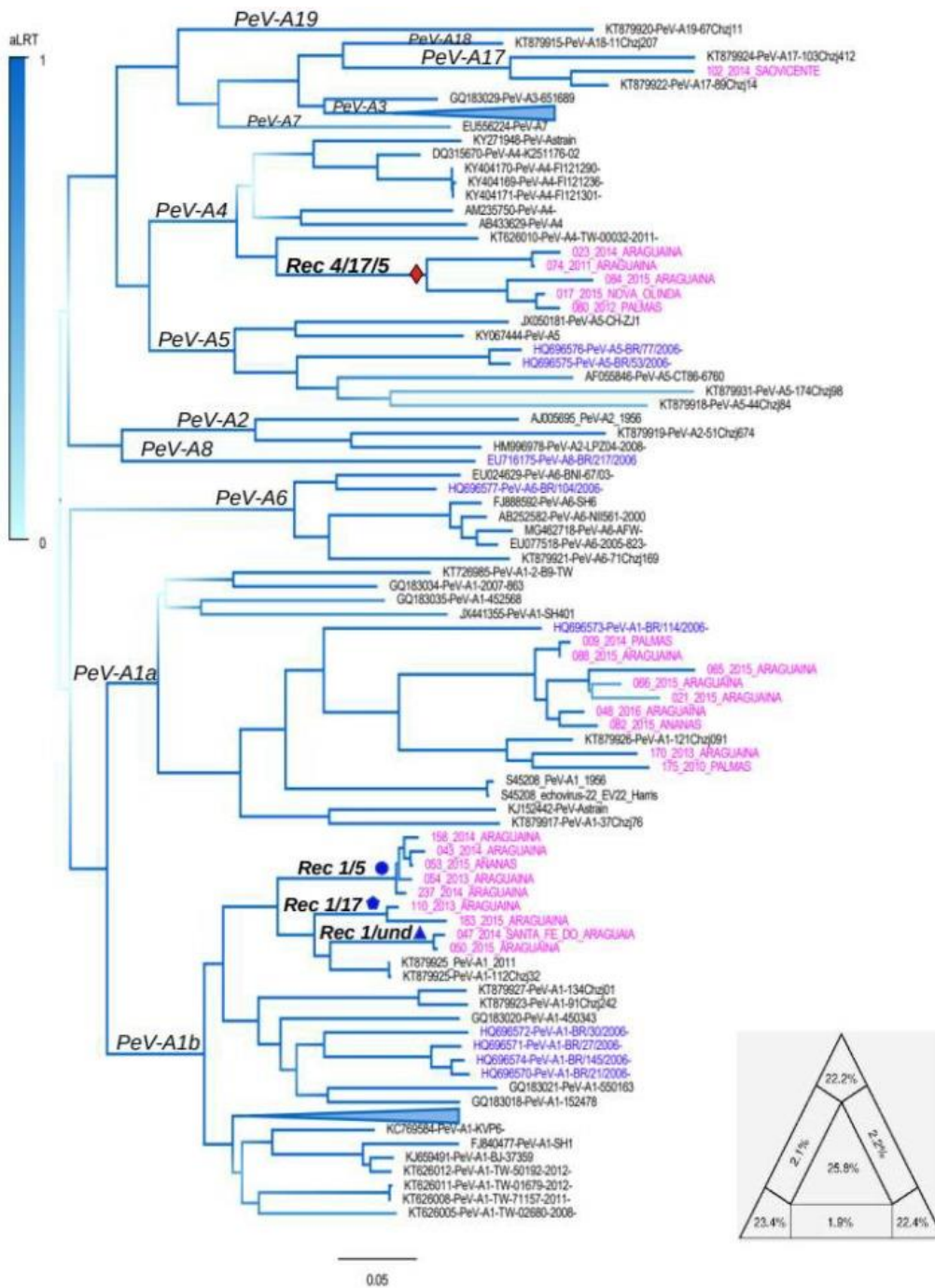


Figura 17. Árbol filogenético realizado por Leal et al., 2019; del cual utilizamos algunas secuencias como referencias, para la construcción de nuestros árboles filogenéticos.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

DETECCIÓN DE PeV-A MEDIANTE RT-PCR:

Mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real, se obtuvieron 16 muestras positivas de las 1183 muestras analizadas (*Tabla 19*) (*Figura 17*). Estas muestras pertenecen a los años 2011 a 2019, de los cuales en los años 2012 y 2013 no obtuvimos resultados positivos.

Dentro de las muestras que resultaron positivas, el 75% pertenece al género masculino; 87% corresponden a pacientes menores de 1 año. Pudimos predecir la presencia del virus en casi todo el país, y en la mayoría de los meses del año. La mayoría de los casos presentaron sintomatología de carácter respiratorio.

MUESTRAS POSITIVAS	
N° de muestras analizadas: 1183	
N° de muestras positivas: 16	
Años del estudio	N° de muestras
2011	1
2012	0
2013	0
2014	1
2015	4
2016	2
2017	3
2018	3
2019	2

Tabla 19. Tabla de los ID de las muestras positivas a la sonda FAM-HPeV-MGB en la técnica de análisis RT-PCR.

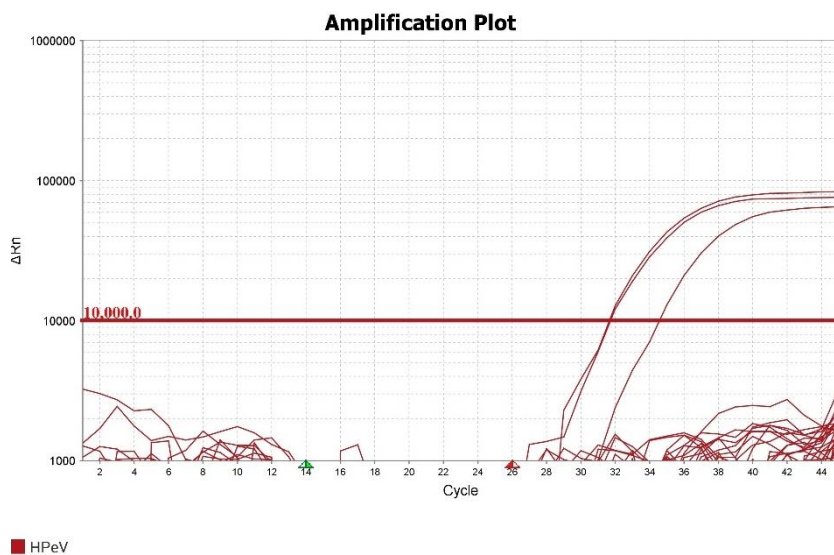


Figura 18. Gráfica correspondiente a la placa de análisis #9, detección de las muestras PeVh-PAM-09-2017 y PeVh-PAM-10-2017 mediante la técnica RT-PCR. A parte en esta gráfica se puede observar una tercera curva de amplificación correspondiente a un control positivo que se colocó para garantizar el adecuado análisis de las muestras.

A continuación, describimos la *Tabla 20*, donde podemos observar los datos del género, la condición clínica, región de procedencia, edad, año correspondiente a la colecta y síntomas, conforme a cada uno de los pacientes que resultaron positivos a PeV-A. De cada variable realizamos gráficas para describir los resultados positivos por datos epidemiológicos. (*Figura 19 a 26*).

ID MUESTRA	GENERO	CONDICIÓN CLÍNICA	REGIÓN	EDAD	AÑO	MES	SINTOMAS	EXAMENES
PeVh-PAM01-2011	F	Hospitalizado	San Miguelito	9 años	2011	Ago	No indicado	(+) Adenovirus
PeVh-PAM02-2014	M	Hospitalizado	Panamá Este	1 mes (RN)	2014	Dic	Dificultad respiratoria	(-) virus respiratorios
PeVh-PAM03-2015	F	Hospitalizado (UCI)	Panamá Oeste	44 años	2015	Ene	Tos, dolor de garganta, Rinorrea, Dificultad respiratoria	(-) virus respiratorios
PeVh-PAM04-2015	F	Hospitalizado	San Miguelito	9 meses	2015	Jun	Fiebre, tos, disnea	(-) virus respiratorios
PeVh-PAM05-2015	M	Hospitalizado	Panamá Metro	6 meses	2015	Mar	Tos	(+) Rinovirus
PeVh-PAM06-2015	M	Hospitalizado	Coclé	8 meses	2015	Oct	Tos, rinorrea, dificultad respiratoria	(-) virus respiratorios
PeVh-PAM07-2016	F	Hospitalizado	Herrera	4 meses	2016	Oct	Fiebre, tos, rinorrea	(-) virus respiratorios
PeVh-PAM08-2016	M	Hospitalizado	Panamá Este	1 año	2016	Dic	Fiebre, tos, dificultad respiratoria, hiporexia	(-) virus respiratorios
PeVh-PAM09-2017	M	Hospitalizado	Veraguas	7 meses	2017	Nov	Tos, rinorrea, dificultad respiratoria	(-) virus respiratorios
PeVh-PAM10-2017	M	Hospitalizado	Panamá Oeste	2 meses	2017	Feb	Fiebre, rinorrea, dificultad respiratoria	(+) Rinovirus
PeVh-PAM11-2017	M	Hospitalizado	Los Santos	1 año	2017	Jun	Fiebre, tos, rinorrea	(-) virus respiratorios

PeVh-PAM12-2018	M	Hospitalizado	Panamá Metro	10 meses	2018	Feb	Tos, rinorrea, dificultad respiratoria	(-) virus respiratorios
PeVh-PAM13-2018	M	Hospitalizado	Veraguas	10 meses	2018	Dic	Tos, rinorrea, dificultad respiratoria	(-) virus respiratorios
PeVh-PAM14-2019	M	Hospitalizado	Chiriquí	1 año	2019	May	Fiebre, tos	(-) virus respiratorios
PeVh-PAM15-2019	M	Hospitalizado	Colón	1 año	2019	Jul	No indicado	(-) virus respiratorios
PeVh-PAM16-2019	M	Hospitalizado	Veraguas	1 año	2018	May	Fiebre, tos, rinorrea, dificultad respiratoria	(+) Rinovirus

Tabla 20. Información de las muestras positivas.

