



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

**BIODIVERSIDAD GENÉTICA DE RINOVIRUS HUMANO EN NIÑOS
HOSPITALIZADOS PANAMEÑOS MENORES DE 5 AÑOS CON INFECCIÓN
RESPIRATORIA AGUDA (2010 2011)**

DANILO E FRANCO

**TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR POR
EL GRADO DE MASTER EN BIOTECNOLOGÍA**

TUTOR

DR. JUAN MIGUEL PASCALE

CO TUTOR

DR. JUAN RAMÓN ARBIZA

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMA
2013

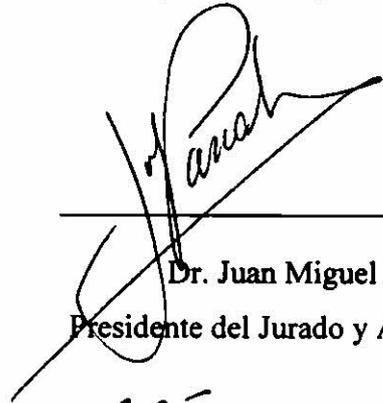
ST

18 MAR 2014

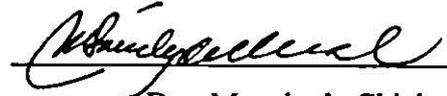
Obs.

HOJA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador encargado de evaluar el Proyecto de Tesis titulado: **“Biodiversidad genética de Rinovirus humano en niños hospitalizados panameños menores de 5 años con infección respiratoria aguda (2010-2011)”**, realizada en el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la salud (ICGES) por Danilo E. Franco, certifican de manera satisfactoria la calidad de este trabajo de investigación.



Dr. Juan Miguel Pascale
Presidente del Jurado y Asesor de Tesis



Dra. Magaly de Chial
Miembro del Jurado



Dr. Azael Saldaña
Miembro del Jurado

DEDICATORIA

“Yo he estado allí Sigo aquí Siempre te acompaño ”

Jesús de Nazaret

AGRADECIMIENTOS

Comenzaré señalando dos cosas siempre que leo un libro leo las páginas en las que los autores presentan sus agradecimientos Lo hago porque creo que son una parte importante de un texto producido Por otra parte esta es la primera vez que hago un trabajo tan extendido y que representa el fin-comienzo de una nueva etapa de mi vida, por lo que quiero expresar mi gratitud a todos quienes de una u otra manera, me han acompañado en esta larga jornada

En primer lugar quiero agradecer a Dios todo poderoso por la valiosa oportunidad que me ha brindado por haberme dado la sabiduría y la fortaleza para que fuera posible alcanzar esta meta.

Quiero expresar mi eterno agradecimiento a mi padre Avelino a mi madre Edilsa y a mis hermanos Diurka y Donael mil gracias por acompañarme en este proceso por sobre todo su amor comprensión paciencia y apoyo que permitieron que pudiese no sólo trabajar sino también llegar a buen puerto

A ti Zulay Edith gracias por aquella memorable y célebre frase Dani como vas con la tesis créeme que cada vez que la escuchaba me hacia recordar el gran compromiso y me impulsaba a seguir trabajando hasta alcanzar este valioso objetivo

A mis Asesores Dr Juan Miguel Pascale y Dr Juan Ramón Arbiza, gracias por ese tiempo esfuerzo y dedicación aportando sus comentarios apreciaciones y criticas para la realización de este proyecto

A mis compañeros de trabajo El Departamento de Virologia y Biotecnologia, siendo pieza clave en este rompecabezas

Disfruté y aproveché cada clase recibida en esta maestría, razón por la cual agradezco a todos los profesores que nos brindaron su tiempo para compartir y transmitir sus conocimientos De la misma manera agradezco a mis compañeros por aquellos memorables momentos a los cuales les deseo éxitos en sus futuros proyectos

A todas aquellas instituciones que me brindaron su apoyo incondicional Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud Universidad de Panamá, Universidad de Granada – España, Secretaría de Ciencia y Tecnología (CAP10 001) Ministerio de Salud y Ministerio de Economía y Finanzas (Cod SINIP 9044 019) Sin sus aportaciones no hubiese sido posible realizar y culminar este trabajo

Cada uno de ustedes directa e indirectamente han sido fundamentales en la realización de esta tesis por lo tanto dueños de ella. Mil gracias a todos

**Danielo Franco
Panamá, noviembre de 2013**

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
SUMMARY	2
1 INTRODUCCIÓN	3
2 FUNDAMENTO TEÓRICO	7
2.1 Generalidades	7
2.2 Clasificación y Estructura	8
2.3 Replicación viral	9
2.3.1 Unión a la Célula Hospedero	9
2.3.2 Entrada a la célula Hospedero	12
2.3.3 Traducción	13
2.3.4 Replicación del ácido nucléico	16
2.3.5 Ensamblaje	18
2.4 Patogénesis	19
2.4.1 Infecciones de las vías respiratorias superiores	21
2.4.2 Infecciones de las vías respiratorias inferiores	22
2.4.3 Infección por HRV y enfermedad sistémica	25
2.5 Epidemiología de las infecciones por Rinovirus	26
2.6 Especies/Serotipos de HRV y sus síndromes clínicos	28
2.7 Tratamiento	31

3	HIPÓTESIS DE TRABAJO	32
4	OBJETIVOS	32
4 1	Objetivo General	32
4 2	Objetivos Específicos	32
5	METODOLOGÍA	33
5 1	Tipo de Investigación	33
5 2	Diseño	33
5.3	Universo	33
5 4	Tamaño de la Muestra	34
5 5	Criterios de Inclusión	34
5 6	Criterios de Exclusión	35
5 7	Instrumento de recolección de la información	35
5 8	Extracción de ARN	35
5 9	RT PCR semi anidada	36
5 10	Secuenciación	37
5 11	Análisis de Secuencias	37
6	RESULTADOS	38
7	DISCUSIÓN	46
8	CONCLUSIONES	49

9 ANEXOS	51
9 1 Equipos Utilizados	51
9 2 Reactivos Utilizados	54
9.3 Procedimientos	55
9 4 Publicaciones	59
9 4 1 Carteles	59
9 4 2 Publicación en Revista Indexada	59
10 BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I Cantidad de muestras seleccionadas por región de salud	34
Cuadro II Total de muestras analizadas e identificadas en base a las distintas especies y serotipos de HRV	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución por estacionalidad de los diferentes virus respiratorios en Panamá durante el 2011	5
Figura 2 Virus respiratorios detectados en niños menores de 5 años por el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud distribuidos por gravedad durante el 2011	6
Figura 3 Genoma del HRV y proteínas que codifica	9
Figura 4 Interacción entre la ICAM 1 y su ligando natural LFA 1	10
Figura 5 Estructura de ICAM 1 unida a la membrana celular	11

Figura 6 Sitio de unión a la ICAM 1 de la partícula viral	13
Figura 7 Sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)	15
Figura 8 Evasión al Aparato de Golgi	17
Figura 8 Replicación Viral	19
Figura 10 Extracción de ARN viral utilizando el kit QIAgen	36
Figura 11 Figura 9 Región VP4/VP2 del genoma de HRV	36
Figura 12 Electroforesis de productos de 542 pb amplificados en un gel de agarosa al 1 5%	39
Figura 13 Análisis filogenético del gen VP4/VP2 de los 62 HRV estudiados y cepas de referencia para cada especie obtenidas del GenBank database (NCBI)	40
Figura 14 Filogenia de las secuencias VP4/VP2 amplificadas de las variantes de HRV detectados en el estudio en comparación con los serotipos de las cepas de referencia de las especies A y B y los asignados provisionalmente para la especie C	42
Figura 15 Análisis de p-Distance	43

ABREVIATURAS

- **ADN** Acido desoxirribonucleico
- **ADV** Adenovirus
- **ARN** Acido ribonucleico
- **CDC** Centers for Disease Control and Prevention (siglas en ingles de Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades)
- **CNBI** Comité Nacional de Bioética de la Investigación
- **CSS** Caja de Seguro Social de Panamá
- **Flu A** virus Influenza A
- **Flu B** virus Influenza B
- **HMPV** Human Metapneumovirus (siglas en inglés de Metapneumovirus humano)
- **HRV** Human Rhinovirus (siglas en inglés de Rinovirus humano)
- **ICGES** Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud
- **ICAM 1** Intercellular Adhesion Molecule 1 (siglas en inglés de Molécula de Adhesión Intercelular 1)
- **IRA** Infección Respiratoria Aguda
- **MINSA** Ministerio de Salud de Panamá
- **NCBI** National Center for Biotechnology Information (siglas en inglés de Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
- **PCR** Polymerase Chain Reaction (siglas en inglés de Reacción en Cadena de la Polimerasa)
- **PIV 1** Parainfluenza virus 1 (siglas en inglés de Virus Parainfluenza tipo 1)
- **PIV 2** Parainfluenza virus 2 (siglas en inglés de Virus Parainfluenza tipo 2)
- **PIV 3** Parainfluenza virus 3 (siglas en inglés de Virus Parainfluenza tipo 3)
- **RT PCR** Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa
- **qRT PCR** Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa en tiempo real

- **RSV** Respiratory Sincitial Virus (siglas en inglés de Virus Sincitial Respiratorio)
- **VP1** Viral Protein 1 (siglas en inglés de Proteína Viral 1)
- **VP2** Viral Protein 2 (siglas en inglés de Proteína Viral 2)
- **VP3** Viral Protein 3 (siglas en inglés de Proteína Viral 3)
- **VP4** Viral Protein 4 (siglas en inglés de Proteína Viral 4)
- **USA** United State of América (siglas en inglés de Estados Unidos de América)
- **WHO** World Health Organization (siglas en inglés de Organización Mundial de la Salud)

DEFINICIONES

Ácido nucleico Los ácidos nucleicos son macromoléculas (polímeros) formados por la repetición de nucleótidos unidos mediante enlaces fosfodiéster. Estos polímeros almacenan la información genética de los organismos vivos y son los responsables de la transmisión hereditaria. Existen dos tipos básicos: el ADN y el ARN.

ADN El ácido desoxirribonucleico es un tipo de ácido nucleico que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria.

ARN El ácido ribonucleico es un ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleótidos. Está presente tanto en las células procariotas como en las eucariotas, y es el único material genético de ciertos virus.

Análisis filogenético es la determinación de la historia evolutiva de los organismos analizando sus secuencias genéticas.

P-distance es la proporción (p) de los sitios de nucleótidos en la que dos secuencias que se comparan son diferentes. Se obtiene dividiendo el número de diferencias de nucleótidos por el número total de nucleótidos en comparación.

Secuenciación Es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.

Serotipo clasificación en la que se ubica un microorganismo infeccioso según los antígenos de superficie que presentan.

RESUMEN

FRANCO D 2013 BIODIVERSIDAD GENÉTICA DE RINOVIRUS HUMANO EN NIÑOS HOSPITALIZADOS PANAMEÑOS MENORES DE 5 AÑOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA (2010 2011)

Rinovirus humano (HRV) es el patógeno que con mayor frecuencia provoca infecciones del aparato respiratorio superior. Se ha comprobado que más del 75% de los niños han tenido contacto con este virus antes de los 2 primeros años de vida. En la última década se ha reportado al HRV como agente causal de enfermedades respiratorias severas como Neumonía viral Resuello agudo relacionado con bronquitis y Asma agudo en niños. Las infecciones por HRV ocurren en personas de todas las edades en una proporción de 25% a 50% de las infecciones respiratorias parecidas a influenza. HRV presenta una alta diversidad genética, con tres especies llamadas A, B y C. La especie C ha sido recientemente descrita, asociada con infecciones respiratorias agudas y ha tenido una rápida diseminación en todo el mundo. En este estudio se investiga la variabilidad genética de HRV circulantes en Panamá durante 2010-2011 a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos colectados de niños hospitalizados con infección respiratoria a los cuales se les extrajo el ARN total. Se amplificó un fragmento de 542 pb del gen VP4/VP2 y el producto de PCR fue secuenciado. Para el análisis filogenético se utilizaron los softwares Sequencher, BioEdit y PhyML. Para este estudio se utilizaron 62 muestras de hisopados nasofaríngeos positivos por HRV por RT-PCR en tiempo real de un total de 118 muestras positivas. El árbol filogenético originado nos muestra que 37 (59.7%), 20 (32.3%) y 5 (8.0%) corresponden a los grupos A, C y B respectivamente. A su vez, dentro de cada especie, las muestras panameñas fueron agrupadas con varios serotipos. Todas las variantes encontradas son muy heterogéneas y la mayoría de ellas son asignadas a los serotipos descritos anteriormente, aunque varias cepas se han establecido provisoriamente a nuevos serotipos. Este estudio demuestra la alta diversidad genética de HRV circulantes en Panamá.

SUMMARY

FRANCO, D 2013 GENETIC BIODIVERSITY OF HUMAN RHINOVIRUS IN PANAMANIAN HOSPITALIZED CHILDREN UNDER FIVE YEARS WITH RESPIRATORY INFECTIONS (2010 2011)

Human Rhinovirus (HRV) is the most common pathogen that causes upper respiratory tract infections. It has been found that over 75 % of children have had contact with this virus before the first 2 years of life. In the last decade, HRV has been reported as a causative agent of severe respiratory diseases such as viral pneumonia, acute wheezing related acute bronchitis and asthma in children. HRV infections occur in people of all ages in a proportion of 25% to 50 % of respiratory infections like Influenza. HRV has high genetic diversity with three species called A, B and C. The species C was recently described, associated with acute respiratory infections and rapid dissemination worldwide. This study investigates the genetic variability of HRV circulating in Panama during 2010 to 2011. It corresponds to the nasopharyngeal swab samples collected from children hospitalized with respiratory infection, which were extracted, total RNA was amplified, gene fragment VP4/VP2 542pb and the PCR product was sequenced. For phylogenetic analysis, software was used: Sequencher software, BioEdit and PhyML. We used for this study 62 samples positive for HRV nasopharyngeal swabs by RT-PCR in real time with a total of 118 positive samples. The phylogenetic tree shows that originated 37 (59.7 %) 20 (32.3 %) and 5 (8.0 %) correspond to the groups A, C and B respectively. In turn, within species Panamanian samples were grouped with several serotypes. All variants found were very heterogeneous and most of them were assigned to serotypes described above, although several strains have been set temporarily to new serotypes. This study demonstrates the high genetic diversity of HRV circulating in Panama.

1 INTRODUCCIÓN

Los Virus Respiratorios son los causantes del mayor número de Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) a nivel mundial (Mlynarczyk *et al* 2001 Hall, 2001 Greenberg, 2002) Las IRA constituyen el principal motivo de consulta médica en niños y adultos de ambos sexos especialmente durante los meses de temporada lluviosa para los países tropicales o subtropicales y de frío en los países de clima templado (Jain *et al* 2001)

Los principales virus respiratorios son Rinovirus humano (HRV) Influenza A (Flu A) Influenza B (Flu B) Metapneumovirus humano (HMPV) virus Parainfluenza 1 (PIV 1) virus Parainfluenza 2 (PIV 2) virus Parainfluenza 3 (PIV 3) virus Sincitial Respiratorio (RSV) y Adenovirus (ADV) Estos virus comparten los principales mecanismos de contagio que son la inhalación de aerosoles o microgotas con gérmenes e inoculación en las mucosas nasal ocular o cavidad oral de secreciones infectadas transportadas por las manos (Denny *et al* 1995)

Rinovirus humano está clásicamente descrito como el responsable del resfriado común con una marcada preponderancia por la vía aérea superior y se pensaba que era

incapaz de reproducirse en la vía aérea baja, ya que sólo se reproducía a temperaturas bajas de 33 °C y no a 37°C (Tyrrell y Channock 1963) Sin embargo ya desde 1965 se describió que era capaz de producir una traqueobronquitis en voluntarios sanos en los que se indujo la infección por HRV En el año 1969 se describió el aislamiento del HRV en tejido pulmonar *post mortem* lo cual fue un indicio importante de que era capaz de infectar la vía aérea inferior (Craighead *et al* 1969) Posteriormente se describió en cultivos de células epiteliales bronquiales infectadas luego de la exposición por HRV En 1999 en cultivos experimentales se describió que los 37° C de la vía aérea baja no son protectores de replicación del virus En el año 2000 por hibridación *in situ* se logró una prueba fehaciente de que el virus infecta el pulmón humano y que no era recogido de la vía aérea superior cuando se tomaba la muestra en voluntarios sanos e infectados por HRV a los cuales se les tomó después biopsias bronquiales (Papadopoulos *et al* 2000)

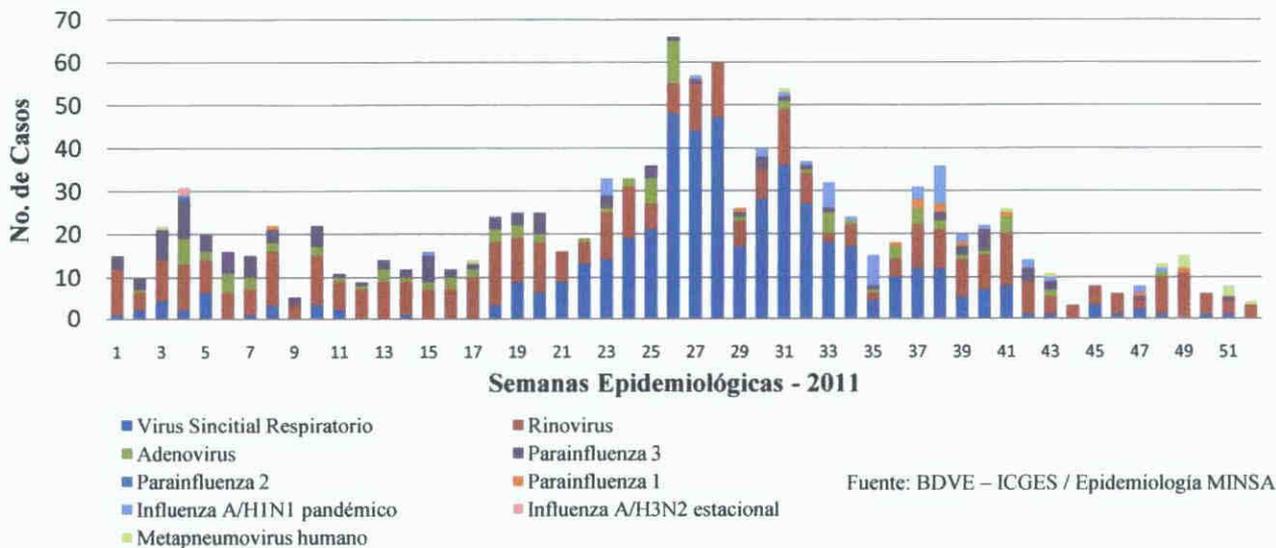
Aunque HRV es uno de los agentes causales más comunes de enfermedad respiratoria, su epidemiología molecular ha sido poco investigada A pesar de los recientes descubrimientos de nuevos genotipos de HRV su espectro de enfermedad clínica y posiciones filogenéticas no se entienden completamente

En los últimos años el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud ha adquirido nuevas tecnologías que le permiten detectar HRV en muestras clínicas de hisopados nasofaríngeos obtenidos por el Sistema de Vigilancia Nacional para **Influenza y Otros Virus Respiratorios** Según datos del Sistema de Vigilancia, para el año 2011 la incidencia de HRV fue del 35.2% en toda la población sólo por debajo de la

infección por RSV, la cual obtuvo una incidencia del 41.3% (Figura 1). De los casos positivos por HRV, el 75.5% perteneció a la población infantil <5 años siendo la más vulnerable, cabe resaltar que 60% de estos pacientes necesitó hospitalización (Figura 2) (ICGES *et al.*, 2012).

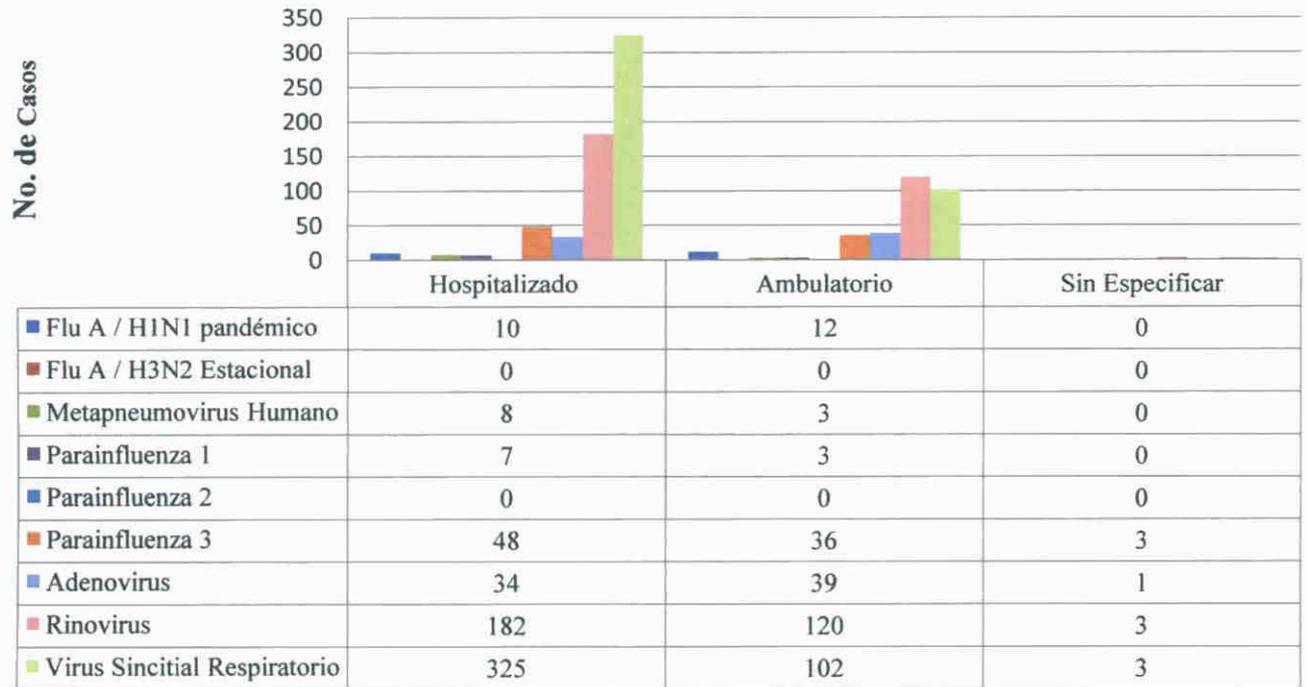
Muy poco, en general, se sabe acerca de la diversidad genética de los virus respiratorios en América Central y Panamá, y más específicamente, de los Rinovirus. En este estudio investigamos la variabilidad genética de HRV en niños menores de cinco años, hospitalizados en Panamá con IRA.

Figura 1: Distribución por estacionalidad de los diferentes virus respiratorios en Panamá durante el 2011



VSR	HRV	ADV	PIV-1	PIV-2	PIV-3	Flu A/H1N1 pdm	Flu A/H3N2	HMPV	Total
470	400	91	11	1	104	45	2	13	1137
41.3%	35.2%	8.0%	1.0%	0.1%	9.1%	4.0%	0.2%	1.1%	100.0%

Figura 2: Virus respiratorios detectados en niños menores de 5 años por el Instituto Commemorativo Gorgas de Estudios de la Salud distribuidos por gravedad durante el 2011



Fuente: BDVE – ICGES / Epidemiología MINSA

2 FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 Generalidades

El Rinovirus humano fue aislado por primera vez a partir de personas con resfriados comunes por Pelon (Pelon *et al* 1957) y Price (Price *et al* 1956) En casi 60 años transcurridos desde este descubrimiento se han descrito más de 100 serotipos de HRV se ha definido la estructura cristalográfica de la cápside y se ha secuenciado el genoma completo No obstante el conocimiento del espectro clínico de las enfermedades por HRV sigue evolucionando Los HRV se vincularon principalmente con el resfriado común y durante muchos años después de su descubrimiento se pensó que tenían una importancia médica escasa Más recientemente estos virus se han implicado en varias enfermedades importantes desde el punto de vista médico las infecciones por HRV ocurren en personas de todas las edades en una proporción del 25% al 50% de todas las infecciones respiratorias tipo influenza (Nicholson *et al* 1997) Esta nueva valoración se ha visto impulsada en gran parte por la mayor sensibilidad diagnóstica que ofrecen los análisis por biología molecular Es posible que el desarrollo reciente de estos métodos moleculares permita completar la serotipificación de los HRV y haga avanzar aun más los intentos de definir la epidemiología de estos virus

2.2 Clasificación y Estructura

Los HRV han sido clasificados dentro del género *Enterovirus* familia *Picornaviridae*. Similar a otros picornavirus son pequeños no envueltos con un diámetro de cerca de 30 nm. Tienen una cadena simple de ARN en sentido positivo y un marco de lectura abierto que codifica cuatro proteínas de la cápside VP4, VP2, VP3 y VP1 y siete proteínas no estructurales 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D (Figura 3 A). Si se observa la estructura de la cápside viral podemos visualizar un arreglo de 60 protómeros en una estructura icosaédrica altamente empaquetada, estos protómeros forman doce pentones uno en cada vértice del virus (Figura 3 B). Cada pentón está en contacto con otras cinco proteínas que lo rodean. Cada cara del virus tiene un complejo proteico que se asemeja a un trisquel o trinacrias celta (estructura de tres piernas). Puesto que el icosaedro tiene 20 caras hay 20 trinacrias, estas estructuras son muy importantes en la unión del virus a la célula (ver sección 2.3.2) (Hunt *et al.* 2007).

Los HRV tienen una alta diversidad genética, se han descrito más de 100 serotipos diferentes todos agrupados dentro de tres especies HRV A, HRV B y el recientemente reconocido HRV C que ha sido rápidamente identificado a nivel mundial (Simmonds *et al.* 2010).

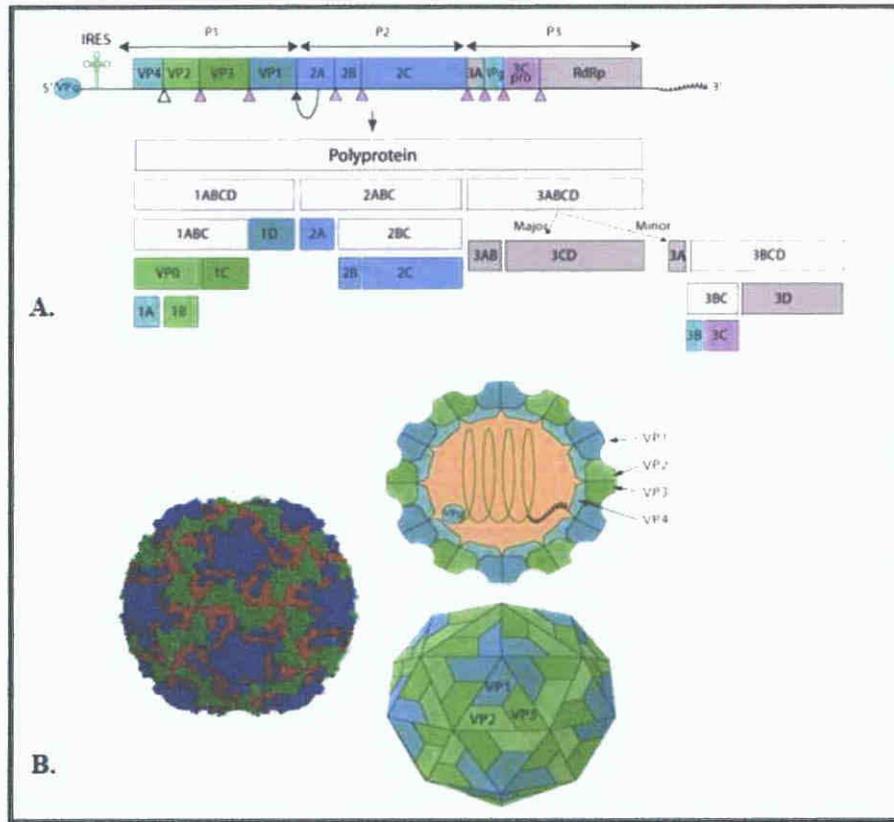


Figura 3: A- Genoma del HRV y proteínas que codifica. B- La cápside, consiste en 60 protómeros, cada protómero contiene 4 polipéptidos: VP1, VP2, VP3 yVP4. Extraído de: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html

2.3 Replicación viral

2.3.1 Unión a la Célula Hospedero

La mayoría de los HRV se unen a un miembro de las proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas llamada molécula de adhesión intercelular de tipo 1 (ICAM-1), que se encuentra en las superficies de las células epiteliales y otras células. Esta molécula media la adhesión entre células en diversas células epiteliales. La expresión de ICAM-1 se eleva en condiciones inflamatorias tales como las que ocurren en una infección por

HRV y esto puede llevar a diseminación del virus puesto que hay más moléculas receptoras disponibles (ciclo de realimentación positiva). (Greve *et al.*, 1989)

La ICAM-1 interviene en la unión de las células a otras moléculas u otras células. La molécula ICAM-1 tiene como ligandos naturales la integrina LFA-1 (de Leucocyte Function-Associated Antigen-1), el fibrinógeno y Mac-1 (de Macrophage-1 antígeno), se encuentra implicada en la respuesta inmunitaria e inflamatoria (Figura 4); se le asocia la acumulación de leucocitos en tejidos inflamados. HRV utiliza ICAM-1 a modo de puerta trasera para entrar en las células humanas. La molécula ICAM-1 corresponde a una glicoproteína de membrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Consta de una región extracelular formada por cinco dominios, que presentan un plegamiento de inmunoglobulina (D1-D5), seguida de un dominio hidrofóbico transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático. La forma de ICAM-1 guarda semejanza con un brazo dividido en cinco dominios, o secciones, que se extiende desde un codo que penetra en la membrana celular; el dominio amino terminal D1 contiene los aminoácidos responsables del reconocimiento del virus.