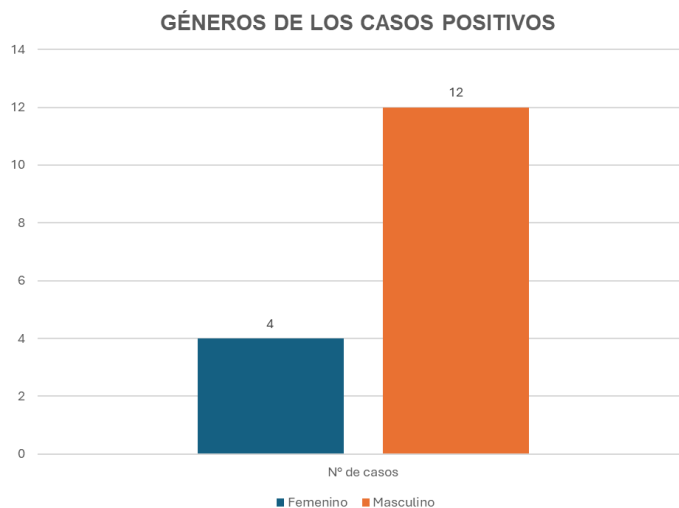


Figura 19. Gráfica representativa de los géneros de los casos positivos.

De un total de 16 casos positivos, el 75% (12 casos) corresponde al género masculino, mientras que el 25% (4 casos) corresponde al género femenino.

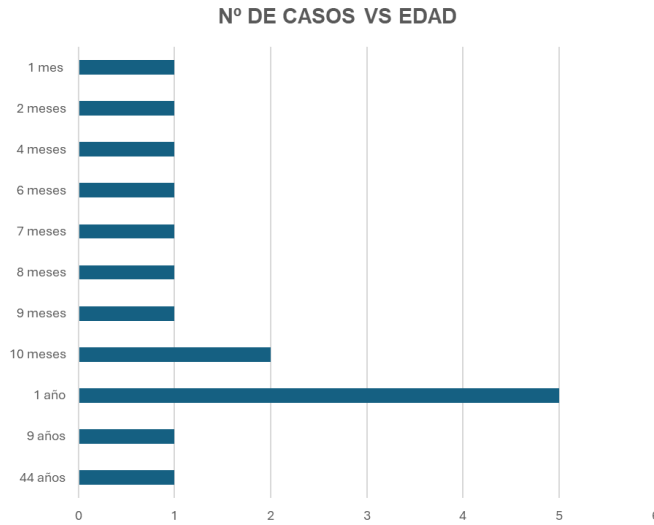


Figura 20. Gráfica representativa de la edad en cada uno de los casos positivos.

El 87.5% de los casos positivos corresponden a una edad de m-1 año, siendo 5 el mayor número de casos positivos, correspondientes a bebés de 1 año. Se presentó un caso positivo donde el paciente contaba con 9 años (6.25%); y una excepción donde el paciente tenía 44 años (6.25%).

CONDICIÓN CLÍNICA DE LOS CASOS POSITIVOS

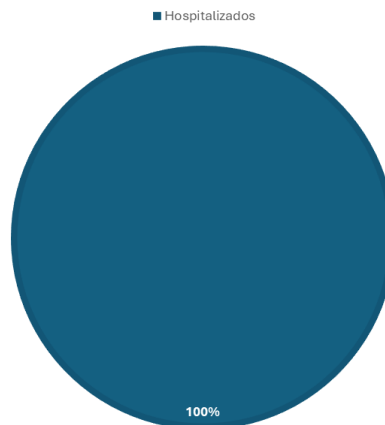


Figura 21. Gráfica representativa de la condición clínica de los casos positivos.

La condición clínica de los casos positivos fue de un 100%, en donde todos requirieron de una hospitalización.

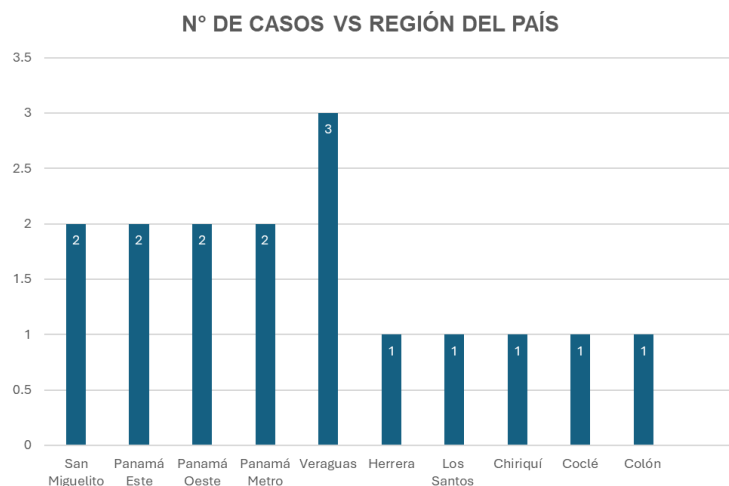


Figura 22. Gráfica representativa de las regiones y provincias de la Rep. de Panamá donde se obtuvieron casos positivos.

De un total de 16 casos positivos, 3 de los casos positivos se produjeron en la provincia de Veraguas, 2 de los casos se encuentran distribuidos entre Panamá Oeste y la ciudad de Panamá (San Miguelito, Panamá Metro, Panamá Este). Y un (1) caso correspondientemente, se encuentra distribuidos en las provincias de Herrera, Los Santos, Chiriquí, Coclé y Colón. Por lo que podemos predecir la presencia del virus a lo largo de la República de Panamá.

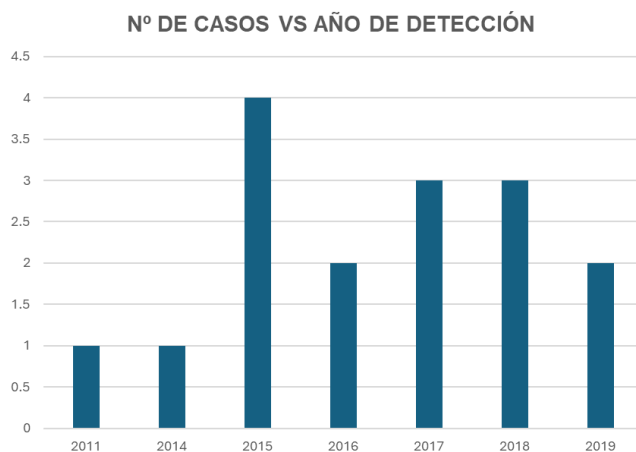


Figura 23. Gráfica representativa de los años del estudio (2011 al 2019), donde obtuvimos muestras positivas.

El año con mayor número de casos fue el 2015 con 4 casos, seguido de los años 2017 y 2018 con 3 casos; los años 2016 y 2019 con 2 casos; y los años 2011 y 2014 con 1 caso correspondientemente.

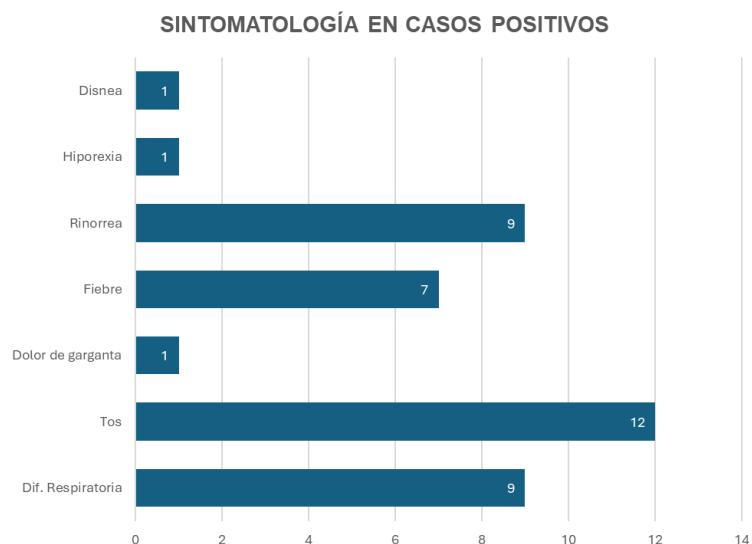


Figura 24. Gráfica representativa de los síntomas presentados por los casos positivos.

El síntoma más recurrente en todos los casos es la tos con un 75%, seguido de la dificultad respiratoria y la rinorrea con un 56.25%, un 43.75% correspondiente a la fiebre, y 6.25% que corresponden a la disnea, hiporexia y dolor de garganta.

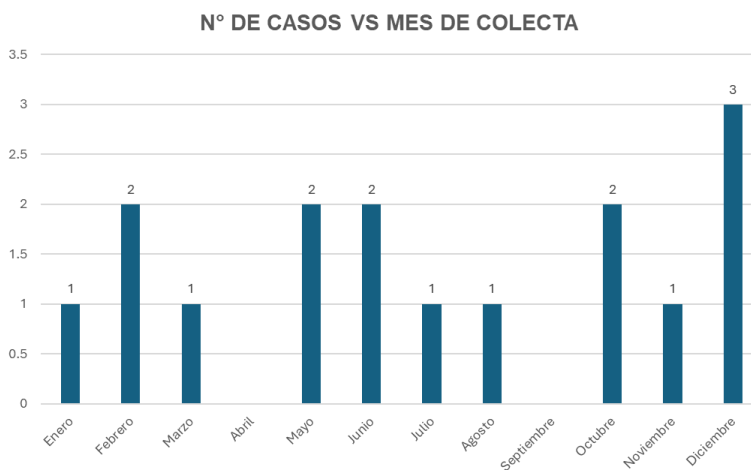


Figura 25. Gráfica representativa de los meses donde obtuvimos muestras positivas.

De un total de 16 casos positivos, 3 de los casos positivos se produjeron en el mes de diciembre, 2 se produjeron en los meses de febrero, mayo, junio y octubre. Y se produjo un (1) caso, en los meses de enero, marzo, julio, agosto y noviembre. No obtuvimos casos positivos en los meses de abril y septiembre. Por lo que podemos predecir la presencia del virus a lo largo del año.