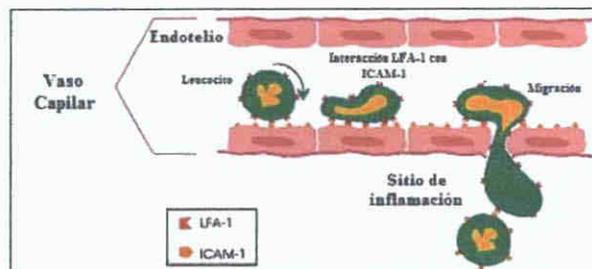


Figura 4: Interacción entre la ICAM-1 y su ligando natural LFA-1. ICAM-1 tiene la función de mediar la adhesión leucocitaria al endotelio durante la respuesta inflamatoria mediante su unión a LFA-1. Extraído de: <http://www.drugdiscoveryonline.com/doc/isis-abbott-establish-antisense-manufacturing-0002>

Los estudios de microscopía electrónica muestran que ICAM 1 se une a los HRV por una región distinta de la que utiliza para hacerlo con otros ligandos. El extremo de ICAM 1 recuerda, por su forma, a una mano con un pulgar y tres proyecciones a modo de dedos. Los leucocitos se unen a la zona que correspondería al pulgar; los tres bucles digitiformes interactúan con la base del cañón de los HRV del grupo mayor mostrando una superficie de contacto perfectamente complementaria en cuanto a la forma y a la distribución de cargas. La secuencia y conformación de esos bucles es distinta de la de otros tipos ICAM de animales diferentes, excepto la molécula ICAM de chimpancé. Por eso solo los humanos y los chimpancés se encuentran expuestos a la infección por rinovirus. El hecho de que el virus se una a un lugar distinto del que se unen los leucocitos abre una puerta al desarrollo de métodos para el bloqueo específico de la interacción. Si se logra impedir mediante fármacos o ingeniería genética, la interacción virus receptor, podríamos eliminar un porcentaje sustantivo de resfriados sin entorpecer la función normal del receptor ICAM 1 (Figura 5).

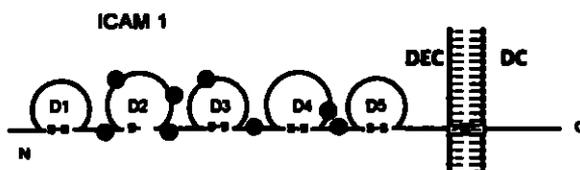


Figura 5 Estructura de ICAM 1 unida a la membrana celular. Es una proteína de transmembrana que posee un extremo amino terminal en el dominio extracelular (DEC), un solo dominio transmembrana, y un extremo carboxilo terminal de dominio citoplásmico (DC). El DEC está formado a su vez por cinco dominios o bucles creados por puentes disulfuro que presentan un plegamiento de inmunoglobulina (D1-D5). El dominio amino terminal D1 contiene los aminoácidos responsables del reconocimiento del virus. La estructura de la ICAM 1 se caracteriza por una fuerte glicosilación.

El grupo menor de HRV utiliza diversos miembros de la familia de receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDL de low density lipoprotein) para unirse a la célula. En particular se une a los receptores de LDL, VLDL (very low density lipoprotein) y LRP (LDL related protein). Se trata de proteínas modulares transmembrana que se unen a una gran variedad de ligandos de función y estructura variadas para introducirlos así en la célula. Además de desarrollar una función clave en el metabolismo del colesterol, los miembros de esta familia proteínica participan en la señalización celular, operan como transductores de señales externas.

2.3.2 Entrada a la célula hospedero

Entre los pentones y las trinacrias hay una hendidura (Figura 6A) el receptor en la superficie celular ICAM 1 se une en la hendidura (figura 6B) y precipita un cambio conformacional en algunas proteínas virales (VP4). La interacción de una célula y una proteína viral no es muy estable. En el caso de los rinovirus, la entrada al citoplasma parece seguir una endocitosis, lo que sugiere que se requiere de un pH ácido para el cambio conformacional (Hoover Litty *et al* 1993).

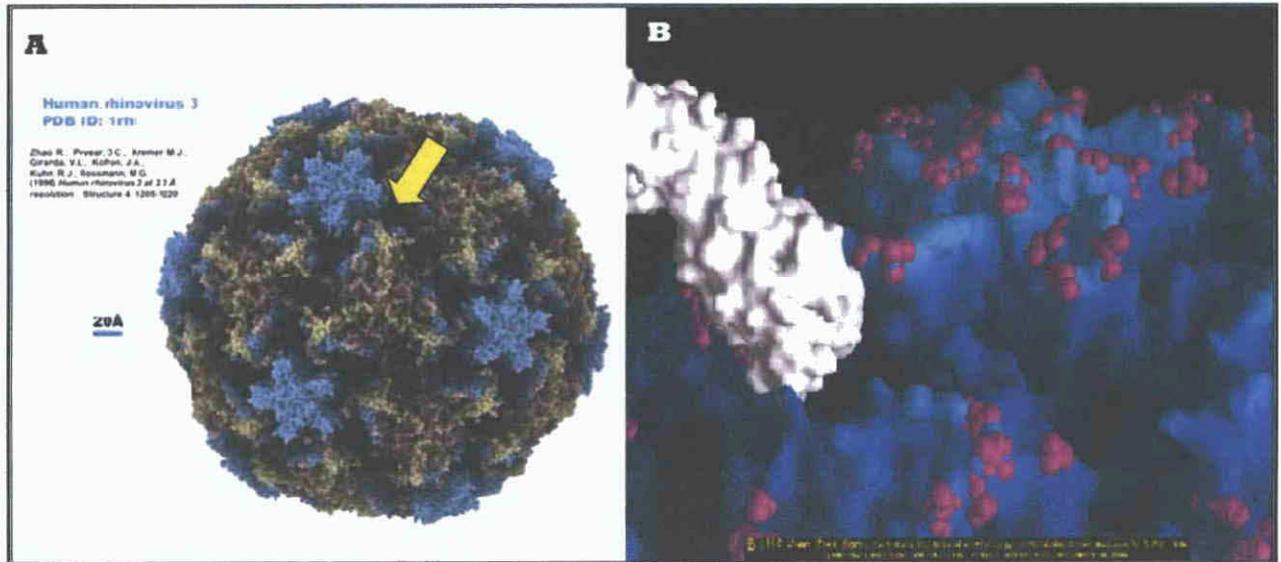


Figura 6: A. Sitio de unión a la ICAM-1 de la partícula viral. B. Unión del virus a los receptores ICAM-1 en la membrana celular Extraído de: <http://yasalud.com/rinovirus/>

Quando el virus se une a su receptor, la proteína VP4 es liberada del protómero. Esto permite el escape del ARN viral de la nucleocápside cuando el virus es internalizado en la vía endocítica. En el endosoma, la nucleocápside se desensambla en el ambiente ácido.

2.3.3 Traducción

Una vez que el ARN entra en la célula puede ser traducido directamente ya que tiene una polaridad de ARN mensajero. En el extremo 5' del ARN hay una pequeña proteína viral llamada VPg. Regularmente, cuando un ARNm celular es traducido, la subunidad ribosómica menor reconoce la estructura metilada en el extremo 5' y luego el ribosoma se ensambla después de la unión de la subunidad mayor. Sin embargo, no hay

ninguna estructura metilada en el ARN de los HRV puesto que la metilación se da en el núcleo (por enzimas celulares) y el ciclo vital completo de los HRV sucede en el citoplasma. No obstante la maquinaria celular de síntesis proteica sí traduce el ARN viral. En el ARN del HRV hay una región de estructura secundaria llamada sitio interno de entrada al ribosoma (IRES por sus siglas en inglés) (Figura 7). El cual es reconocido por el complejo de proteínas de la célula hospedera que normalmente reconocen la estructura metilada (Hunt *et al* 2007).

En otras palabras La mayoría de los RNAm de los eucariotas son funcionalmente monocistronicos esto es cada RNAm codifica una proteína. Desde el punto de vista estructural contienen en su extremo 5 terminal una guanina metilada o estructura cap que es el sitio en donde inicialmente se une el ribosoma. Para el año de 1988 se describió por primera vez la existencia de un mecanismo de inicio de la traducción alternativo en el que el ribosoma interactúa con el RNA sin la participación de la estructura cap (Pelletier *et al* 1988). Este mecanismo denominado inicialmente como independiente de cap requiere de la presencia de un IRES y fue identificado por primera vez en la RNT 5 del RNA del virus de la polio (PV) y de la encefalomiocarditis (EMCV) (Kozak 1989). Esta región funciona de manera análoga al cap ya que permite que el ribosoma se reclute para el inicio de la síntesis de proteínas. Sin embargo a diferencia del cap el IRES permite la unión del ribosoma en una secuencia interna del RNAm localizada comúnmente en la RNT 5 y en algunas ocasiones dentro de los primeros nucleótidos de la región codificante y no en el extremo 5 terminal.

Actualmente se han identificado elementos IRES en todos los picornavirus y en otros virus con genomas de RNA pertenecientes a otras familias, como la de los flavivirus (virus de la Hepatitis C o HCV), retrovirus, e incluso en virus de DNA como el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi. Más aún los elementos IRES también han sido identificados en las RNT 5' de un gran número de RNAm celulares, lo que apoya la idea de su relevancia en la traducción (Macejak *et al.*, 1991)

Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES)

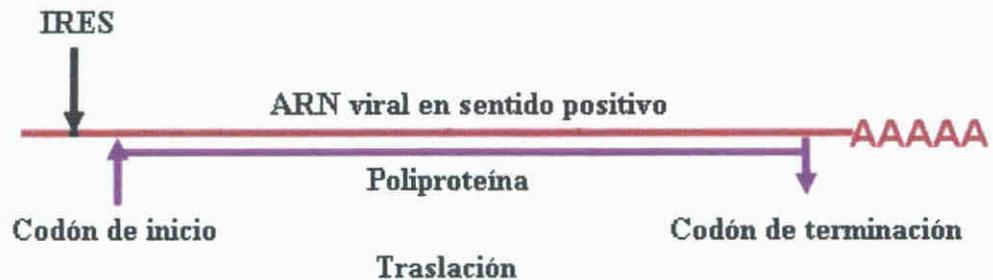


Figura 7: Sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), necesario para que inicie la traducción del ARN viral.

Aparentemente, hay un factor celular adicional que es necesario para el reconocimiento del IRES pero no para la estructura metilada normal de una ARNm. Es posible que la disponibilidad de estos factores del huésped determine en parte el tropismo de los HRV por ciertas células.

El hecho de que solo haya un IRES significa que solo hay un producto primario de traducción; o sea, que solo puede sintetizarse una sola proteína. Esta proteína será

eventualmente dividida en varias proteínas en el virus maduro y por ello a esta proteína primaria se le llama policistronica puesto que codifica más de un gen (cistrón)

2.3 4 Replicación del ácido nucléico

El ciclo vital completo de estos virus ocurre en el citoplasma de la célula huésped. Puesto que el ARN tiene el mismo sentido que el ARNm, el ARN por sí mismo es infeccioso aunque en menor medida que la partícula vírica completa. Esto es porque el virus tiene proteínas que se fijan a la superficie celular como se describió anteriormente. La replicación se inicia con la codificación de una polimerasa (replicasa) sintetizada de la cadena de sentido del virus infectante. La polimerasa copia la cadena de sentido positivo a una de anti sentido que luego es vuelta a copiar en cadena de sentido positivo que es empacada dentro del virus. La replicación de ARN parece ocurrir en la superficie citoplasmática de las vesículas membranosas a las que se une la ARN polimerasa. Estas aparentemente salen del retículo endoplásmico tal como las vesículas de transporte en las células no infectadas y las proteínas de membrana del cuerpo de Golgi. Sin embargo cuando la célula es infectada por un HRV las vesículas no se funden con la fase cis del cuerpo de Golgi como lo hacen las vesículas de transporte (Figura 8). Estas vesículas tienen proteínas dianas específicas en sus superficies citoplásmicas (llamadas proteínas COP) y es posible que se involucren en la respuesta a la infección viral. Recordemos que los picornavirus en general no tienen una envoltura lipídica y no tienen una glicoproteína de superficie. Por tanto la producción del virus no es inhibida con el compromiso de la función del cuerpo de Golgi como sería el caso con un virus envuelto (Hunt *et al* 2007).

Se desconoce la razón de esta asociación a membrana de la replicación del ARN del HRV pero se pueden concentrar varios sustratos en la vecindad de la polimerasa (recuérdese que en las bacterias, la replicación del ADN está asociada a membrana). El ARN de HRV es poliadenilado en el extremo 3', al igual que los ARNs mensajeros pero esta poliadenilación ocurre de diversas maneras. En la síntesis de ARNm de la célula huésped, la secuencia poliA no está codificada en la copia de ADN de este gen sino que es añadida por una enzima llamada polimerasa poliA usando ATP como sustrato. En el caso del ARN de HRV la secuencia de poliA en la cadena de sentido positivo es copiada a una secuencia poliU en el extremo 5' de la cadena de sentido negativo. Esto es copiado de nuevo a poliA en el extremo 3', también por la replicasa (Figura 9).