**CASOS POSITIVOS CON COINFECCIONES
VIRALES**

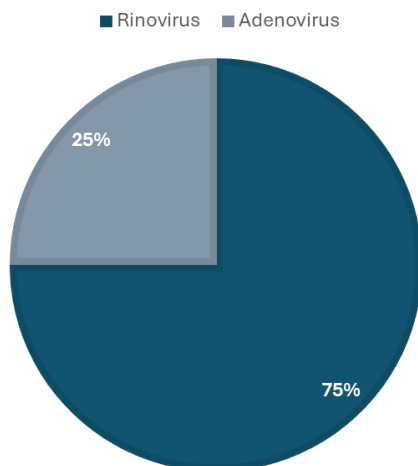


Figura 26. Gráfica representativa de coinfecciones de otros virus respiratorios en los casos positivos a PeV-A.

En los estudios de laboratorios realizados previamente a los casos por el Departamento de Investigación en Virología del ICGES, encontramos con 3 casos que presentaban una coinfección viral, donde 2 casos dieron positivo a Rinovirus (75%) y obtuvimos 1 caso positivo con Adenovirus (25%).

AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA DE PeV-A

De las 16 muestras positivas, logramos obtener 14 amplicones, de los cuales 3 corresponden al fragmento 1, 1 pertenece al fragmento 4 (Figura 27), 4 corresponden al fragmento 8 y 6 pertenecen al fragmento 10. (Figura 28).

ID de las muestras positivas
PeVh-PAM01-2011
PeVh-PAM02-2014
PeVh-PAM03-2015
PeVh-PAM07-2016
PeVh-PAM09-2017
PeVh-PAM10-2017
PeVh-PAM11-2017
PeVh-PAM12-2018
PeVh-PAM15-2019
PeVh-PAM16-2018

Tabla 21. Muestras positivas a las que se le realizaron los análisis.

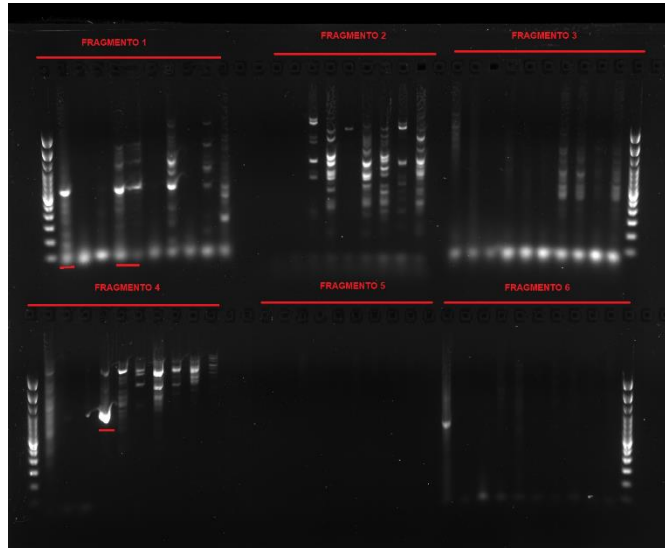


Figura 27. Electroforesis en gel #1, correspondiente a los fragmentos del 1 al 6. Podemos observar 4 amplificaciones exitosas.

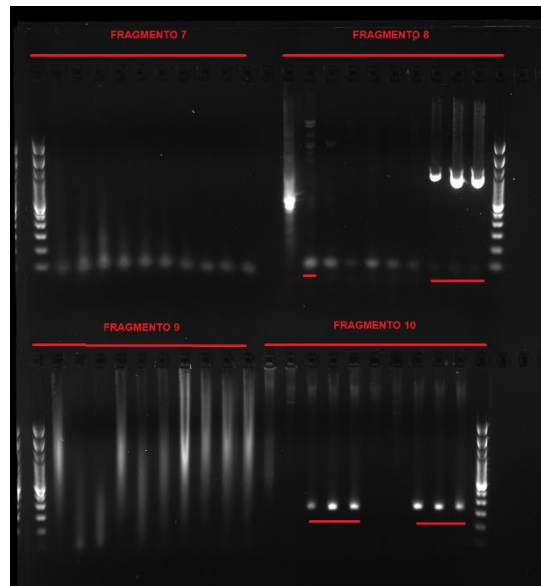


Figura 28. Electroforesis en gel #2, correspondiente a los fragmentos 7 al 10. Podemos observar 10 amplificaciones exitosas.

SECUENCIACIÓN

De las 14 amplificaciones obtenidas durante la electroforesis, obtuvimos 11 secuencias (*Tabla 22*) que corresponden a los fragmentos F4, F8 y F10.

ID MUESTRA	FRAGS. AMPLIFICADOS
PeVh-PAM15-2019	F4, F10
PeVh-PAM11-2017	F10
PeVh-PAM02-2014	F8
PeVh-PAM07-2016	F8, F10
PeVh-PAM10-2017	F8, F10
PeVh-PAM09-2017	F8, F10
PeVh-PAM12-2018	F10

Tabla 22. Tabla de las 11 secuencias obtenidas durante el análisis en el equipo 3130xl Genetic Analyzer.

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

- Finalizado el análisis de las secuencias en el equipo 3130xl Genetic Analyzer, realizamos la lectura de la secuencia a través del software Sequencing Analysis 5.3.1. De este análisis obtuvimos 22 secuencias (una forward y una reverse correspondientes a cada una de las muestras amplificadas). (*Figura 29*)

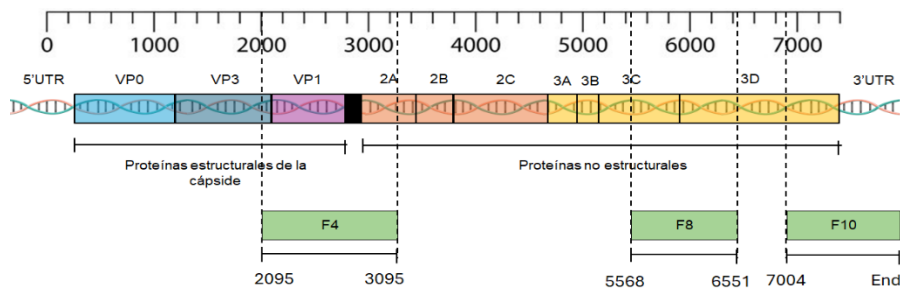


Figura 29. Organización del genoma completo de PeV-A y la ubicación de los 3 fragmentos que obtuvieron muestras amplificadas en la electroforesis.

- De las 22 secuencias obtenidas, logramos obtener y editar 8 secuencias consenso con el *software* Portable Sequencher 4.1.4.

ID MUESTRA	FRAGS. AMPLIFICADOS
PeVh-PAM15-2019	F4
PeVh-PAM15-2019	F10
PeVh-PAM11-2017	F10
PeVh-PAM07-2016	F8
PeVh-PAM07-2016	F10
PeVh-PAM10-2017	F10
PeVh-PAM09-2017	F10
PeVh-PAM12-2018	F10

Tabla 23. Tabla de las 8 secuencias consenso obtenidas en el *software* Portable Sequencher 4.1.4.

- Luego con el *software* BioEdit, alineamos nuestras secuencias con secuencias de referencia. Para las secuencias de referencia realizamos una investigación en otros trabajos sobre PeV-A donde todos o la mayoría de los serotipos fueran descritos.
Realizamos una revisión de las secuencias con mayor porcentaje de compatibilidad con nuestras secuencias obtenidas mediante la opción de “Blast” del NCBI (*Figura 31 a 40*).

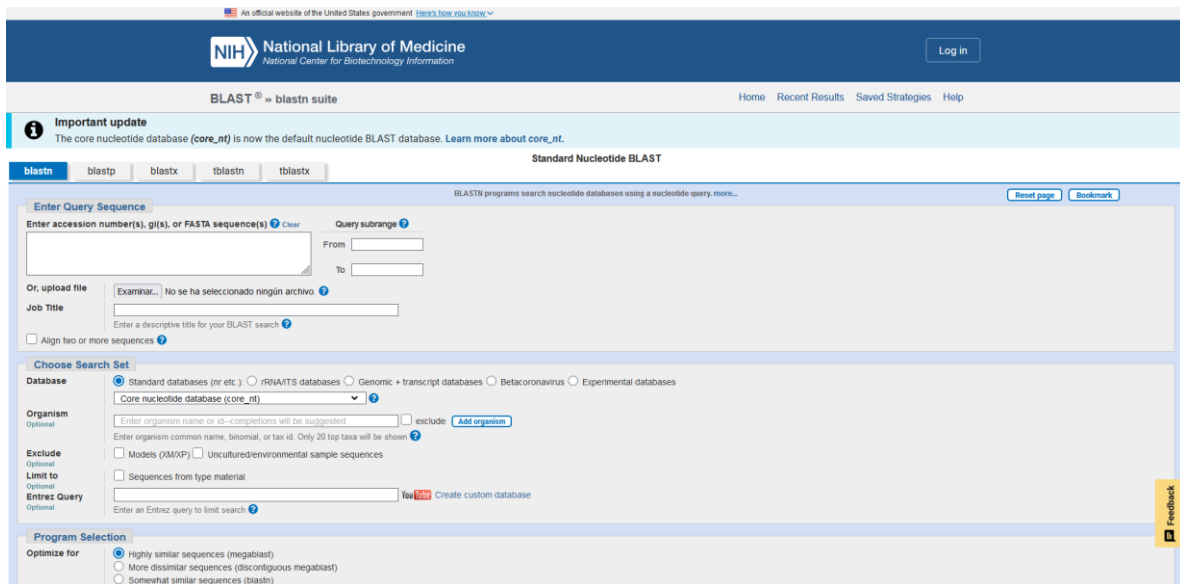


Figura 30. Herramienta BLAST del National Library of Medicine (NCBI).

Job Title >PeVh-PAM-07-2016-F10

RID [EYPTBVPK016](#) Search expires on 09-23 07:47 am [Download All](#) ▼

Program BLASTN [Citation](#) ▼

Database core_nt [See details](#) ▼

Query ID lcl|Query_2221023

Description None

Molecule type dna

Query Length 257

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) ?

Filter Results

Organism *only top 20 will appear* exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to

E value to

Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▼ Select columns ▼ Show 100 ▼ ?

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 4 isolate K251176-02 complete genome	Human parechovirus 4	442	442	100%	1e-119	97.67%	7366	DQ315670.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 isolate 2007-863 complete genome	parechovirus A1	436	436	100%	5e-118	97.28%	7302	GQ163034.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 isolate F10578 complete genome	parechovirus A1	436	436	100%	5e-118	97.28%	7321	ON497124.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 isolate 350757 complete genome	parechovirus A1	436	436	100%	5e-118	97.28%	7328	ON497143.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 4 isolate F1121301 polyprotein gene complete cds	Human parechovirus 4	431	431	100%	2e-116	96.89%	7309	KY404171.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 4 isolate F1121290 polyprotein gene complete cds	Human parechovirus 4	431	431	100%	2e-116	96.89%	7290	KY404170.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 5 isolate 20552322 complete genome	Human parechovirus 5	431	431	100%	2e-116	96.89%	7342	ON497141.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 genomic RNA complete genome strain A308/99	Human parechovirus 3	431	431	100%	2e-116	96.89%	7321	AR084913.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 isolate K8-94 complete genome	Human parechovirus 3	425	425	100%	1e-114	96.50%	7307	GQ183033.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 isolate K11-94 complete genome	Human parechovirus 3	425	425	100%	1e-114	96.50%	7307	GQ183030.1
<input checked="" type="checkbox"/> Synthetic parechovirus A3 DNA complete sequence clone: PeV-A3-EGFP	synthetic parechovirus A3	425	425	100%	1e-114	96.50%	8059	LC723624.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 isolate K20-94 complete genome	Human parechovirus 3	425	425	100%	1e-114	96.50%	7307	GQ183032.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 isolate K12-94 complete genome	Human parechovirus 3	425	425	100%	1e-114	96.50%	7306	GQ183031.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain BJ-C3174 complete genome	Human parechovirus 3	420	420	100%	5e-113	96.11%	7343	KJ659490.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 isolate 251360 complete genome	Human parechovirus 3	420	420	100%	5e-113	96.11%	7277	GQ183027.1

Figura 31. BLAST de la muestra PeVh-PAM-07-2016-F10, obtenido del NCBI.

Job Title >PeVh-PAM-07-2016-F8
 RID EZSUMWUF016 Search expires on 09-23 12:04 pm Download All
 Program BLASTN Citation
 Database core_nt See details
 Query ID lclQuery_3533437
 Description None
 Molecule type dna
 Query Length 788
 Other reports Distance tree of results MSA viewer

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
 + Add organism

Percent Identity to E value to Query Coverage to

Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 5 isolate 20552322_complete genome	Human parechovirus...	1018	1018	100%	0.0	89.97%	7342	ON497141.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 gene for polyprotein (VP0_VP3_VP1_2A_2B_2C_3A_3B_3C_3D)_partial cds_strain: 1786...	Human parechovirus...	1013	1013	100%	0.0	89.85%	6531	AB759198.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 4 isolate K251176_complete genome	Human parechovirus...	1013	1013	100%	0.0	89.85%	7193	ON497122.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 gene for polyprotein (VP0_VP3_VP1_2A_2B_2C_3A_3B_3C_3D)_partial cds_strain: 1588...	Human parechovirus...	1013	1013	100%	0.0	89.85%	6531	AB759194.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 isolate 152037 polyprotein gene_partial cds	Human parechovirus...	1013	1013	100%	0.0	89.85%	7224	ON497145.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 gene for polyprotein (VP0_VP3_VP1_2A_2B_2C_3A_3B_3C_3D)_partial cds_strain: 1585...	Human parechovirus...	1013	1013	100%	0.0	89.85%	6531	AB759207.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 gene for polyprotein (VP0_VP3_VP1_2A_2B_2C_3A_3B_3C_3D)_partial cds_strain: 1526...	Human parechovirus...	1013	1013	100%	0.0	89.85%	6531	AB759193.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 gene for polyprotein (VP0_VP3_VP1_2A_2B_2C_3A_3B_3C_3D)_partial cds_strain: 1950...	Human parechovirus...	1013	1013	100%	0.0	89.85%	6531	AB759199.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 gene for polyprotein (VP0_VP3_VP1_2A_2B_2C_3A_3B_3C_3D)_partial cds_strain: 1517...	Human parechovirus...	1013	1013	100%	0.0	89.85%	6531	AB759192.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 gene for polyprotein (VP0_VP3_VP1_2A_2B_2C_3A_3B_3C_3D)_partial cds_strain: 1632...	Human parechovirus...	1013	1013	100%	0.0	89.85%	6531	AB759195.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 gene for polyprotein (VP0_VP3_VP1_2A_2B_2C_3A_3B_3C_3D)_partial cds_strain: 1646...	Human parechovirus...	1013	1013	100%	0.0	89.85%	6531	AB759197.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 4 isolate K251176-02_complete genome	Human parechovirus...	1007	1007	100%	0.0	89.72%	7366	DQ315670.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A strain HPeV-5/RUS/Novosibirsk/NS12-N3863/2012_complete genome	Parechovirus A	928	928	99%	0.0	87.94%	7370	MG373159.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 strain KVP6 polyprotein gene_complete cds	parechovirus A1	896	896	100%	0.0	87.18%	7329	KC769584.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A1 isolate TW-50192-2012 polyprotein gene_complete cds	parechovirus A1	870	870	99%	0.0	86.64%	7013	KT626012.1

Figura 32. BLAST de la muestra PeVh-PAM-07-2016-F8, obtenido en el NCBI.

Job Title >PeVh-PAM-10-2017-F10
 RID EZ5YVFA8016 Search expires on 09-23 12:06 pm Download All
 Program BLASTN Citation
 Database core_nt See details
 Query ID lclQuery_3599899
 Description None
 Molecule type dna
 Query Length 255
 Other reports Distance tree of results MSA viewer

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
 + Add organism

Percent Identity to E value to Query Coverage to

Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 5 strain BR/77/2006 polyprotein gene_complete cds	Human parechovirus 5	411	411	98%	3e-110	96.05%	7348	HQ696576.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 strain BR/30/2006 polyprotein gene_complete cds	parechovirus A1	407	407	100%	4e-109	95.33%	6920	HQ696572.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 5 strain BR/53/2006 polyprotein gene_complete cds	Human parechovirus 5	396	396	100%	9e-106	94.55%	7348	HQ696575.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 6 strain BR/104/2006 polyprotein gene_complete cds	Human parechovirus 6	385	385	98%	2e-102	94.09%	6928	HQ696577.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 strain BR/27/2006 polyprotein gene_complete cds	parechovirus A1	368	368	98%	2e-97	92.94%	6924	HQ696571.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 strain BR/114/2006 polyprotein gene_complete cds	parechovirus A1	366	366	98%	7e-97	92.89%	6917	HQ696573.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 8 isolate BR/217/2006_complete genome	Human parechovirus 8	359	359	100%	1e-94	91.89%	7353	EU716175.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 6 isolate AFV6 polyprotein gene_complete cds	Human parechovirus 6	357	357	100%	4e-94	91.86%	7261	MG462718.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 isolate F10114_complete genome	parechovirus A1	351	351	100%	2e-92	91.47%	7301	ON497130.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 6 isolate 2005-823 polyprotein gene_complete cds	Human parechovirus 6	351	351	100%	2e-92	91.47%	7273	EU077518.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 5 strain CT86-6760_complete genome	Human parechovirus 5	351	351	98%	2e-92	91.76%	7352	AF055846.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 6 genomic RNA_complete genome_strain: N11561-2000	Human parechovirus 6	351	351	100%	2e-92	91.54%	7347	AB252582.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 isolate 550153_complete genome	parechovirus A1	351	351	98%	2e-92	91.76%	7305	GQ183021.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 6 isolate SH6_complete genome	Human parechovirus 6	351	351	100%	2e-92	91.47%	7311	FJ888592.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate R1214_complete genome	Parechovirus A	346	346	100%	9e-91	91.05%	7326	MW476134.1

Figura 33. BLAST de la muestra PeVh-PAM-10-2017-F10, obtenida en el NCBI.

Job Title >PeVh-PAM-11-2017-F10

RID [EZ69PTGU013](#) Search expires on 09-23 12:12 pm [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database core_nt [See details](#)

Query ID lclQuery_5031317

Description None

Molecule type dna

Query Length 258

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 4 isolate K251176-02 complete genome	Human parechovirus 4	435	435	100%	2e-117	96.92%	7366	DQ315670.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 isolate 2007-863 complete genome	parechovirus A1	429	429	100%	9e-116	96.54%	7302	GQ183034.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 isolate F10578 complete genome	parechovirus A1	429	429	100%	9e-116	96.54%	7321	ON497124.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 isolate 350757 complete genome	parechovirus A1	429	429	100%	9e-116	96.54%	7328	ON497143.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 4 isolate F121301 polyprotein gene complete cds	Human parechovirus 4	424	424	100%	4e-114	96.15%	7309	KY404171.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 4 isolate F121290 polyprotein gene complete cds	Human parechovirus 4	424	424	100%	4e-114	96.15%	7290	KY404170.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 5 isolate 20552322 complete genome	Human parechovirus 5	424	424	100%	4e-114	96.15%	7342	ON497141.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 genomic RNA complete genome strain A308/99	Human parechovirus 3	424	424	100%	4e-114	96.15%	7321	AB084913.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 isolate K8-94 complete genome	Human parechovirus 3	418	418	100%	2e-112	95.77%	7307	GQ183033.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 isolate K11-94 complete genome	Human parechovirus 3	418	418	100%	2e-112	95.77%	7307	GQ183030.1
<input checked="" type="checkbox"/> Synthetic parechovirus A3 DNA complete sequence clone PeVA3-EGFP	synthetic parechovirus A3	418	418	100%	2e-112	95.77%	8059	LC723624.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 isolate K20-94 complete genome	Human parechovirus 3	418	418	100%	2e-112	95.77%	7307	GQ183032.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 isolate K12-94 complete genome	Human parechovirus 3	418	418	100%	2e-112	95.77%	7306	GQ183031.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain BJ-C3174 complete genome	Human parechovirus 3	412	412	100%	9e-111	95.38%	7343	KJ659490.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 isolate 251360 complete genome	Human parechovirus 3	412	412	100%	9e-111	95.38%	7277	GQ183027.1

Figura 34. BLAST de la muestra PeVh-PAM-11-2017-F10, obtenida en el NCBI.