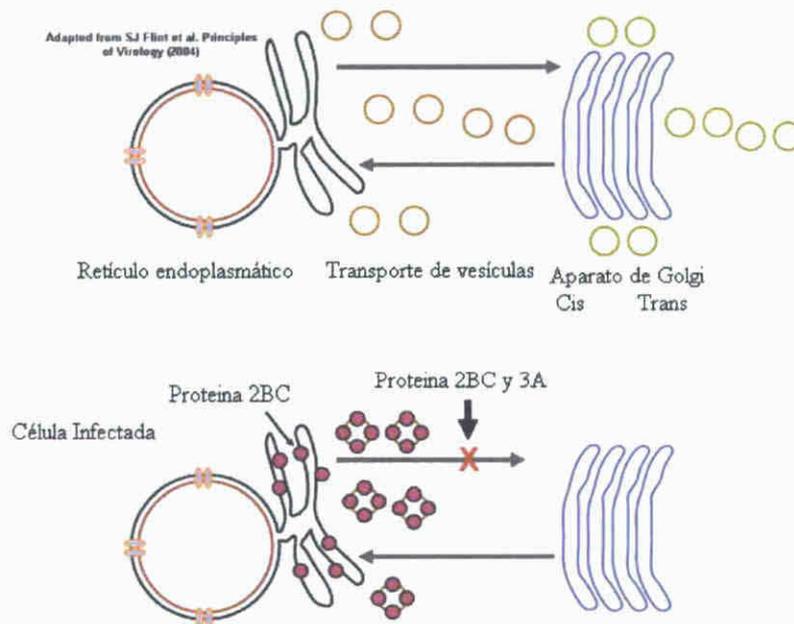


Figura 8: Evasión al Aparato de Golgi. Las proteínas de HRV no necesitan glicosilación por el Aparato de Golgi, por lo tanto las vesículas no se unen a la cara Cis. Extraído de: <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/pol32.gif>

2.3 5 Ensamblaje

Las proteínas de los HRV son policistrónicas porque solo hay un sitio interno de unión de ribosoma. Esto significa que el virus puede ser ensamblado al tiempo que las diversas proteínas son fragmentadas de la poliproteína. La poliproteína primero es dividida en tres proteínas (P1 P2 P3) (Hunt *et al* 2007)

P1 es luego dividida en tres proteínas (VP0 VP1 VP3) que son las subunidades de la envoltura viral. Esto se lleva a cabo por proteasas virus específicas que son parte de la poliproteína y son catalíticas como parte del producto primario de traducción. VP0, VP1 y VP3 se ensamblan en la subunidad estructural 5S (protómero). VP0 solo se deriva en VP2 y VP4 cuando el virus es ensamblado. Cinco de estos protómeros ensamblan en un pentámero 14S y doce pentámeros forman la procápside. El ARN es encapsulado en la procápside para formar un provirión. En esta etapa la VP0 es derivada en VP2 y VP4 y el virión está maduro, una partícula vírica infecciosa (Figura 9)

Las otras dos partes del producto primario de traducción (P2 y P3) son fragmentadas para formar un número de proteínas no estructurales. Estas incluyen la replicasa y proteínas que alteran el metabolismo de la célula huésped (Rossmann *et al* 1985)

Por último, muchas partículas de HRV se acumulan en el citoplasma y la célula muere resultando en lisis celular y liberación de nuevas partículas infecciosas.

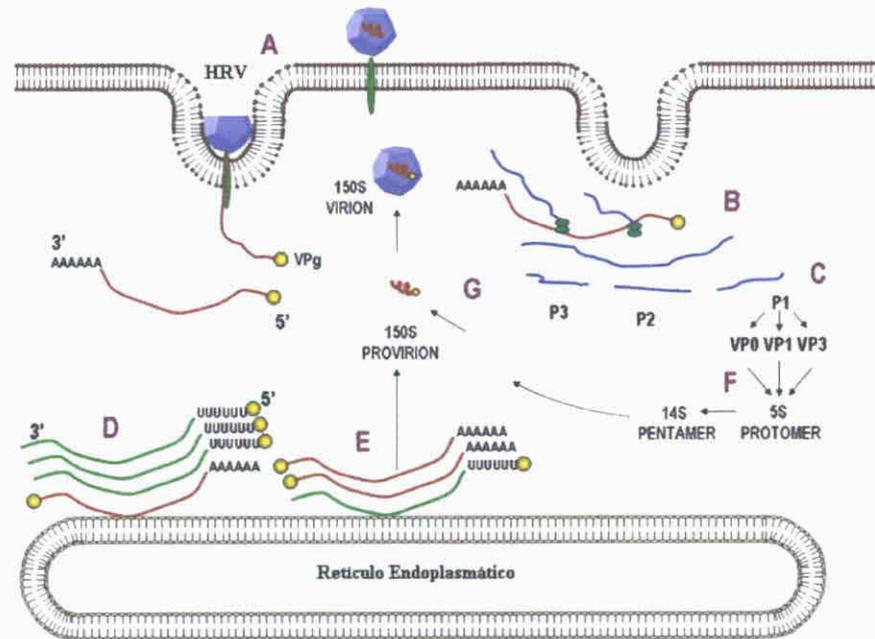


Figura 9: Replicación viral. El HRV se une al receptor en la superficie celular (A). El ARN con la VPg en el terminal 5' se traduce en un producto primario de traducción (B) que luego es segmentado (C). El ARN genómico de sentido positivo también se asocia con la polimerasa de ARN que está unida a la superficie citoplásmica de las vesículas, probablemente del retículo endoplásmico, y es copiado a un ARN de sentido negativo. VPg está también en la terminal 5' de la cadena negativa (el final poliU) (D). La cadena de sentido negativo es copiada a ARN genómico de sentido positivo (E) que se asocia con la procápside para formar un virus 150S (G) que es liberado con la lisis celular. Extraído de: <http://pathmicro.med.sc.edu/spanish-virology/spanish-chapter10-3.htm>

2.4 Patogénesis

Los síntomas de una infección por HRV son bien conocidos: descarga o congestión nasal usualmente acompañado de estornudos, fiebre y dolor de garganta (Arruda *et al.*, 1997). Los síntomas característicos ocurren de uno a cuatro días después de la infección y en esta etapa los títulos de HRV encontradas en las secreciones nasales son extremadamente altas. El virus se replica primordialmente en las células epiteliales de

la mucosa nasal no obstante no hay casi daño a la mucosa aunque las células infectadas pueden descamarse Puede haber edema del tejido conectivo

Los síntomas experimentados dependen del número de partículas víricas replicadas Las células infectadas producen una variedad de moléculas tales como la histamina que resulta en un incremento de las secreciones nasales Es la producción de este tipo de moléculas lo que dirige la destrucción celular responsable de los síntomas que sufre el paciente Estas moléculas causan cambios en la permeabilidad vascular (Hosoda *et al* 2002)

La infección primaria tiene una respuesta de IgA en secreciones nasales e IgG en la circulación sanguínea Como hipotéticamente estos virus no entran en la circulación, la respuesta de IgA de la mucosa es la más importante Esto lleva a la inmunidad y resolución de la enfermedad aunque los niveles nasales de IgA son rápidamente disminuidos Al igual que con otras infecciones virales la producción de interferón es el primer medio de defensa, precediendo a la respuesta de anticuerpos La producción de interferón puede dar cuenta de los síntomas experimentados por el paciente Muchas personas infectadas (cerca de 50%) no muestran síntomas de infección por HRV pero como quiera son capaces de transmitir la infección Aunque el tracto respiratorio inferior no es usualmente afectado puede ocurrir bronconeumonía en las infecciones por rinovirus particularmente en niños (Doyle y Alper 2007)

2 4 1 Infecciones de las vías respiratorias superiores

El resfriado es el prototipo de enfermedad relacionada con la infección por HRV y estos virus son la causa de la mitad de estas enfermedades. Aunque el resfriado es una enfermedad de resolución espontánea con escasa importancia médica, un estudio reciente (Reva *et al* 2007) ha revelado la aparición de Otitis Media Aguda en asociación con el 30% de las infecciones virales de las vías respiratorias superiores. El 8% de estas infecciones se acompañaron de Sinusitis. La otitis media y la sinusitis relacionada con la infección por HRV podrían ser debidas a una sobreinfección bacteriana, pero también existen indicios considerables de una infección directa por HRV. Se detectaron HRV mediante PCR en el líquido del oído medio en 22 (24%) de 91 pacientes con una otitis media aguda (Pitkaranta *et al* 1998). En 11 (50%) de ellos se aisló un patógeno bacteriano simultáneamente en el líquido del oído medio. De manera análoga, se detectaron HRV en cepillados sinusales de ocho (40%) de 20 adultos finlandeses con sinusitis (Pitkaranta *et al* 1997). En tres de los ocho pacientes se obtuvo un aislamiento simultáneo de un patógeno bacteriano. Estos datos son coherentes con un estudio previo en el que se detectaron anomalías frecuentes de los senos maxilares mediante tomografía computarizada durante resfriados llevado a cabo en Cincinnati, USA (Gwaltney *et al* 1994). Estos datos indican que muchas de las infecciones del oído medio y sinusales diagnosticadas como complicaciones bacterianas de una infección por HRV son en realidad directamente atribuibles a la infección viral y es posible que no precisen tratamiento antibiótico.

2 4 2 Infecciones de las vías respiratorias inferiores

El mayor cambio en el conocimiento del espectro clínico de las infecciones por HRV durante los últimos años ha consistido en el reconocimiento cada vez mayor de la función de este virus en las enfermedades de las vías respiratorias inferiores (laringe, tráquea, bronquios y los pulmones). Los HRV crecen mejor en cultivo celular a unos 33 C y durante mucho tiempo se ha citado que este crecimiento preferencial a una temperatura más baja señala la posibilidad de que los HRV no infecten las vías respiratorias inferiores. Este concepto también se vio respaldado por estudios iniciales que constataron que la infección se produjo con mayor facilidad cuando el virus se administró por medio de gotas intranasales que mediante aerosol (Couch *et al* 1996). No obstante, en estudios más recientes (Mosser *et al* 2002, Papadopoulos *et al* 1999) se ha comprobado que los HRV pueden replicarse en las vías respiratorias inferiores. La frecuencia de afectación de las vías inferiores durante la infección natural sigue siendo desconocida. Tampoco está clara la importancia de la infección de las vías respiratorias inferiores en la patogenia de la enfermedad. Los síntomas de las vías respiratorias inferiores podrían ser consecuencia de una infección directa de estas vías o ser desencadenados por la respuesta inflamatoria a los HRV en ellas.

A pesar de las dudas acerca de la patogenia, varios síndromes de vías respiratorias inferiores se han vinculado con una infección por rinovirus. Esta infección es un desencadenante importante de exacerbaciones asmáticas en los niños en edad escolar y se ha comunicado que tiene que ver con el 60%-70% de las exacerbaciones asmáticas en este grupo de edad (Johnston *et al* 1995, Rakes *et al* 1999). En asociación con el

comienzo del año escolar se ha descrito tanto una incidencia máxima de exacerbaciones asmáticas durante el otoño como el aumento de la incidencia de infección por HRV durante esta estación (Johnston *et al* 2006 Gwaltney *et al* 1984) El momento de aparición del pico asmático podría deberse a una convergencia de la diseminación de la infección por HRV entre los escolares y la exposición estacional a alérgenos (Johnston *et al* 1995 Heyman *et al* 2004) La asociación intensa entre infección por HRV y exacerbaciones asmáticas indica que la prevención o el tratamiento de estas infecciones podría ser un abordaje eficaz para prevenir dichas exacerbaciones Aunque atractiva, aun ha de probarse esta hipótesis

Las exacerbaciones agudas de la fibrosis quística también se han relacionado con diversos patógenos respiratorios virales incluidos HRV (Collinson *et al* 1996 Smyth *et al* 1995) Las exacerbaciones asociadas a infecciones por HRV fueron clínicamente semejantes a las provocadas por otros patógenos virales También hay indicios de que las infecciones respiratorias virales frecuentes conllevaran un descenso más rápido de la función respiratoria en las personas con fibrosis quística. Los HRV quizá tengan una mayor importancia en estos pacientes debido a la incidencia relativamente mayor de infección por ellos en la población

La intervención de los HRV en otros síndromes de vías respiratorias inferiores en niños inmunocompetentes está pobremente definida. En muchos estudios basados en el aislamiento de virus en cultivo celular se ha comunicado que los HRV pueden aislarse a partir de una pequeña fracción de la población de los niños ingresados en hospitales con el diagnóstico de bronquiolitis o neumonía (El Sahly *et al* 2000 McMillan *et al* 1993 Paisley *et al* 1984) Se han comunicado datos parecidos en estudios en que se han

utilizado técnicas de PCR para detectar rinovirus. En un estudio reciente los HRV fueron el único patógeno detectado en 12 (10%) de 119 niños menores de un año con bronquiolitis aguda en Grecia (Papadopoulos *et al* 2002). En un estudio similar sobre la bronquiolitis en niños menores de 3 años en Francia (Jacques *et al* 2006) se identificaron HRV en el 21% de los pacientes aunque tan sólo en dos (2%) de 192 como único patógeno aislado. También se han detectado HRV en las vías respiratorias superiores de pacientes con neumonía. Hace poco se ha publicado que en 58 (24%) de 254 niños con neumonía se detectaron HRV en las vías respiratorias superiores por medio de PCR en un estudio realizado en Finlandia (Juven *et al* 2000). Treinta (52%) de ellos tuvieron datos de una infección bacteriana coexistente. Otras investigaciones comunicaron que al 27% de los neonatos pequeños ingresados en los hospitales de USA estaban infectados por HRV se les ingresó por bronquiolitis o neumonía (Miller *et al* 2007). Estos datos ponen de relieve una asociación entre HRV y enfermedad de las vías respiratorias inferiores en los niños inmunocompetentes aunque la frecuencia de la infección por estos virus en la población general dificulta la evaluación de una función etiológica de los HRV en la enfermedad de las vías respiratorias inferiores. Parece probable que los HRV causen enfermedad de las vías respiratorias inferiores en algunos niños pero que estos síndromes representen una fracción muy pequeña de todas las infecciones por rinovirus. Existe un número limitado de estudios en los que se hayan evaluado las consecuencias de las infecciones por HRV en huéspedes inmunodeprimidos. Se han aislado HRV de las vías respiratorias inferiores de un pequeño número de pacientes inmunodeprimidos (Ghosh *et al* 1999 Ison *et al* 2003). La importancia de estas cepas aisladas se ha puesto en duda dada la prevalencia de HRV la posibilidad de

contaminación de las muestras de vías respiratorias inferiores por secreciones respiratorias superiores durante su obtención y el hecho de que la mayoría de las cepas aisladas de HRV se acompañaron del aislamiento simultáneo de patógenos más habituales de las vías respiratorias inferiores. No obstante, un estudio reciente (Kaiser *et al* 2006) ha aportado pruebas definitivas de una infección activa y persistente de las vías respiratorias inferiores en pacientes que han recibido un trasplante de pulmón. Esta observación se suma al conjunto cada vez mayor de pruebas de que los HRV infectan realmente las vías respiratorias inferiores y es coherente con la conclusión de que los HRV son una causa real aunque infrecuente de enfermedad de las vías respiratorias inferiores en esta población de pacientes.

2.4.3 Infección por HRV y enfermedad sistémica

La replicación de los HRV se encuentra limitada a las vías respiratorias y rara vez se han descrito datos de una enfermedad invasora. Sin embargo, en un estudio reciente (Xatzipsalti *et al* 2005) se ha descrito la detección de ARN de HRV en el plasma de 10 (11%) de 88 niños con infecciones por rinovirus. La detección de HRV en el plasma fue más probable en caso de asma subyacente. Los pacientes con exacerbaciones asmáticas asociadas a detección de virus en el plasma presentaron enfermedades más intensas que aquellos con exacerbaciones pero sin detección de virus. La detección de ARN de HRV en el plasma no se acompañó de signos de enfermedad sistémica y no está claro que esta observación refleje una infección sistémica real por el virus.