Job Title >PeVh-PAM-09-2017-F10

RID [EZ6GFE75013](#) Search expires on 09-23 12:16 pm [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database core_nt [See details](#)

Query ID lclQuery_3911431

Description None

Molecule type dna

Query Length 256

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 5 strain BR/77/2006 polyprotein gene complete cds	Human parechovirus 5	425	425	99%	1e-114	96.85%	7348	HQ696576.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 strain BR/30/2006 polyprotein gene complete cds	parechovirus A1	420	420	99%	5e-113	96.46%	6920	HQ696572.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 6 strain BR/104/2006 polyprotein gene complete cds	Human parechovirus 6	412	412	100%	8e-111	95.72%	6928	HQ696577.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 5 strain BR/53/2006 polyprotein gene complete cds	Human parechovirus 5	409	409	99%	1e-109	95.67%	7348	HQ696575.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 8 isolate BR/217/2006 complete genome	Human parechovirus 8	387	387	100%	5e-103	93.80%	7353	EU716175.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 6 isolate AFV polyprotein gene complete cds	Human parechovirus 6	385	385	100%	2e-102	93.77%	7261	MG462718.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 strain BR/114/2006 polyprotein gene complete cds	parechovirus A1	383	383	100%	7e-102	93.75%	6917	HQ696573.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 isolate F10114 complete genome	parechovirus A1	379	379	100%	9e-101	93.39%	7301	ON497130.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 6 isolate 2005-823 polyprotein gene complete cds	Human parechovirus 6	379	379	100%	9e-101	93.39%	7273	EU077518.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 strain BR/27/2006 polyprotein gene complete cds	parechovirus A1	375	375	100%	1e-99	93.02%	6924	HQ696571.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 strain BJ-37359 complete genome	parechovirus A1	374	374	100%	4e-99	93.00%	7350	KJ659491.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 isolate SH1 complete genome	parechovirus A1	374	374	100%	4e-99	93.00%	7314	FJ840477.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 5 strain CTR6-6760 complete genome	Human parechovirus 5	370	370	100%	5e-98	92.64%	7352	AF055846.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 isolate 550163 complete genome	parechovirus A1	370	370	100%	5e-98	92.64%	7305	GQ183021.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 isolate 150-8 complete genome	parechovirus A1	368	368	100%	2e-97	92.61%	7296	ON497136.1

Figura 35. BLAST de la muestra PeVh-PAM-09-2017-F10, obtenida en el NCBI.

Job Title >PeVh-PAM-12-2018-F10
 RID [EZ6U9B6N016](#) Search expires on 09-23 12:21 pm [Download All](#) ▾
 Program BLASTN [Citation](#) ▾
 Database core_nt [See details](#) ▾
 Query ID IcllQuery_4107939
 Description None
 Molecule type dna
 Query Length 264
 Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) ?

Filter Results

Organism *only top 20 will appear* exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
 + [Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show 100 ▾ ?

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A1 isolate 37Chzj76 .complete genome	parechovirus A1	396	396	99%	9e-106	93.89%	7063	KT879917.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A1 isolate 134Chzj01 .complete genome	parechovirus A1	385	385	87%	2e-102	96.55%	7219	KT879927.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 5 gene for polyprotein .genomic RNA .strain T92-15	Human parechovirus 5	379	379	99%	9e-101	92.78%	7320	AM235749.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate B1187 .complete genome	Parechovirus A	368	368	98%	2e-97	92.31%	7322	MW476117.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus strain MX polyprotein gene .complete cds	Parechovirus A	366	366	98%	7e-97	91.95%	7217	KJ152442.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate FEC10 .complete genome	Human parechovirus 3	363	363	99%	9e-96	91.60%	7334	KY556666.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate FEC21 .complete genome	Human parechovirus 3	363	363	99%	9e-96	91.60%	7334	KY556673.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate CSF04 .complete genome	Human parechovirus 3	363	363	99%	9e-96	91.60%	7334	KY556662.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate FEC22 .complete genome	Human parechovirus 3	363	363	99%	9e-96	91.60%	7334	KY556674.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate CSF05 .complete genome	Human parechovirus 3	363	363	99%	9e-96	91.60%	7334	KY556663.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate CSF19 .complete genome	Human parechovirus 3	363	363	99%	9e-96	91.60%	7334	KY556671.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate CSF01 .complete genome	Human parechovirus 3	363	363	99%	9e-96	91.60%	7334	KY556659.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate CSF06 .complete genome	Human parechovirus 3	363	363	99%	9e-96	91.60%	7334	KY556661.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate CSF08 .complete genome	Human parechovirus 3	363	363	99%	9e-96	91.60%	7334	KY556665.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate FEC20 .complete genome	Human parechovirus 3	363	363	99%	9e-96	91.60%	7334	KY556672.1

Figura 36. BLAST de la muestra PeVh-PAM-12-2018-F10, obtenida en el NCBI.

Job Title >PeVh-PAM-15-2019-F10
 RID [EZ6XWAPD013](#) Search expires on 09-23 12:23 pm [Download All](#) ▾
 Program BLASTN [Citation](#) ▾
 Database core_nt [See details](#) ▾
 Query ID IcllQuery_4177031
 Description None
 Molecule type dna
 Query Length 260
 Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) ?

Filter Results

Organism *only top 20 will appear* exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
 + [Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show 100 ▾ ?

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A1 isolate 134Chzj01 .complete genome	parechovirus A1	388	388	89%	1e-103	96.60%	7219	KT879927.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 5 gene for polyprotein .genomic RNA .strain T92-15	Human parechovirus 5	374	374	99%	4e-99	92.72%	7320	AM235749.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 isolate 550163 .complete genome	parechovirus A1	370	370	97%	5e-98	92.94%	7305	GQ183021.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A1 isolate 37Chzj76 .complete genome	parechovirus A1	368	368	97%	2e-97	92.91%	7063	KT879917.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate B1187 .complete genome	Parechovirus A	368	368	97%	2e-97	92.91%	7322	MW476117.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate HPeV-1(CMR)HP46(CMR)/2014 polyprotein gene .complete cds	Parechovirus A	353	353	97%	5e-93	91.76%	7202	MH933780.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate FEC10 .complete genome	Human parechovirus 3	351	351	97%	2e-92	91.73%	7334	KY556666.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate FEC21 .complete genome	Human parechovirus 3	351	351	97%	2e-92	91.73%	7334	KY556673.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate CSF04 .complete genome	Human parechovirus 3	351	351	97%	2e-92	91.73%	7334	KY556662.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate FEC22 .complete genome	Human parechovirus 3	351	351	97%	2e-92	91.73%	7334	KY556674.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate CSF05 .complete genome	Human parechovirus 3	351	351	97%	2e-92	91.73%	7334	KY556663.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate CSF19 .complete genome	Human parechovirus 3	351	351	97%	2e-92	91.73%	7334	KY556671.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate CSF01 .complete genome	Human parechovirus 3	351	351	97%	2e-92	91.73%	7334	KY556659.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate CSF06 .complete genome	Human parechovirus 3	351	351	97%	2e-92	91.73%	7334	KY556661.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 3 strain Australia 2013-GL2015 isolate CSF08 .complete genome	Human parechovirus 3	351	351	97%	2e-92	91.73%	7334	KY556665.1

Figura 37. BLAST de la muestra PeVh-PAM-15-2019-F10, obtenida en el NCBI.

Job Title >PeVh-PAM-15-2019-F4
 RID E7Z2MNSY016 Search expires on 09-23 12:25 pm Download All
 Program BLASTN Citation
 Database core_nt See details
 Query ID lclQuery_5468623
 Description None
 Molecule type dna
 Query Length 748
 Other reports Distance tree of results MSA viewer

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
 + Add organism

Percent Identity to to E value to to Query Coverage to to
 Filter Reset

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
select all 54 sequences selected		Download	Select columns	Show 100				
		GenBank	Graphics	Distance tree of results				
		MSA Viewer						
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate MSCRC_complete genome	Parechovirus A	688	688	96%	0.0	83.82%	7299	MK904585.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate HSE_complete genome	Parechovirus A	688	688	96%	0.0	83.82%	7300	MK904601.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate PPSA_complete genome	Parechovirus A	660	660	94%	0.0	83.64%	7306	MK904591.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate GhanaA61_polyprotein gene_partial cds	Parechovirus A	636	636	96%	1e-177	82.69%	837	KY931573.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate GhanaA16_polyprotein gene_partial cds	Parechovirus A	636	636	96%	1e-177	82.66%	822	KY931559.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus isolate PP6298/NIV/INDIA/2006_polyprotein gene_partial cds	Parechovirus A	630	630	96%	7e-176	82.48%	772	KJ743620.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate GhanaA99_polyprotein gene_partial cds	Parechovirus A	630	630	95%	7e-176	82.57%	807	KY931564.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus 1 VP3/VP1 gene for polyprotein_partial cds_strain HPeV-1/Yokohama_JPN/47.04_throat_swab	parechovirus A1	627	627	95%	9e-175	82.59%	816	LC133442.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate GhanaA78_polyprotein gene_partial cds	Parechovirus A	625	625	95%	3e-174	82.45%	834	KY931554.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate GhanaA92_polyprotein gene_partial cds	Parechovirus A	619	619	96%	2e-172	82.25%	822	KY931568.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate GhanaA65_polyprotein gene_partial cds	Parechovirus A	614	614	96%	7e-171	82.12%	837	KY931571.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate FX/2009/353_VP1 gene_partial cds	Parechovirus A	603	603	93%	2e-167	82.24%	702	MT700578.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate HUX/2011/5538_VP1 gene_partial cds	Parechovirus A	603	603	93%	2e-167	82.24%	702	MT700861.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human parechovirus isolate PP0620834/NIV/INDIA/2006_polyprotein gene_partial cds	Parechovirus A	599	599	96%	2e-166	81.71%	766	KJ743637.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parechovirus A isolate FX/2010/694_VP1 gene_partial cds	Parechovirus A	599	599	93%	2e-166	82.18%	702	MT700580.1

Figura 38. BLAST de la muestra PeVh-PAM-15-2019-F4, obtenida en el NCBI.

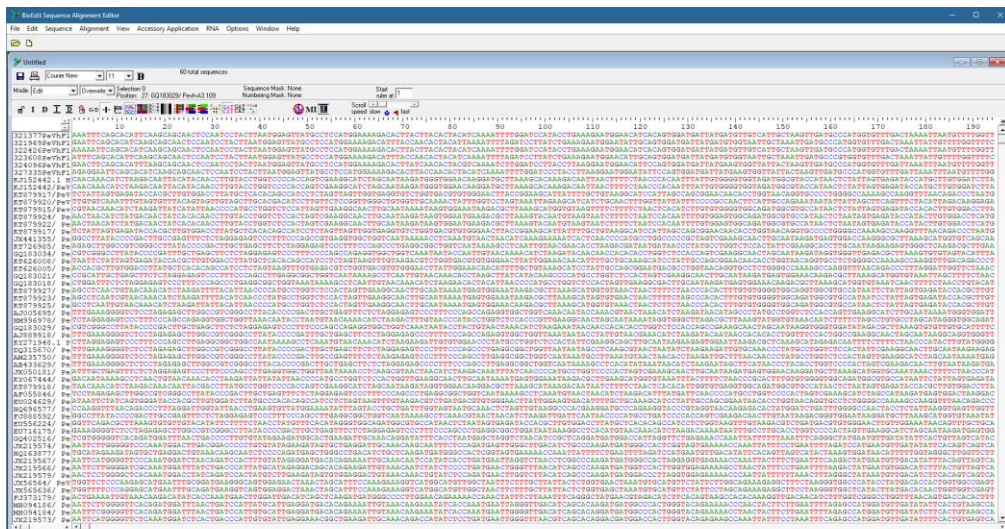


Figura 39. Alineamiento de las secuencias de referencia con las secuencias a analizar; en este caso observamos el alineamiento realizado con las secuencias del fragmento 10.

- o Ya alineadas las secuencias de referencia con las secuencias obtenidas correspondientes a los fragmentos 4, 8 y 10, utilizamos el software Mega7, para realizar 3 árboles filogenéticos, cada uno correspondiendo a los fragmentos.

ÁRBOL FILOGENÉTICO DEL FRAGMENTO F4

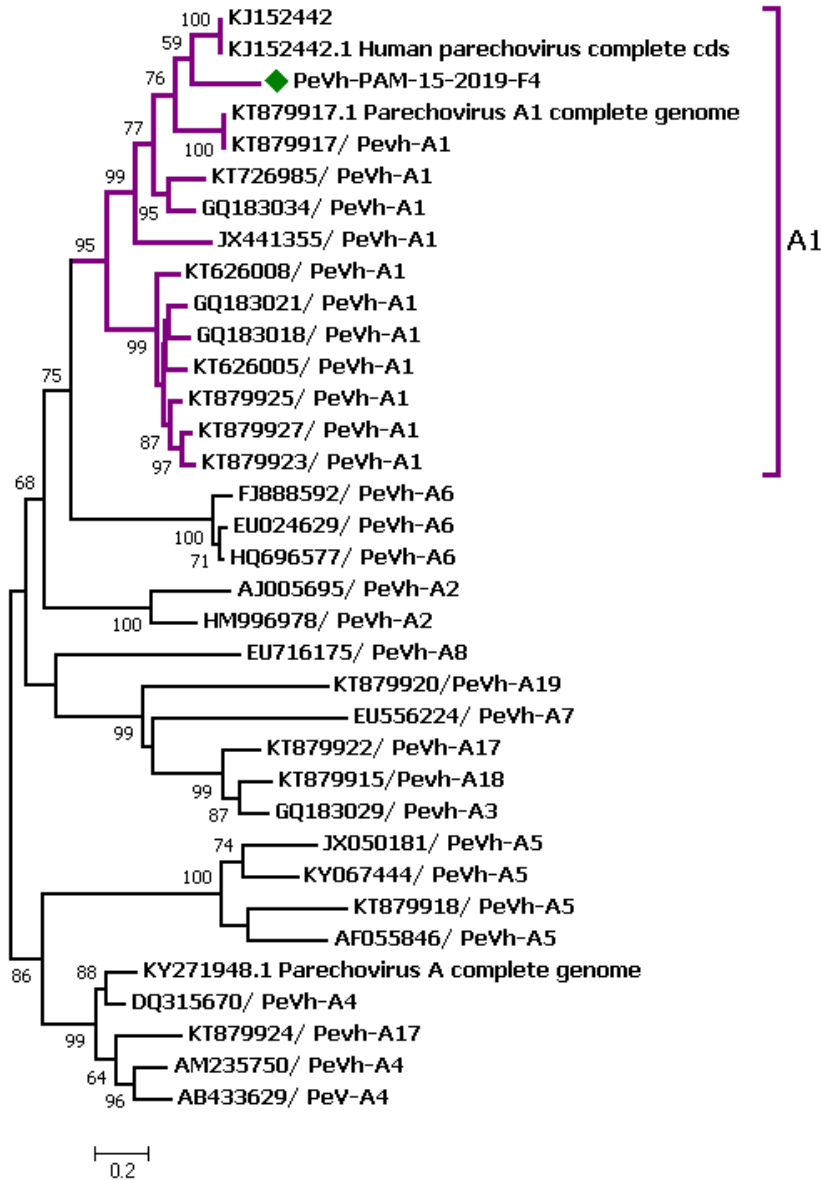


Figura 40. Árbol Filogenético del Fragmento 4. Árbol de máxima probabilidad donde podemos observar las relaciones entre distintas secuencias del PeV-A, destacando aquellas secuencias obtenidas en nuestra investigación, que se encuentran representadas por un diamante verde ◆.

En este árbol observamos la secuencia que se amplificó para el fragmento 4, corresponde a la muestra PeVh-PAM-15-2019-F4 resaltada con color morado, junto con las secuencias de referencia pertenecientes al serotipo A1. Podemos observar que nuestra muestra obtuvo un soporte Bootstrap de 59% a la referencia KJ152442 perteneciente al serotipo A1.

ÁRBOL FILOGENÉTICO DEL FRAGMENTO F8

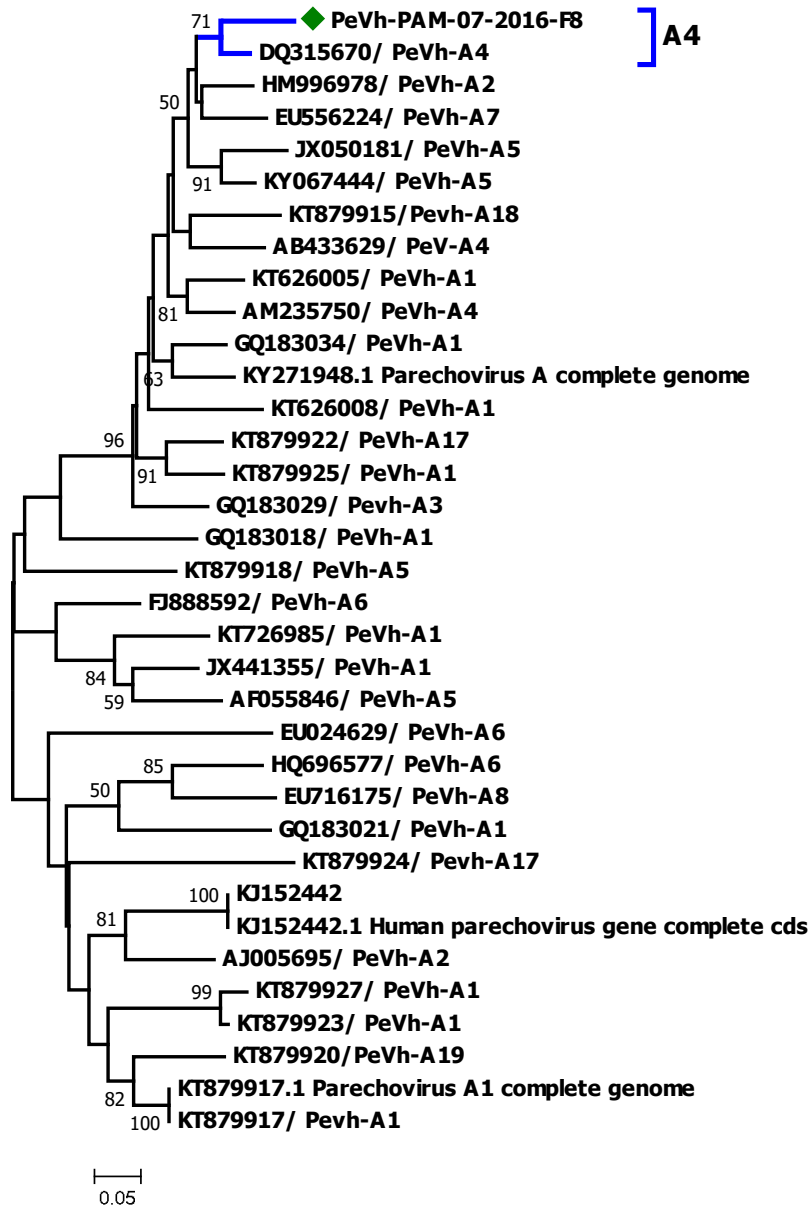




Figura 41. Árbol filogenético del fragmento 8. Árbol de máxima probabilidad donde podemos observar las relaciones entre distintas secuencias del PeV-A, destacando aquellas secuencias obtenidas en nuestra investigación, que se encuentran representadas por un diamante verde .

En este árbol observamos la secuencia que se amplificó para el fragmento 8, esta corresponde a la muestra PeVh-PAM-07-2016-F8 resaltada con color azul, junto con la secuencia de referencia perteneciente al serotipo A4. Podemos observar que nuestra muestra obtuvo un soporte Bootstrap de 71% a la referencia DQ315670 perteneciente al serotipo A4.

ÁRBOL FILOGENÉTICO DEL FRAGMENTO F10



Figura 42. Árbol filogenético del fragmento 10. Árbol de máxima probabilidad donde podemos observar las relaciones entre distintas secuencias del PeV-A, destacando aquellas secuencias obtenidas en nuestra investigación, que se encuentran representadas por un diamante verde .