La enfermedad sistémica también es infrecuente en los sujetos con infección por rinovirus. Las mialgias y la fiebre son infrecuentes en los adultos infectados experimentalmente por rinovirus aunque se ha descrito fiebre en neonatos pequeños con una infección por rinovirus. Otros estudios han publicado ultimamente un trabajo sobre la detección de HRV en niños pequeños ingresados en hospitales de USA en los cuales además de los síndromes respiratorios esperados a estos niños se les ingresó con diagnósticos de vómitos, diarrea, sepsis y convulsiones febriles (Miller *et al* 2007). Ya se han comunicado resultados semejantes en otros estudios (El Sahly *et al* 2000, McMillan *et al* 1993) en que se utilizó aislamiento en cultivo celular para la detección del virus.

2.5 Epidemiología de las infecciones por Rinovirus

La epidemiología de las infecciones por HRV se describió inicialmente hace varios decenios en una serie de estudios basados en el aislamiento en cultivo celular para la detección de virus. En estos estudios se definió que el otoño y la primavera representaban los picos estacionales de la infección por HRV (Gwaltney *et al* 1966). En un estudio longitudinal reciente que supuso la obtención semanal de muestras de un pequeño grupo de niños durante un período de 3 años se ha confirmado esta epidemiología estacional aunque también ha revelado una incidencia considerable de esta infección en los meses de verano e invierno (Winther *et al* 2006).

La incidencia de infecciones por HRV no se ha estudiado de manera sistemática por medio de métodos de PCR para detección de virus. En dos estudios (Blomqvist *et al* 2002, Van Bensten *et al* 2003) se ha evaluado la incidencia de infección durante enfermedades respiratorias y en visitas intermitentes con fines de asistencia habitual durante los dos primeros años de vida. En estos estudios se comunicó que la incidencia de infección en este grupo de edad fue de 0.7-0.8 infecciones por persona y año. Un trabajo semejante pero más reciente (Kusel *et al* 2006) en neonatos (menores de un año) reveló una incidencia de dos infecciones por neonato y año. De manera sorprendente, estos resultados son parecidos a cálculos de incidencia previos determinados por el aislamiento de virus en cultivo celular. En cambio, otro estudio (Winther *et al* 2006) describió una incidencia media de seis infecciones por picornavirus (que engloban a HRV y enterovirus) por niño al año en una pequeña cohorte de niños de entre 3 meses y 15 años de edad. Es evidente que las infecciones por HRV son frecuentes a todas las edades; si bien, para obtener unos cálculos exactos de la incidencia específica por edades se precisan estudios sistemáticos en que se utilicen análisis diagnósticos sensibles.

El uso generalizado de la PCR para detectar HRV ha revelado una incidencia sorprendentemente alta de infecciones asintomáticas. Varios estudios han puesto de manifiesto que entre el 12%-22% de las muestras procedentes de sujetos asintomáticos fueron positivas para HRV (Van Bensten *et al* 2003, Johnston *et al* 1993, Nokso-Koivisto *et al* 2002, Wright *et al* 2007). En un estudio longitudinal de la infección por HRV se comunicó que una proporción semejante (20%) de todas las infecciones por HRV detectadas por PCR fueron asintomáticas (Winther *et al* 2006). Estas observaciones en el entorno natural son coherentes con las obtenidas en el modelo de provocación.

experimental de la infección en el que el 20%-30% de los voluntarios infectados se mantienen asintomáticos. La detección frecuente de HRV en personas asintomáticas podría representar una diseminación prolongada del ARN viral en el entorno de una enfermedad sintomática. Aparentemente el ARN viral es detectable en las secreciones nasales durante 2-3 semanas antes de la enfermedad y 4-5 semanas después de la infección (Winther *et al* 2006, Jarth *et al* 2004). Aunque la diseminación prolongada tras la enfermedad es coherente con los estudios precedentes basados en el aislamiento de virus, la observación de un periodo de incubación prolongado está en desacuerdo con el periodo de incubación bien determinado de 2-3 días para la enfermedad provocada en las condiciones cuidadosamente controladas del modelo experimental. Por tanto, sigue sin estar clara la importancia de los virus detectados en las secreciones nasales semanas antes del inicio de la enfermedad. Las técnicas nuevas que permiten identificar serotipos específicos de virus por medio de métodos de PCR podrían revelar si esto representa infecciones secuenciales por diferentes HRV o si en realidad existe un periodo de incubación prolongado en algunos sujetos.

2.6 Especies/Serotipos de HRV y sus síndromes clínicos

Como se mencionó anteriormente, los HRV tienen una alta diversidad genética, existen más de 100 serotipos diferentes, todos agrupados dentro de tres especies: HRV A, HRV B y el recientemente reconocido HRV C (también llamada HRV A2) que ha sido rápidamente identificado a nivel mundial (Simmonds *et al* 2010). Originalmente las especies A y B han sido clasificadas en 75 y 25 serotipos distintos respectivamente por

métodos de neutralización (Hamprarian *et al* 1987 Kapikian *et al* 1967 1971) Sin embargo la dificultad de crecimiento del HRV C en cultivo celulares ha llevado a Simmonds y colaboradores a proponer una clasificación basada en >10% de divergencia genética en base al gen VP4 y fragmento del gen VP2 la cual resultó en 28 prototipos diferentes (Simmonds *et al* 2010)

Estudios moleculares detectaron las especies de HRV A B y C en 14% 1 8% y 6 8% respectivamente en niños menores de 10 años con IRA en el Reino Unido además encontraron dos nuevos serotipos de HRV A NS1 el cual presenta un prototipo cercano a HRV A46 pero con una divergencia de 17 6% y NS2 con un prototipo similar a HRV A77 y divergencia del 14% (Wisdom *et al* 2009)

Se han realizado numerosos estudios para encontrar cual de las especies tiene mayor importancia clínica, en Brasil se ha encontrado una incidencia de 27 4% de HRV en pacientes con IRA de las cuales 60 7% correspondió a HRV A mostrando una alta predominancia con respecto al 17 2% de HRV B y 22 1% de HRV C (Watanabe *et al* 2010) otro estudio realizado en China mostró una predominancia de HRV A (51 52%) y HRV C (38 38%) sobre HRV B (10 10%) (Xiang *et al* 2010) otro estudio con resultado diferente a los anteriores dio mayor importancia al HRV C en las IRA encontrando una alta predominancia de HRV C (58%) con respecto a HRV A (33%) y HRV B (9%) en parientes pediátricos hospitalizados (Linsuwanon *et al* 2009)

En cuanto a los síndromes clínicos las especies HRV A y HRV C parecen estar asociadas principalmente con infecciones respiratorias agudas y asma inducida por virus

mientras que la HRV B ha sido detectado en un numero relativamente pequeño de pacientes con IRA (Linsuwanon *et al* 2009 Smuts *et al* 2011) En particular la especie HRV C pueden ser detectados en la mayoría de los países y pueden estar asociados con diversas infecciones respiratorias agudas incluyendo la infección del tracto respiratorio superior bronquitis bronquiolitis y la neumonía sibilante todo esto a pesar que su epidemiología no se conoce con exactitud (Smuts *et al* 2011 Watanabe *et al* 2010) La importancia de HRV C en la enfermedad respiratoria todavía no está muy clara, ya que su prevalencia en la población y la parte clínica no se han investigado en detalle pero la reciente detección de HRV C en niños hospitalizados ha llevado a la sugerencia de que esta especie puede ser la más patógena de todas (Miller *et al* 2009)

HRV A y HRV C tienen la mayor diversidad genética (Mizuta *et al* 2010 Wisdom *et al* 2009) Estudios japoneses demostraron que HRV A de cepas aisladas mostraron >30% de divergencia sobre la base de secuencias que codifican una región del gen VP4/VP2 y se clasificaron en muchos de estos grupos mediante el análisis filogenético (Mizuta *et al* 2010) Se ha sugerido recientemente que HRV tienen una diversidad genética única entre los virus respiratorios (McIntyre *et al* 2010 Simmonds *et al* 2010)

Algunos estudios no muestran ninguna diferencia en los resultados clínicos entre las especies HRV (Lau *et al* 2007 Piotrowska *et al* 2009) mientras que otros proporcionan alta relevancia de HRV C en las IRAs sibilancias fiebre en los bebés y los niños y las exacerbaciones de asma en niños mayores (Lau *et al* 2007 Khetsuriani *et al* 2008 Miller *et al* 2009 Wisdom *et al* 2009) Investigaciones posteriores revelaron

una prolongación en los síntomas de asma y tos en niños infectados por HRV C (Arden *et al* 2010)

2.7 Tratamiento

No hay un tratamiento específico para la infección por HRV. Se recomienda la rehidratación y manutención de la permeabilidad de las vías aéreas. Los médicos usualmente prescriben aspirina para el alivio de síntomas febriles (Hsia *et al* 1989) pero esto puede exacerbar la proliferación viral si se disminuye la temperatura corporal puesto que como se mencionó anteriormente el virus es particularmente sensible a la temperatura (Tyrrell y Channock 1963). Los aerosoles de interferón nasal tienen muy poco efecto. El Pleconaril es ampliamente activo contra los HRV (Hayden *et al* 2003). La mejor manera de evitar la diseminación del virus es interrumpiendo la cadena de infección con el lavado de manos.

3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Existe una alta biodiversidad genética de HRV aislados de niños hospitalizados menores de 5 años con infección respiratoria aguda en Panamá

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer la biodiversidad genética de Rinovirus humano en niños hospitalizados menores de 5 años con infección respiratoria aguda en Panamá, que circularon durante los años 2010 y 2011

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Estudiar la epidemiología molecular de HRV en Panamá

Implementar técnicas de análisis molecular y bioinformáticas para el análisis de HRV y otros virus respiratorios

Comparar la diversidad encontrada de HRV en relación con otras regiones del mundo

Utilizar la información adquirida para planificar estrategias de diagnóstico prevención y control de estas enfermedades

5 METODOLOGÍA

5.1 Tipo de Investigación Observacional

5.2 Diseño Retrospectivo Descriptivo

5.3 Universo

Muestras positivas por HRV recolectadas entre junio 2010 y agosto 2011. Son muestras de Hisopados Nasofaríngeos (HNF) pertenecientes a pacientes que presentaron una infección respiratoria aguda, las cuales fueron enviadas al Departamento de Investigaciones en Virología y Biotecnología del ICGES en cadena de frío (aproximadamente 4 °C) sin congelación como parte del Sistema de Vigilancia Nacional para Influenza y otros virus respiratorios, este Sistema de Vigilancia está conformado por 18 sitios centinelas distribuidos a lo largo del territorio nacional. Los HNF se procesaron (almacenamiento de alícuota a 80°C para investigación) y analizaron para detectar el agente causal viral mediante los estándares de bioseguridad del laboratorio nivel 2.

5.4 Tamaño de la Muestra

Sesenta y dos de 118 hisopados nasofaríngeos positivos por HRV mediante qRT-PCR fueron analizadas. Cabe destacar que representan el 28% de las IRAs virales colectadas entre Agosto 2010 (*n*: 178) a Junio 2011 (*n*: 242). Las muestras seleccionadas son provenientes de distintas regiones del país. (Cuadro I)

Región	No. de Muestras
Coclé	1
Chiriquí	2
Colón	3
Darién	5
Herrera	2
Los Santos	2
Panamá Este	7
Panamá Metro	23
Panamá Oeste	3
San Miguelito	8
Veraguas	4
Ngobe Bugle	1
Kuna Yala	1
Total	62

Fuente: BDVE – ICGES / Epidemiología MINSA

Cuadro I: Cantidad de muestras seleccionadas por región de salud. Se obtuvieron muestras de las diferentes regiones de salud buscando una representatividad de todo el territorio nacional.

5.5 Criterios de Inclusión:

- Muestras clínicas positivas por HRV tomadas a niños menores de 5 años hospitalizados con IRA, obtenidas por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica Nacional.
- Las muestras fueron almacenadas a una temperatura constante de -70°C a -80°C y mantuvieron su viabilidad, es decir que no debieron ser descongelados más de 1 vez para otros análisis.

5.6 Criterios de Exclusión:

- Muestras clínicas de pacientes sin cuadro clínico respiratorio.
- Muestras clínicas de pacientes ambulatorios.
- Muestras clínicas de pacientes con 6 años o más.
- Muestras clínicas negativas a HRV.
- Muestras mal preservadas.

5.7 Instrumento de recolección de la información:

La información clínica-epidemiológica del paciente se obtiene del Sistema Nacional de Vigilancia de la Influenza- Síndrome Gripal, Infecciones Respiratorias Agudas Graves- Bronconeumonías-Neumonías Virales y Bacterianas-Bronquiolitis. ICGES-MINSA donde no se comprometa la confidencialidad.

Aprobación del CNBI N°084/CBI/ICGES/12

5.8 Extracción de ARN

La extracción del ARN viral se realizó utilizando el kit QIAamp Viral mini kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) (Figura 10), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

El producto es almacenado a -80°C para evitar su degradación hasta su posterior uso.



Figura 10: Extracción de ARN viral utilizando el kit QIAgen. Columnas con membrana de sílica que permiten el aislamiento y la purificación de ARN viral procedente de muestras biológicas.

5.9 RT-PCR semi-anidada

Amplificación de 542 pb pertenecientes al gen VP4 y fragmento VP2 (figura 11) mediante RT-PCR semi-anidada utilizando un cebador anti-sentido (Savolainen *et al.*, 2002) y cebadores sentido externo y semi-anidado diseñados por Xiaoyan Lu y Erdman Dean en el CDC (data no publicada). La síntesis de cDNA y la RT-PCR se realizó utilizando el kit QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), y para la PCR semi anidada se utilizó Taq PCR Master Mix Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

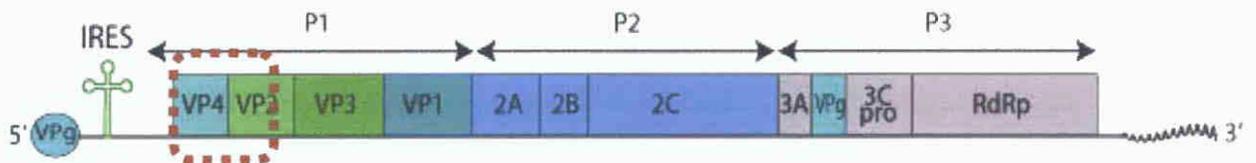


Figura 11: Región VP4/VP2 del genoma de HRV. Amplificación de la región VP4/VP2 parcial utilizada para conocer la divergencia entre las cepas de HRV.