En este árbol observamos la secuencia que se amplificó para el fragmento 10. Las muestras PeVh-PAM-07-2016-F10 y PeVh-PAM-11-2017-F10 con un soporte Bootstrap de 97%, pertenecen al serotipo A4, resaltada con color azul, junto con la secuencia de referencia perteneciente al serotipo A4; las muestras PeVh-PAM-12-2018-F10 y PeVh-PAM-15-2019-F10 con un soporte Bootstrap de 99% pertenecen al serotipo A1 resaltada con color morado, junto con la secuencia de referencia perteneciente al serotipo A1; y las muestras PeVh-PAM-10-2017-F10 y PeVh-PAM-09-2017-F10 con un soporte Bootstrap de 89% pertenecen al serotipo A6, resalta con color rojo, junto con la secuencia de referencia perteneciente al serotipo A6.

ID DE LAS MUESTRAS	FRAGS. AMPLIFICADOS			CLADOS
	F4	F8	F10	
PeVh-PAM15-2019	X		X	A1
PeVh-PAM11-2017			X	A4
PeVh-PAM07-2016		X	X	A4
PeVh-PAM10-2017			X	A6
PeVh-PAM09-2017			X	A6
PeVh-PAM12-2018			X	A1

Tabla 24. Análisis de los árboles filogenéticos.

DISCUSIÓN

Este estudio permitió determinar la frecuencia de casos por *Parechovirus A* (PeV-A) y caracterizar los serotipos circulantes en muestras respiratorias de pacientes con infección respiratoria aguda en Panamá entre 2011 y 2019. De un total de 1,183 muestras analizadas mediante RT-PCR, se identificaron 16 casos positivos, lo que equivale a una incidencia del 1.35%.

En el único estudio previo realizado por Gutiérrez et al. (2023), se analizaron 200 muestras pediátricas recolectadas en 2014 y 2015, de las cuales 64 eran de origen respiratorio. Entre estas, 2 muestras resultaron positivas para PeV-A, con una incidencia del 3.0%. Comparando este porcentaje con el obtenido en el presente estudio, se observa una leve disminución en la incidencia de PeV-A en muestras respiratorias en Panamá. Esta diferencia podría atribuirse al menor número de muestras analizadas en el estudio de Gutiérrez et al.

Los porcentajes de incidencia obtenidos en este estudio son consistentes con datos reportados internacionalmente, por ejemplo, en España se ha reportado una incidencia del 1.1% (Reina y Dueñas, 2019), en Estados Unidos del 3% (Sharp et al., 2012), y en Escocia del 2.1% (Harvala et al., 2008). Sin embargo, en Chile se reportó una incidencia mayor del 6% (Gutiérrez et al., 2016), estas diferencias podrían atribuirse a la variabilidad genética característica de PeV-A, así como a diferencias en los métodos de análisis y muestreo.

El mayor número de casos se registró en 2015, lo que podría estar relacionado con un brote local. Sin embargo, no se identificó una correlación clara entre la época del año y la incidencia del virus, lo que sugiere que PeV-A podría circular durante todo el año sin un patrón estacional definido. Esto contrasta con países que tienen estaciones climáticas marcadas, donde los casos tienden a incrementarse en primavera y verano, coincidiendo con los picos de enterovirus (Reina y Dueñas, 2019). Para confirmar estas observaciones, sería útil realizar estudios adicionales con un seguimiento a largo plazo y muestras más recientes y adecuadamente conservadas, que permitan identificar posibles tendencias epidemiológicas y otros serotipos circulantes en Panamá.

Dado que las muestras analizadas eran de carácter respiratorio y se enviaron por sospecha de infección viral, la mayoría de los pacientes positivos a PeV-A presentaron síntomas como tos y dificultad respiratoria. Estos hallazgos coinciden con estudios previos, que describen los síntomas respiratorios asociados a PeV-A como "comunes y leves" (Sharp et al., 2012). Además, en algunos casos se detectaron coinfecciones con otros virus respiratorios, como rinovirus, lo que sugiere

que PeV-A podría actuar sinérgicamente con otros patógenos, agravando los síntomas y complicando el diagnóstico clínico (Martínez et al., 2012).

Los análisis filogenéticos de las secuencias obtenidas revelaron una estrecha relación con cepas circulantes a nivel global, sugiriendo una posible diseminación internacional del virus. En este estudio, las cepas correspondieron a los serotipos PeV-A1, PeV-A4 y PeV-A6, todos asociados con infecciones respiratorias leves. Sin embargo, los años en los que se describieron estas cepas no coinciden con las fechas de los casos positivos reportados en Panamá.

En cuanto a la ubicación geográfica, Estados Unidos y Brasil son los países más cercanos con registros de estas cepas, lo que podría indicar una transmisión regional.

Si bien los análisis filogenéticos sugieren una posible relación con cepas circulantes a nivel global, la limitada cantidad de secuencias analizadas y los bajos valores de bootstrap obtenidos no permiten establecer con certeza las rutas de transmisión y la diversidad genética del virus en Panamá. Por lo tanto, se requieren estudios con un mayor número de muestras para obtener una caracterización más completa de la circulación del PeV-A en nuestro país.

CONCLUSIONES

A lo largo de nueve años, se observó una incidencia constante y baja de PeV-A en las muestras respiratorias analizadas, lo que indica una circulación endémica del virus en Panamá.

Los resultados resaltan la importancia de este virus, especialmente en niños pequeños, como un patógeno emergente que puede coexistir con otros virus respiratorios, lo que potencialmente agrava los síntomas en los pacientes afectados.

Desde un enfoque epidemiológico, los datos sugieren que PeV-A circula en diversas regiones del país y que podría estar presente durante todo el año, sin un patrón estacional definido. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones adicionales para comprender mejor los factores que favorecen su diseminación y para desarrollar protocolos diagnósticos más eficientes que permitan su identificación oportuna en los hospitales.

A nivel molecular, este estudio ofrece información valiosa sobre los serotipos de PeV-A que han circulado en Panamá durante los años analizados, lo que podría ayudar a los sistemas de salud a estar preparados para posibles casos en el futuro.

Este estudio proporciona una base sólida para futuras investigaciones sobre la epidemiología y evolución del PeV-A en Panamá. Los resultados obtenidos resaltan la importancia de implementar sistemas de vigilancia virológica robustos para monitorear de manera continua la circulación de este y otros virus respiratorios emergentes, lo que permitirá una mejor comprensión de su impacto en la salud pública y el desarrollo de estrategias de prevención y control más efectivas.

RECOMENDACIONES

- Continuar con el análisis de PeV-A, donde se utilicen muestras más frescas y que sean debidamente almacenadas; para así poder secuenciar fragmentos más grandes o inclusive un genoma completo. Con el uso de muestras mal manejadas y con almacenaje de tanto tiempo, pudimos evidenciar que no se puede realizar un óptimo análisis y eso lo demostramos en los resultados de la construcción de los árboles filogenéticos, esto se observa con los diferentes porcentajes de soporte del bootstraps; como es el caso del árbol del fragmento 4, donde la secuencia PeVh-PAM-15-2019-F4 tuvo un 59% de soporte, factores técnicos como la degradación de las muestras y/o por la variabilidad genética que contienen muchos virus como *Parechovirus*.
- Proponemos establecer una colaboración estrecha con el Hospital del Niño Dr. José Renán Esquivel para realizar un seguimiento prospectivo de neonatos y niños con sospecha de infección por PeV-A. A través de esta colaboración, podremos correlacionar los resultados de las pruebas moleculares con los datos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio, lo que permitirá una mejor caracterización de la enfermedad y el desarrollo de estrategias de prevención y control más efectivas.
- Contar con fragmentos más grandes y/o con el genoma completo de PeV-A para realizar análisis filogenéticos más concretos. Con estos se pueden realizar estudios que contribuyan al Sistema de Salud del país, para así poder colocar a Panamá en el mapa de *Parechovirus* como punto de información en Latinoamérica, como se encuentra actualmente Brasil, entre otros.
- Recomendamos la inclusión sistemática de PeV-A en los paneles de diagnóstico de virus respiratorios, lo que permitirá generar datos epidemiológicos sólidos y fortalecer los sistemas de vigilancia, lo que estimulará la realización de nuevas investigaciones para el desarrollo de estrategias de prevención y control más efectivas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abedi, G. R., Watson, J. T., Nix, W. A., Oberste, M. S., & Gerber, S. I. (2018). Enterovirus and Parechovirus Surveillance - United States, 2014-2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 67(18), 515–518. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6718a>

Al-Sunaidi, M., Williams, C. H., Hughes, P. J., Schnurr, D. P., & Stanway, G. (2007). Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. *Journal of virology*, 81(2), 1013–1021. <https://doi.org/10.1128/JVI.00584-06>

Ana Luiza da Mota Raminho, Daniele Ferreira Bezerra, Wanderley Dias das Chagas Junior, James Lima Ferreira, Raiana Scerni Machado, Fernando Neto Tavares, INVESTIGAÇÃO DE PARECHOVIRUS, AICHIVIRUS E COSAVIRUS EM AMOSTRAS DE GASTROENTERITE AGUDA NA REGIÃO NORTE E NORDESTE DO BRASIL, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Volume 27, Supplement 1, 2023, 103465, ISSN 1413-8670, <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.103465>

Benschop, K., Minnaar, R., Koen, G., van Eijk, H., Dijkman, K., Westerhuis, B., Molenkamp, R., & Wolthers, K. (2010). Detection of human enterovirus and human parechovirus (HPeV) genotypes from clinical stool samples: polymerase chain reaction and direct molecular typing, culture characteristics, and serotyping. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 68(2), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.05.016>

Benschop, K. S., Schinkel, J., Luken, M. E., van den Broek, P. J., Beersma, M. F., Menelik, N., van Eijk, H. W., Zaaijer, H. L., VandenBroucke-Grauls, C. M., Beld, M. G., & Wolthers, K. C. (2006). Fourth human parechovirus serotype. *Emerging infectious diseases*, 12(10), 1572–1575. <https://doi.org/10.3201/eid1210.051647>