5 10 Secuenciación

Los productos de la semi nested VP4/VP2 son evidenciados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (Promega Corporation Madison WI 53711 USA) el fragmento amplificado se purifica mediante kit Wizard® SV Gel y PCR System Clean Up (Promega Corporation Madison WI 53711 USA) para posteriormente secuenciarlo en ambas direcciones utilizando los mismos cebadores empleados de la PCR con el kit comercial ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y usando el 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems Foster City CA USA)

5 11 Análisis de Secuencias

La relación entre las cepas secuenciadas y las de referencia del GenBank se realizaron mediante el uso del software especializados para el análisis y alineamientos de las secuencias como Sequencher (Gene Codes Corp Ann Arbor USA) y BioEdit (Hall 1999) Los árboles filogenéticos se elaboraron por el método de Neighbor Joining con Máxima Verosimilitud como el modelo de sustitución de nucleótidos utilizando el software PhyML (Guindon *et al* 2010) Los valores bootstrap se determinaron con 2000 réplicas de los conjuntos de datos Cincuenta y tres secuencias VP4/VP2 de HRV publicadas se obtuvieron de la base de datos GenBank database (NCBI) para acomodar y conocer la variabilidad dentro de los datos obtenidos en el estudio

6 RESULTADOS

Al igual que en otros países en Panamá HRV ha ganado importancia clínica epidemiológica debido a la cantidad de casos reportados. Según datos del Sistema de Vigilancia Nacional para Influenza y otros virus respiratorios para el año 2011 la incidencia de HRV fue del 35.2% en toda la población sólo por debajo de la infección por Virus Respiratorio Sincitial (RSV) la cual obtuvo una incidencia del 41.3% (figura 1). De los casos positivos por HRV el 75.5% perteneció a la población infantil <5 años siendo la más vulnerable cabe resaltar que 60% de estos pacientes requirió hospitalización (ICGES *et al* 2012).

Con el fin de amplificar un fragmento de 542pb del gen VP2/VP4 se utilizó una RT-PCR semi anidada utilizando un cebador anti sentido (Savolainen *et al* 2002) y cebadores sentido externo y semi anidado diseñados por Xiaoyan Lu y Erdman Dean en el CDC (data no publicada) según fue descrito en la metodología acápite 5.9. Una vez amplificados los productos de la semi nested VP4/VP2 son evidenciados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (Promega Corporation Madison WI 53711 USA) (Figura 12).

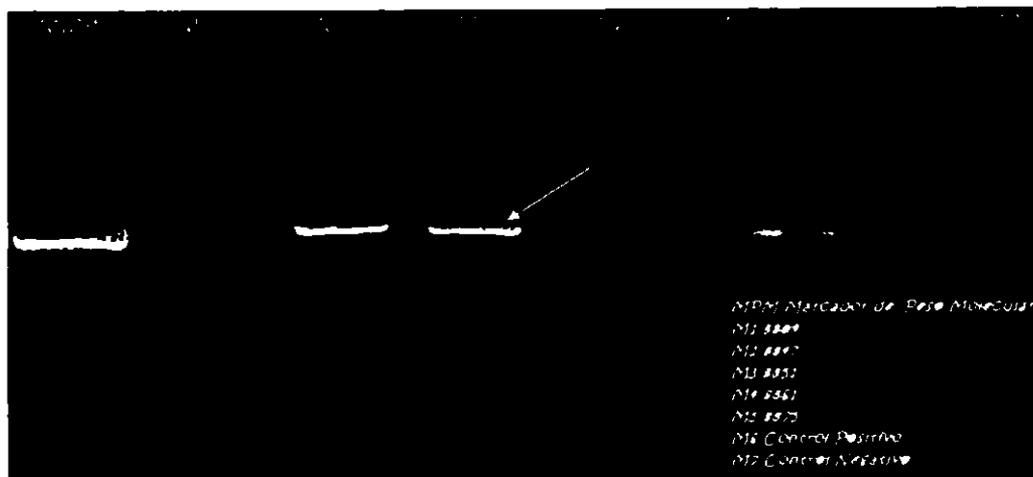


Figura 12 Electroforesis de productos de 542pb amplificados en un gel de agarosa al 1.5%. Mediante un foto documentador y utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb podemos evidenciar la banda de ADN esperada

El fragmento amplificado se purificó mediante kit Wizard® SV Gel y PCR System Clean Up (Promega Corporation Madison WI 53711 USA) y posteriormente se secuenció en ambas direcciones utilizando los mismos cebadores empleados de la PCR con el kit comercial ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y usando el 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems Foster City CA USA)

El análisis de los datos obtenidos por secuenciación reveló la presencia de las tres especies en la población estudiada, con las siguientes frecuencias HRV A (60% n = 37) HRV C (32% n = 20) y HRV B (8% n = 5) (figura 13)



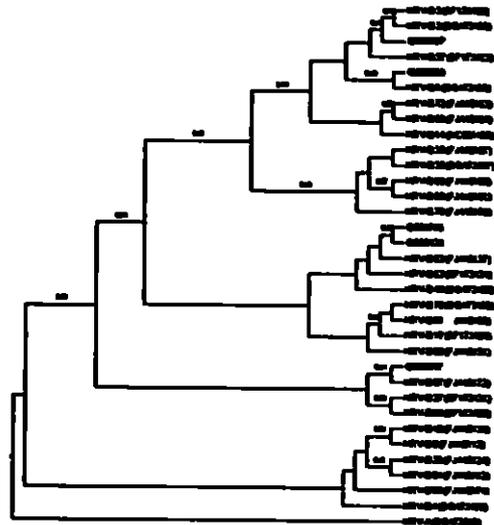
Figura 13 Análisis filogenético del gen VP4/VP2 de los 62 HRV estudiados y cepas de referencia para cada especie obtenidas del GenBank database (NCBI) Se construyeron árboles filogenéticos por Máxima Verosimilitud mediante el uso de PhyML. El modelo de sustitución de nucleótidos fue HKY + I + G los soportes aLRT se muestran por encima de los nodos. Las secuencias de referencias de cada especie utilizadas para agrupar las muestras estudiadas aparecen con su número de accesión entre paréntesis. Los números de accesión asignados a las muestras panameñas en el GenBank van de JN797533 a JN797594.

La misma región de VP4/VP2 de cada muestra positiva amplificada y secuenciada y se utilizó para identificar los serotipos dentro de cada especie. Para hacer esto se elaboraron árboles filogenéticos comparando las secuencias publicadas que pertenecen a todos los serotipos de HRV A HRV B y también de las variantes de especies HRV C recientemente descritos (Figura 14)

Especie A



Especie B



Especie C



Figura 14 ver leyenda en la siguiente página

Especie y Serotipo	No de muestras identificadas
<i>Especie A</i>	
A12	4
A57	1
A24	5
A71	4
A58	1
A9	1
A40	4
A96	2
NS1	4
NS2	3
A60	1
A32	2
A77	1
A59	1
A20	1
No tipificable (308639)	1
No tipificable (308868)	1
<i>Especie B</i>	
B3	1
B6	1
B52	2
B97	1
<i>Especie C</i>	
Pat8	2
Pat11	1
Pat24	1
Pat9	1
Pat7	2
Pat22	1
Pat18	1
Pat3	1
Pat19	2
Pat25	1
Pat15	1
No tipificable (308526)	1
No tipificable (308759)	1
No tipificable (308709)	1
No tipificable (308595)	1
No tipificable (308623)	1
No tipificable (308248)	1
Total	62

Cuadro II ver leyenda en la siguiente página

(Ver cuadro en página previa)

Cuadro II Total de muestras analizadas e identificadas en base a las distintas especies y serotipos de HRV. Nótese que 2/37 y 6/20 muestras de las especies A y C respectivamente no son asignadas a serotipos descritos anteriormente se identificaron como serotipos no tipificable potencialmente serotipos nuevos

7 DISCUSIÓN

En los últimos años los HRV han ganado gran reconocimiento como patógenos clínicamente relevantes no sólo como causantes de infecciones respiratorias leves sino también se han visto asociados con episodios recurrentes de broncoespasmo asma y enfermedad respiratoria severa inferior (Jackson *et al* 2008 Juven *et al* 2000 Lemanske *et al* 2005)

Por muchos años en nuestro país las infecciones por HRV pasaron desapercibidas al no contar con una prueba de laboratorio capaz de detectar la infección causada por el virus. La implementación de pruebas moleculares ha permitido conocer el comportamiento del virus en nuestra población y además ha impulsado el desarrollo de nuevos hallazgos mediante investigaciones de este tipo.

La evidencia de circulación de las tres especies de HRV reportadas anteriormente HRV A HRV B y HRV C demuestra que nuestros resultados son similares a los obtenidos en estudios anteriores (Wisdom *et al* 2009 Watanabe *et al* 2010 Xiang *et al* 2010). En cuanto a la distribución de las especies nuestros resultados poco difieren a los obtenidos por Watanabe y col en Brasil donde el HRV A muestra una alta predominancia sobre el resto de las especies.

De 37 muestras de HRV A 35 fueron asignados a los serotipos reportados previamente incluyendo 7 muestras con los nuevos serotipos de HRV A recientemente asignados postulados como NS1 y NS2 (Wisdom *et al* 2009) Dos muestras (308639 y 308868) no se lograron asignar correctamente a los serotipos definidos en la actualidad La secuencia 308639 muestra una p-distance >10% con respecto a todos los serotipos de HRV A a excepción de los serotipos 29 y 44 (Figura 15) Debido a esto y siguiendo el criterio postulado para HRV C (> 10% de la divergencia entre los tipos) (Simmonds *et al* 2010) esta cepa no debe asignarse a un nuevo serotipo De manera similar la secuencia 308868 muestra un p-distancia mayor de 10% con respecto a otros serotipos Por lo tanto siguiendo el mismo criterio esta cepa podría ser asignada provisionalmente a un nuevo serotipo

Cinco muestras identificadas como HRV B se agruparon en cuatro serotipos de HRV B reportados anteriormente (Figura 12) Podemos confirmar y en base a anteriores estudios realizados en Brasil Reino Unido y China que HRV B es la menos patógena de todas (Wisdom *et al* 2009 Watanabe *et al* 2010 Xiang *et al* 2010)

Las variantes en especies de HRV C no están asignadas a los serotipos Sin embargo se han realizado algunos intentos para asignar tipos con nombres temporales basados en la posición del árbol (Wisdom *et al* 2009) y más recientemente una propuesta para la designación de HRV C tipos provisionales 1-28 se ha publicado basándose únicamente en las secuencias de VP4/VP2 (Simmonds *et al* 2010) Después de la última

clasificación las 28 secuencias publicadas se utilizaron para construir un árbol filogenético con las 20 muestras de HRV C identificados en este trabajo. Catorce secuencias fueron asignadas a tipos reportados anteriormente, sin embargo, seis muestras (308526, 308759, 308769, 308595, 308623 y 308248) podrían no ser asignados a cualquiera de los 28 tipos provisionales. Estas muestras mostraron un porcentaje de p-distancia mayor que 10% con respecto a los 28 tipos HRV C. Por lo tanto, siguiendo el criterio propuesto por Simmonds (Simmonds *et al.* 2010) (> 10% de divergencia en VP1-VP4 región entre diferentes tipos) las cepas sin tipo podrían ser asignado a nuevos tipos.

Las cepas de la HRV C analizadas mostraron una diversidad genética importante, un hecho que se apoya en un análisis de la entropía de Shannon realizado con las secuencias de la figura 13, que muestra valores entre 0.6 y 1 para la mayoría de los sitios analizados.

Una marcada diversidad genética en HRV A y HRV C sobre especies HRV B se ha demostrado en este estudio. Las especies de HRV B son las más homogéneas, mostrando una p-distancia entre especies de 0.19, seguido por HRV A con 0.20. El más heterogéneo era la especie C con un p-distancia de 0.25.

La aparición de serotipos no tipificados de HRV en este estudio representa un desafío para los investigadores en desarrollar las herramientas necesarias para establecer clasificaciones fiables.

8 CONCLUSIONES

Este es el primer estudio sobre epidemiología molecular en Panamá de los HRV el cual nos ha permitido conocer que especies y serotipos son los implicados en estas infecciones. Nuestros datos muestran la alta predominancia de HRV A y HRV C en una muestra poblacional de niños menores de 5 años de edad, que presentaron una IRA la cual requirió hospitalización.

Se evidencia la alta biodiversidad genética de HRV en nuestro país. Se pudo observar como las especies A y C muestran un alto grado de divergencia y predominancia con respecto a la especie B. Además se pudo detectar la circulación en nuestro país de la especie C, una especie recientemente descrita, y de nuevos serotipos de la especie A reportados durante el año 2009 en el Reino Unido.

El desarrollo y uso generalizado de técnicas moleculares para detectar HRV ha tenido una repercusión considerable en el conocimiento de la epidemiología y las manifestaciones clínicas de este patógeno. No obstante, la frecuencia con que se detectan HRV en niños sintomáticos y asintomáticos por medio de estas técnicas obliga a adoptar una actitud prudente a la hora de asignar una función etiológica a los HRV en síndromes.

clínicos nuevos o inusuales. Un conocimiento claro de la función de los HRV en estos síndromes diversos será esencial a medida que se disponga de intervenciones nuevas contra la infección por HRV.

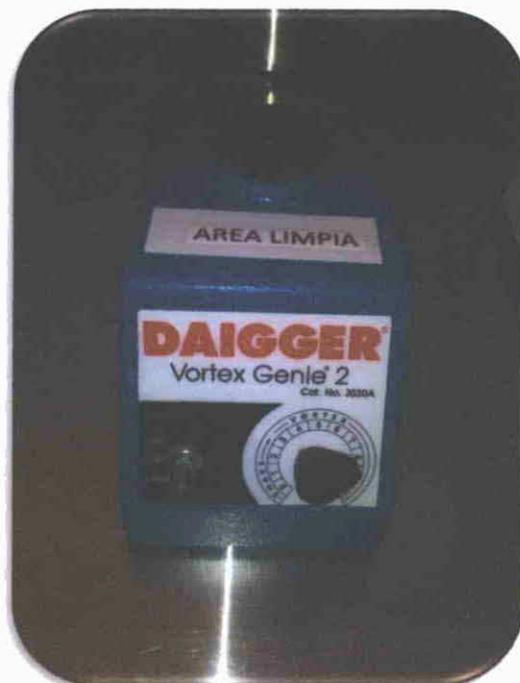
Nuevos hallazgos de investigaciones clínicas indican que las infecciones de la HRV son una de las causas más comunes de IRA en niños. Los datos de este trabajo establecen una base para la realización de nuevos estudios con sujetos de todas las edades hospitalizados y ambulatorios orientados a dilucidar las relaciones entre las especies de HRV, el perfil epidemiológico observado y las características genéticas de cada especie.