Bubba, L., Broberg, E. K., Fischer, T. K., Simmonds, P., Harvala, H., & European Non-polio Enterovirus Network working group (2024). Parechovirus A Circulation and Testing Capacities in Europe, 2015-2021. *Emerging infectious diseases*, 30(2), 234–244. <https://doi.org/10.3201/eid3002.230647>

Chieochansin, T., Puenpa, J., & Poovorawan, Y. (2021). Phylogenetic molecular evolution and recombination analysis of complete genome of human parechovirus in Thailand. *Scientific reports*, 11(1), 8572. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88124-8>

Fox, B., Sabio Paz, V., Incardona, M. A., Elisiri, M. E., Gonzalez Fraga, S., Solana, C. L., & Fernández-Canigia, L. (2022). Rapid syndromic molecular testing and human parechovirus infection in children: A report of three cases in Argentina. *Revista Argentina de microbiologia*, 54(1), 31–34. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.02.003>

Gutiérrez, L., Sáenz, V., Franco, D., Moreno, B., Fuentes-Campos, E., Capitan-Barrios, Z., Rivera, L. F., Carrera, J. P., Castillo, J., Castillo, M., Pascale, J. M., López-Vergès, S., Sosa, N., & Ábrego, L. (2023). Detection of parechovirus A in respiratory, gastrointestinal, and neurological clinical samples of pediatric patients from Panama (2014-2015). *Virology journal*, 20(1), 302. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02268-9>

Gutiérrez, Valentina, Martínez-Valdebenito, Constanza, Montecinos, Luisa, Alarcón, Romina, Gárate, Constanza, & Ferrés, Marcela. (2016). Parechovirus as etiologic agent of meningitis and/or sepsis like illness in infants. *Revista chilena de infectología*, 33(4), 380-388. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000400002>

Harvala, H., Robertson, I., McWilliam Leitch, E. C., Benschop, K., Wolthers, K. C., Templeton, K., & Simmonds, P. (2008). Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections. *Journal of clinical microbiology*, 46(10), 3446–3453. <https://doi.org/10.1128/JCM.01207-08>

Hayes, A., Nguyen, D., Andersson, M., Antón, A., Bailly, J. L., Beard, S., Benschop, K. S. M., Berginc, N., Blomqvist, S., Cunningham, E., Davis, D., Dembinski, J. L., Diedrich, S., Dudman, S. G., Dyrdak, R., Eltringham, G. J. A., Gonzales-Goggia, S., Gunson, R., Howson-Wells, H. C., Jääskeläinen, A. J., ... Simmonds, P. (2020). A European multicentre evaluation of detection and typing methods for human enteroviruses and parechoviruses using RNA transcripts. *Journal of medical virology*, 92(8), 1065–1074. <https://doi.org/10.1002/jmv.25659>

Ito, M., Yamashita, T., Tsuzuki, H., Kabashima, Y., Hasegawa, A., Nagaya, S., Kawaguchi, M., Kobayashi, S., Fujiura, A., Sakae, K., & Minagawa, H. (2010). Detection of human parechoviruses from clinical stool samples in Aichi, Japan. *Journal of clinical microbiology*, 48(8), 2683–2688. <https://doi.org/10.1128/JCM.00086-10>

Izumita, R., Deuchi, K., Aizawa, Y., Habuka, R., Watanabe, K., Otsuka, T., & Saitoh, A. (2019). Intrafamilial Transmission of Parechovirus A and Enteroviruses in Neonates and Young Infants. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 8(6), 501–506. <https://doi.org/10.1093/jpids/piy079>

Kadambari, S., Harvala, H., Simmonds, P., Pollard, A. J., & Sadarangani, M. (2019). Strategies to improve detection and management of human parechovirus infection in young infants. *The Lancet. Infectious diseases*, 19(2), e51–e58. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30288-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30288-3)

Kung, M. H., Jan, M. W., Chen, J. J., Shieh, Y. C., & Chang, T. H. (2020). Detection of Parechovirus A1 with Monoclonal Antibody against Capsid Protein VP0. *Microorganisms*, 8(11), 1794. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111794>

Li, P., Li, T., Gu, Q., Chen, X., Li, J., Chen, X., Chen, Y., Zhang, D., Gao, R., He, Z., Zhu, X., Zhang, W., Hao, Y., & Zhang, D. (2016). Children's Caregivers and Public

Playgrounds: Potential Reservoirs of Infection of Hand-foot-and-mouth Disease. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep36375>

Martínez, Pamela, Cordero, Jaime, Valverde, Cristián, Unanue, Nancy, Dalmazzo, Roberto, Piemonte, Paula, Vergara, Ivonne, & Torres, Juan P. (2012). Viral respiratory co-infections in pediatric patients admitted for acute respiratory infection and their impact on clinical severity. *Revista chilena de infectología*, 29(2), 169-174. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000200008>

Mas Lago, P. J., & Bello Corredor, M. (2001). *Microbiología y parasitología médicas II tomo*. Editorial Ciencias Médicas. Capítulo 64. <https://cbtis54.edu.mx/wp-content/uploads/2024/04/Microbiologia-y-Parasitologia-Medicas-Llop-Valdes-Dapena-Zuazo-Tomo-II.pdf>.

Romero Carpio, B. M. (2018). Estudio de agentes virológicos excretados por la población de Quito, mediante análisis de metagenoma de aguas superficiales urbanas (Tesis de pregrado). Universidad de las Américas, Quito. <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10204>

Rhoden, E., Nix, W. A., Weldon, W. C., & Selvarangan, R. (2018). Antifungal Azoles Itraconazole and Posaconazole Exhibit Potent in Vitro Antiviral Activity against Clinical Isolates of Parechovirus A3 (Picornaviridae). *Antiviral Research*, 149, 75–77. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.11.011>

PATIL, P. R., GANORKAR, N. N., & GOPALKRISHNA, V. (2017). Epidemiology and genetic diversity of human parechoviruses circulating among children hospitalised with acute gastroenteritis in Pune, Western India: a 5-years study. *Epidemiology and Infection*, 146(1), 11–18. <https://doi.org/10.1017/s095026881700262x>

Peñata, A., Mesa, S., Leal, A., Castaño, T., Bustamante, J., & Sigifredo, O. (2020). Molecular diagnosis of meningitis and meningoencephalitis with an automated real-time multiplex polymerase chain reaction in a tertiary reference complex in Medellín, Colombia. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 62, e77. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062077>

Pham, N. T. K., Thongprachum, A., Shimizu, Y., Shiota, I., Hoque, S. A., Khamrin, P., Takano, C., Trinh, Q. D., Okitsu, S., Komine-Aizawa, S., Shimizu, H., Maneeekarn, N., Hayakawa, S., & Ushijima, H. (2021). Genetic diversity of Parechovirus A in infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2016-2018. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 90, 104776. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104776>

Reina, J., & Dueñas, J. (2019). Detección de parechovirus humanos en muestras respiratorias en menores de 2 meses con fiebre de origen desconocido [Detection of human Parechovirus in respiratory samples in the neonatal population with fever of unknown origin]. *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia*, 32(1), 91–92.

Sasidharan, A., Harrison, C. J., Banerjee, D., & Selvarangan, R. (2019). Emergence of Parechovirus A4 Central Nervous System Infections among Infants in Kansas City, Missouri, USA. *Journal of clinical microbiology*, 57(5), e01698-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01698-18>

Shah, Gauri, Robinson, Joan L, The Particulars on Parechovirus, *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 25, 602501, 3 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/602501>

Sharp, J., Bell, J., Harrison, C. J., Nix, W. A., Oberste, M. S., & Selvarangan, R. (2012). Human parechovirus in respiratory specimens from children in Kansas City, Missouri. *Journal of clinical microbiology*, 50(12), 4111–4113. <https://doi.org/10.1128/JCM.01680-12>

Sridhar, A., Karelehto, E., Brouwer, L., Pajkrt, D., & Wolthers, K. C. (2019). Parechovirus A Pathogenesis and the Enigma of Genotype A-3. *Viruses*, 11(11), 1062. <https://doi.org/10.3390/v11111062>

Stanway G, Hyypiä T. 1999. Parechoviruses. *J Virol* 73: 5249-5254. 1999 <https://doi.org/10.1128/jvi.73.7.5249-5254.1999>

Taboada, B., Morán, P., Serrano-Vázquez, A., Iša, P., Rojas-Velázquez, L., Pérez-Juárez, H., López, S., Torres, J., Ximenez, C., & Arias, C. F. (2021). The gut virome of healthy children during the first year of life is diverse and dynamic. *PLoS one*, 16(4), e0240958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240958>

Tolf, C., Gullberg, M., Johansson, E. S., Tesh, R. B., Andersson, B., & Lindberg, A. M. (2009). Molecular characterization of a novel Ljungan virus (Parechovirus; Picornaviridae) reveals a fourth genotype and indicates ancestral recombination. *The Journal of general virology*, 90(Pt 4), 843–853. <https://doi.org/10.1099/vir.0.007948-0>

Vergnano, S., Kadambari, S., Whalley, K., Menson, E. N., Martinez-Alier, N., Cooper, M., Sanchez, E., Heath, P. T., & Lyall, H. (2015). Characteristics and outcomes of human parechovirus infection in infants (2008-2012). *European journal of pediatrics*, 174(7), 919–924. <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2483-3>

Wang, C. Y. T., Ware, R. S., Lambert, S. B., Mhango, L. P., Tozer, S., Day, R., Grimwood, K., & Bialasiewicz, S. (2020). Parechovirus A Infections in Healthy Australian Children During the First 2 Years of Life: A Community-based Longitudinal Birth Cohort Study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(1), 116–127. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz761>

Zoll, J., Galama, J. M., & van Kuppeveld, F. J. (2009). Identification of potential recombination breakpoints in human parechoviruses. *Journal of virology*, 83(7), 3379–3383. <https://doi.org/10.1128/JVI.02529-08>



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

Detección Y Caracterización De *Parechovirus A* En Muestras De Pacientes Con Infección Respiratoria Aguda Durante Los Años 2011 A 2019 En Panamá.

Por:

Marian Del C. Alventas Alvarez_ _____

8-955-450

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología.

Dra. Leyda Ábrego _____

M.Sc. Zeuz Capitán _____

M.Sc. Humberto Cornejo _____