9. ANEXOS

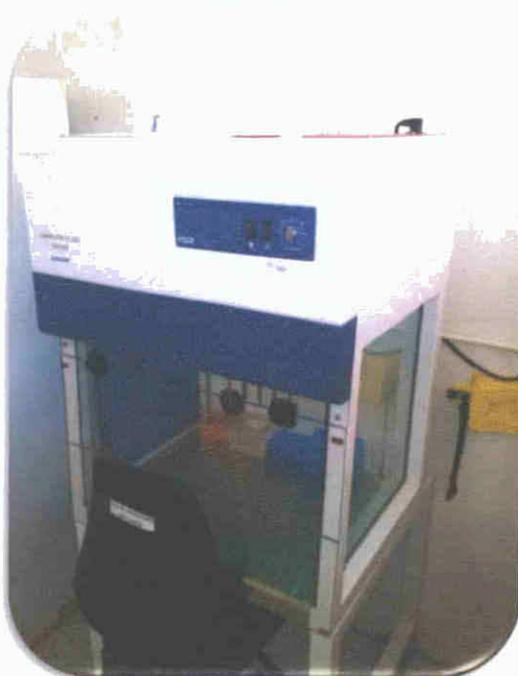
9.1 Equipos Utilizados



Centrifugas



Vortex



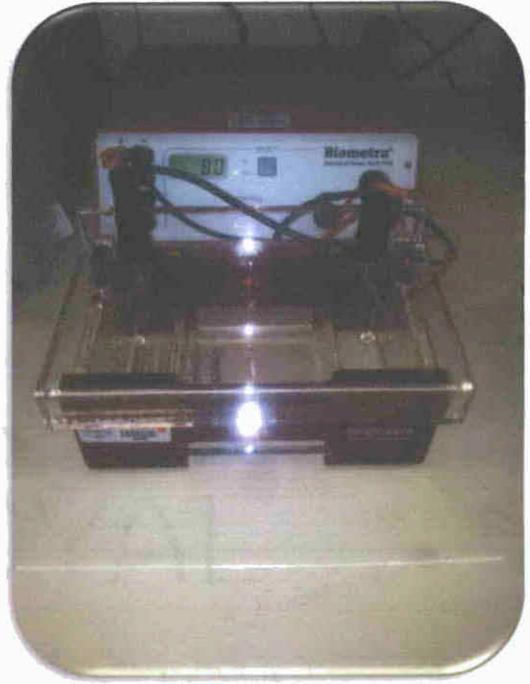
Cámara de PCR



Congelador -80°C



Termociclador



Cámara de Electroforesis

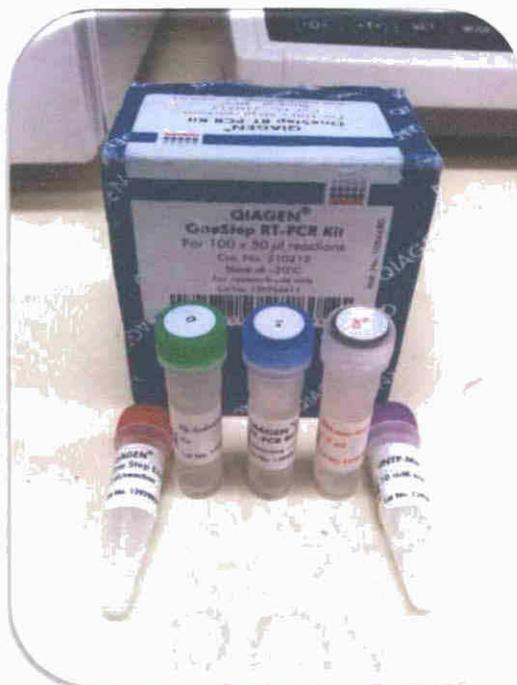


Fotodocumentador



Secuenciador 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)

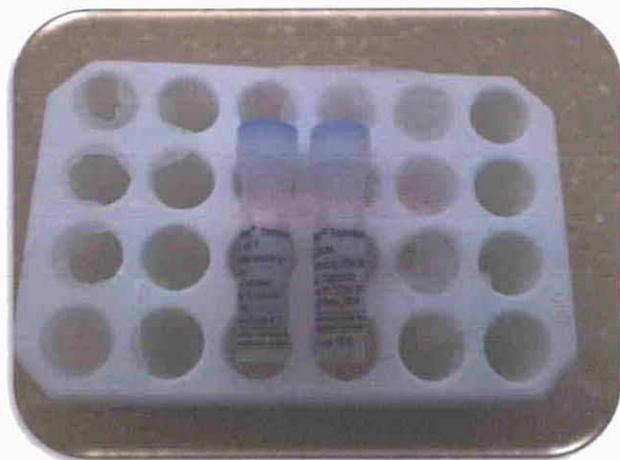
9.2 Reactivos Utilizados:



Reactivo de Amplificación QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)

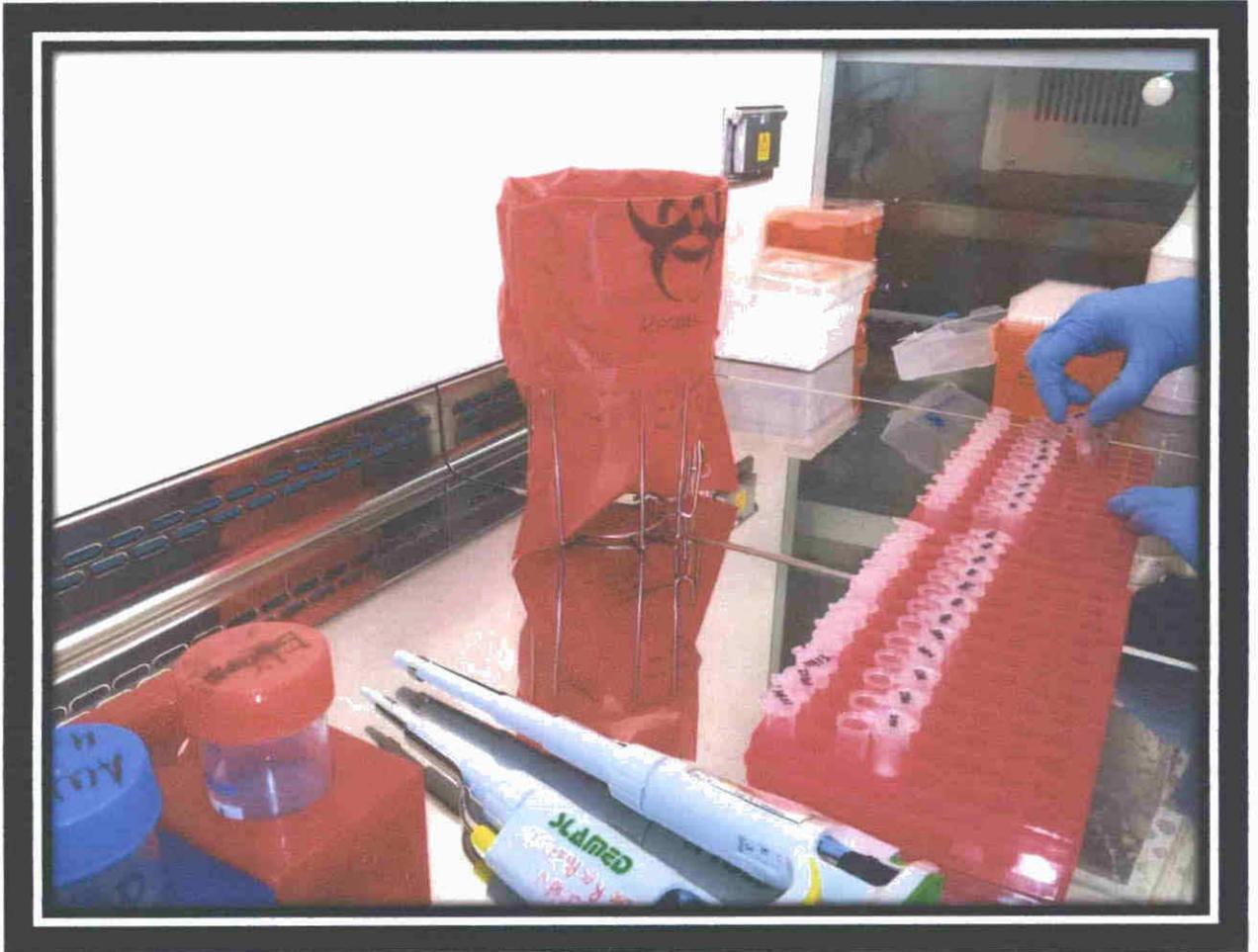


Kit de extracción de ARN QIAamp Viral mini kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany)

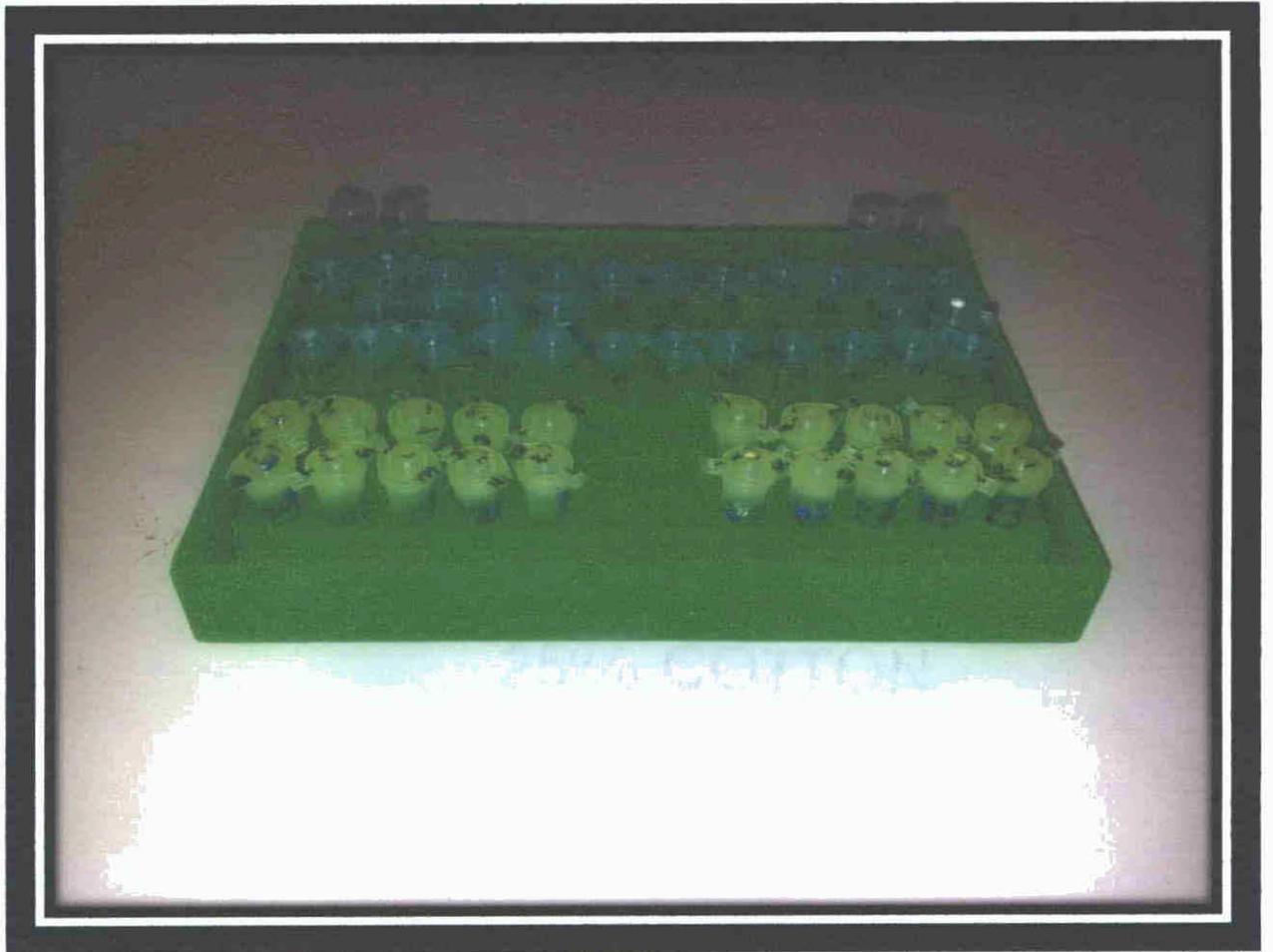


Kit de Secuenciación Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

9.3 Procedimientos:



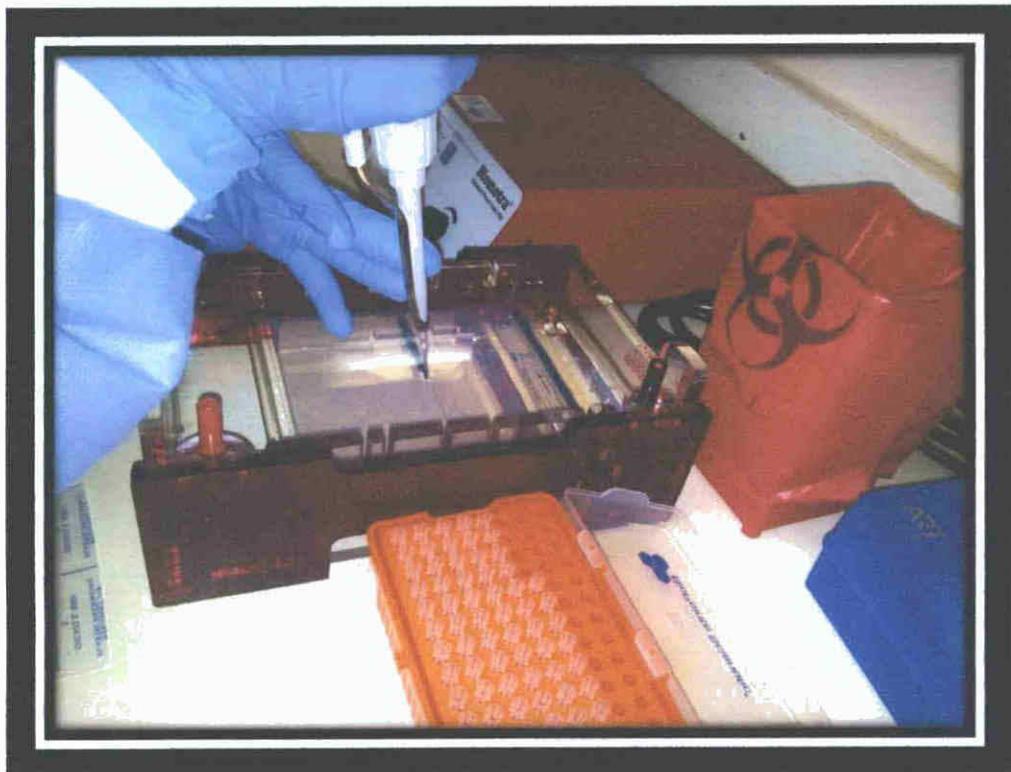
Extracción de ARN viral utilizando el kit QIAgen viral mini kit



Muestras Amplificadas por RT-PCR y Seminested



Preparación del gel de agarosa al 1.5%



Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (montaje de muestras)



Secuenciamiento de muestras amplificadas en el 3130XL Genetic Analyzer

9.4 Publicaciones:

9.4.1 Carteles:



9.4.2 Publicación en Revista Indexada

Franco et al. *Virology Journal* 2012, **9**:257
<http://www.virologyj.com/content/9/1/257>



VIROLOGY JOURNAL

SHORT REPORT

Open Access

High genetic diversity and predominance of Rhinovirus A and C from Panamanian hospitalized children under five years with respiratory infections

Danilo Franco¹, Adriana Delfraro², Leyda Abrego¹, María Cano¹, Celedonio Castillo¹, Marlene Castillo¹, Juan Castillo¹, Juan Pascale^{1,3} and Juan Arbiza^{1,2*}

En octubre del 2012 la revista *Virology Journal* aceptó el estudio para ser publicado en noviembre del mismo año.

10 BIBLIOGRAFÍA

Arden KE Mackay IM Newly identified human rhinoviruses molecular methods heat up the cold viruses *Rev Med Virol* 2010 20 156–176

Arruda E Pitkäranta A Witek TJ Doyle CA Jr Hayden FG Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn *J Clin Microbiol* 1997 352 864 2868

Blomqvist S Roivainen M Puhakka T et al Virological and serological analysis of rhinovirus infections during the first two years old life in a cohort of children *J Med Virol* 2002 66 263 268

Collinson J Nicholson KG Cancio E et al Effects of upper respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis *Thorax* 1996 51 1115 1122

Couch RB Cate TR, Douglas RG Jr et al Effect of route of inoculation on experimental respiratory viral disease in volunteers and evidence for airborne transmission *Bacteriol Rev* 1996 30 517 529

Craighead JE Meier M Cooley MH Pulmonary infection due to rhinovirus type 13 *N Engl J Med* 1969 18 1403 1404

Denny JR Clinical impact of human respiratory virus infections *Am J Respir Crit Care Med* 1995 152 4S 12S

Doyle WJ and Alper CM Use of diagnostic algorithms and new technologies to study the incidence and prevalence of viral upper respiratory tract infections and their

- complications in high risk populations *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007 7 11
16
- El Sahly HM Atmar RL Glezen WP Greenberg SB Spectrum of clinical illness in hospitalized patients with common cold virus infections *Clin Infect Dis* 2000 31 96
100
- Fry AM Lu X Olsen SJ Chittaganpitch M Sawatwong P Chantra S Baggett HC Erdman D Human rhinovirus infections in rural Thailand epidemiological evidence for rhinovirus as both pathogen and bystander *PLoS One* 2011 6(3) e17780
- Ghosh S Champlin R, Couch R, et al Rhinovirus infections in myelosuppressed adult blood and marrow transplant recipients *Clin Infect Dis* 1999 29 528 532
- Greenberg SB Respiratory viral infections in adults *Curr Opin Pulm Med* 2002
10 201–208
- Greve JM Davis G Meyer AM Forte CP Yost SC Marlor CW Kamarck ME and McClelland A The major human rhinovirus receptor is ICAM 1 *Cell* 1989
56 839 847
- Guindon S Dufayard JF Lefort V Anisimova M Hordijk W Gascuel O New algorithms and methods to estimate maximum likelihood phylogenies assessing the performance of PhyML 3.0 *Syst Biol* 2010 59 307–321
- Gwaltney JM Jr Phillips CD Miller RD Riker DK Computed tomographic study of the common cold *N Engl J Med* 1994 330 25 30
- Gwaltney JM Jr The Jeremiah Metzger lecture Climatology and the common cold *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1984 96 159

Gwaltney JM Hendley J O Simon G & Jordan, W S Rhinovirus Infections in an Industrial Population — The Occurrence of Illness *New Engl J Med* 1966 275 1261 1268

Hamparian, V V Colonna R J Cooney M K Dick E C Gwaltney J M Hughes J H Jordan W S Kapikian A Z Mogabgab W J & Monto A A collaborative report rhinoviruses extension of the numbering system from 89 to 100 *Virology* 1987 159 191–192

Hall CB Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus *N Engl J Med* 2001 10 1917–1928

Hall TA BIOEDIT a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT *Nucleic Acids Symposium Series* 1999 41 95–98

Hayden F et al Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults results of 2 double blind randomized placebo-controlled trials *Clin Infect Dis* 2003 36 1523–1532

Heyman Pw Carper HT Murphy DD et al Viral infections in relation to age atopy and season of admission among children hospitalized for wheezing *J Allergy Clin Immunol* 2004 114 239 247

Hosoda M Yamaya M Suzuki T Yamada N Kamanaka M Sekizawa K Butterfield JH Watanabe T Nishimura H Sasaki H Effects of rhinovirus infection on histamine and cytokine production by cell lines from human mast cells and basophils *J Immunol* 2002 69 1482 91

Hsia J Simon G Higgins N Goldstein A Hayden F Immune modulation by aspirin during experimental rhinovirus colds Bull N Y Acad Med 1989 65 45–56

Hunt R Hunt M Replication of Rhinovirus Polio and other picornaviruses [En Linea] USA University of South Caroline School of Medicine 2007 Citado el 12 de agosto de 2013 Formato HTML Disponible en <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/polio.htm>

ICGES MINSA CSS Base de datos de vigilancia epidemiológica Obtenida el 5 de agosto de 2013 de <http://www.saladesituacion.gob.pa/svne/firstmain.php>

Ison MG Hayden FG Kaiser L et al Rhinovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients with pneumonia. Clin Infect Dis J 2003 36 1139 1143

Jackson DJ Gangnon RE Evans MD Roberg KA Anderson EL Pappas TE Printz MC Lee WM Shult PA Reisdorf E Carlson Dakes KT Salazar LP DaSilva DF Tisler CJ Gern JE Lemanske RF Jr Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high risk children Am J Respir Crit Care Med 2008 178 667 72

Jacques J Bouscambert Duchamp M Moret H et al Association of respiratory picornavirus with acute bronchiolitis in French infants J Clin Virol 2006 35 463–466

Jain N Lodha T Kabra SK Upper respiratory tract infections Indian J Pediatr 2001 68 1135 1138

Jarhi T Lehtinen P Vuorinen T et al Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children J Med Virol 2004 72 695 699

Johnston NW Johnston SL Norman GR, et al The September epidemic of asthma hospitalization school children and disease vectors J Allergy Clin Immunol 2006 117 557 562

Johnston SL Pattermore PK, Sanderson G et al Community of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9 11 year old children *BMJ* 1995 310 1225 1229

Johnston SL Sanderson G Pattermore PK, et al Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms *J Clin Microbiol* 1993 31 111 117

Juven T Mertsola J Waris M et al Etiology of community acquired pneumonia in 254 hospitalized children *Pediatr Infect Dis J* 2000 19 293 298

Kaiser L Aubert JD Pache JC et al Chronic rhinoviral infections in lung transplante recipients *Am J Respir Crit Care Med* 2006 174 1392 1399

Kapikian A Conant, R & Hamparian V (1967) Rhinoviruses a numbering system *Nature* 213 761–2

Kapikian A Conant R. Hamparian, V Chanock, R Dick E Gwaltney J Hamre D Jordan W Kenny G & other authors (1971) A collaborative report rhinoviruses extension of the numbering system *Virology* 43 524–526

Khetsuriani N Lu X Teague WG Kazerouni N Anderson LJ Erdman DD Novel human rhinoviruses and exacerbation of asthma in children *Emerg Infect Dis* 2008 14 1793–1796

Kozak M The scanning model for translation an update *J Cell Biol* 1989 108 229–41
 Kusel MM de Klerk NH Holt PG et al Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life a birth cohort study *Pediatr Infect Dis J* 2006 25 680 686

Lau SK Yip CC Lin AW Lee RA So LY Lau YL Chan KH Woo PC Yuen KY
 Clinical and molecular epidemiology of human rhinovirus C in children and adults in
 Hong Kong reveals a possible distinct human rhinovirus C subgroup *J Infect Dis* 2009
 200 1096 103

Lemanske RF Jr Jackson DJ Gangnon RE Evans MD Li Z Shult PA Kirk CJ
 Reisdorf E Roberg KA Anderson EL Carlson Dakes KT Adler KJ Gilbertson White
 S Pappas TE Dasilva DF Tisler CJ Gern JE Rhinovirus illnesses during infancy
 predict subsequent childhood wheezing *J Allergy Clin Immunol* 2005 116 571 7

Linsuwanon P Payungporn, S Samransamruajkit, R Posuwan, N Makkoch, J
 Theanboonlers A & Poovorawan Y High prevalence of human rhinovirus C infection
 in Thai children with acute lower respiratory tract disease *J Infect* 2009 59 115–121

Macejak DG Sarnow P Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a
 cellular mRNA *Nature* 1991 353 90 94

McIntyre C L McWilliam Leitch E C Savolainen Kopra, C Hovi T & Simmonds
 P Analysis of genetic diversity and sites of recombination in human rhinovirus species
 C *J Virol* 2010 84 10297–10310

McMillan JA Weiner LB Higgins AM Macknight K Rhinovirus infection associated
 with serious illness among pediatric patients *Pediatric Infect Dis J* 1993 12 321 325

Miller EK Khuri Bulos N Williams JV y col rinovirus humano C asociada a sibilancias
 en niños hospitalizados en el Medio Oriente *J Clin Virol* 2009 46 85 – 89

Miller EK, Lu X Erdman DD et al Rhinovirus associated hospitalizations in young
 children *J Infect Dis* 2007 195 773 781

Mizuta, K Hirata, A Suto A Aoki Y Ahiko T Itagaki T Tsukagoshi H Morita, Y Obuchi M & other authors (2010) Phylogenetic and cluster analysis of human rhinovirus species A (HRV A) isolated from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan *Virus Res* 147 265–274

Mlynarczyk G Mlynarczy A Jeljaszewicz J Epidemiological aspects of antibiotic resistance in respiratory pathogens *Int J Antimicrob Agents* 2001 18 497 502

Mosser Ag Brockman Schnieder R, Amineva S et al Similar frequency of rhinovirus infectible cells in upper and lower airway epithelium *J Infect Dis* 2002 185 734 743

Nicholson KG Kent J Hammersley V and Cancio E Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community Comparative prospective population based study of disease burden *Br Med J* 1997 315 1060–1064

Nokso Koivisto J Kinnari TJ Lindahl P et al Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms *J Med Virol* 2002 66 417–420

Paisley JW Lauer BA McIntoch K et al Pathogens associated with acute lower respiratory tract infections in young children *Pediatr Infect Dis* 1984 3 14 19

Papadopoulos NG Sanderson G Hunter J Johnston SL Rhinoviruses replicate effectively at lower airway temperatures *J Med Virol* 1999 58 100 104

Papadopoulos NG Bates PJ Bardin PG Papi A Leir SH Fraenkel DJ Meyer J Lackie PM Sanderson G Holgate ST Johnston SL Rhinoviruses infect the lower airways *J Infect Dis* 2000 181 1875 1884

Papadopoulos NG Moustaki M Tsolia M et al Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis *Am J Respir Crit Care Med* 2002 165 1285 1289

Pelletier J Sonenberg N Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA *Nature* 1988 334 320 25

Pelon W Mogabgab W J Phillips I A and Pierce W E A cytopathogenic agent isolated from Naval recruits with mild respiratory illness *Proc Soc Exper Biol & Med* 1957 94 262 267

Piotrowska Z Vazquez M Shapiro ED Weibel C Ferguson, D Landry M L Kahn J S Rhinoviruses are a major cause of wheezing and hospitalization in children less than 2 years of age *Pediatr Infect Dis J* 2009 28 25 29

Pitkaranta A Arruda E Malmberg H Hayden FG Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community acquired sinusitis by reverse transcription PCR *J Clin Microbiol* 1997 35 1791 1793

Pitkaranta A Virolainen A Jero J et al Detection of rhinovirus respiratory syncytial virus and coronavirus infections in acute otitis media by reverse transcriptase polymerase chain reaction *Pediatrics* 1998 102 291 295

Price WH (1956) The Isolation of a New Virus Associated with Respiratory Clinical Disease in Humans *Proc Natl Acad Sci U S A* 42 892-896

Rakes GP Arruda E Ingram JM et al Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care IgE and eosinophil analyses *Am J Respir Crit Care Med* 1999 159 785 790

Reva K Dobbs LA Nair S et al Incidence of acute otitis media and sinusitis complicating upper respiratory tract infection the effect of age Pediatrics 2007 119 e1408-e1412

Rossmann MG Arnold E Erickson JW Frankenberger EA Griffith JP Hecht HJ Johnson JE Kamer G Luo M Mosser AG Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses Nature 1985 317 145 153

Savolainen C Blomqvist S Mulders MN and Hovi T Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains serotype 87 is close to human enterovirus 70 J Gen Virol 2002 83 333–340

Simmonds P McIntyre C Savolainen Kopra C Tapparel C Mackay IM y Hovi T Proposals for the classification of human rhinovirus species C into genotypically assigned types J Gen Virol 2010 91 2409–2419

Smuts H E Workman, L J & Zar H J (2011) Human rhinovirus infection in young African children with acute wheezing BMC Infect Dis 11 65

Smyth AR, Smyth RL Tong CY et al Effect of respiratory virus infections including rhinovirus on clinical status in cystic fibrosis Arch Dis Child 1995 73 117 120

Tyrrell D Channock R Rhinoviruses a description Science 1963 141 152–153

Van Bensten I Koopman L Niesters B et al Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants Pediatr Allergy Immunol 2003 14 363 370

Watanabe A Carraro E Kamikawa, J Leal E Granato C & Bellei N Rhinovirus species and their clinical presentation among different risk groups of non hospitalized patients J Med Virol 2010 82 2110–2115

Winther B Hayden FG Hendley JO Picornavirus infections in children diagnosed by RT PCR during longitudinal surveillance with weekly sampling association with symptomatic illness and effect of season J Med Virol 2006 78 644–650

Wisdom A Leitch E C Gaunt E Harvala, H & Simmonds P Screening respiratory samples for detection of human rhinoviruses (HRVs) and enteroviruses comprehensive VP4–VP2 typing reveals high incidence and genetic diversity of HRV species C J Clin Microbiol 2009 47 3958–3967

Wright PF Deatly AM Karron RA et al Comparison of results of detection of rhinovirus by PCR and viral culture in human nasal wash specimens from subjects with and without clinical symptoms of respiratory illness J Clin Microbiol 2007 45 2126 2129

Xatzipsalti M Kyrana S Tsolia M et al Rhinovirus viremia in children with respiratory infections Am J Respir Crit Care Med 2005 172 1037 1040

Xiang Z Gonzalez R, Xie Z Xiao Y Liu J Chen L Liu C Zhang J Ren L Vernet G Paranhos Bacçalà G Shen K, Jin Q Wang J Human rhinovirus C infections mirror those of human rhinovirus A in children with community acquired pneumonia J Clin Virol 2010 49 94 99