



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR MÉDICA

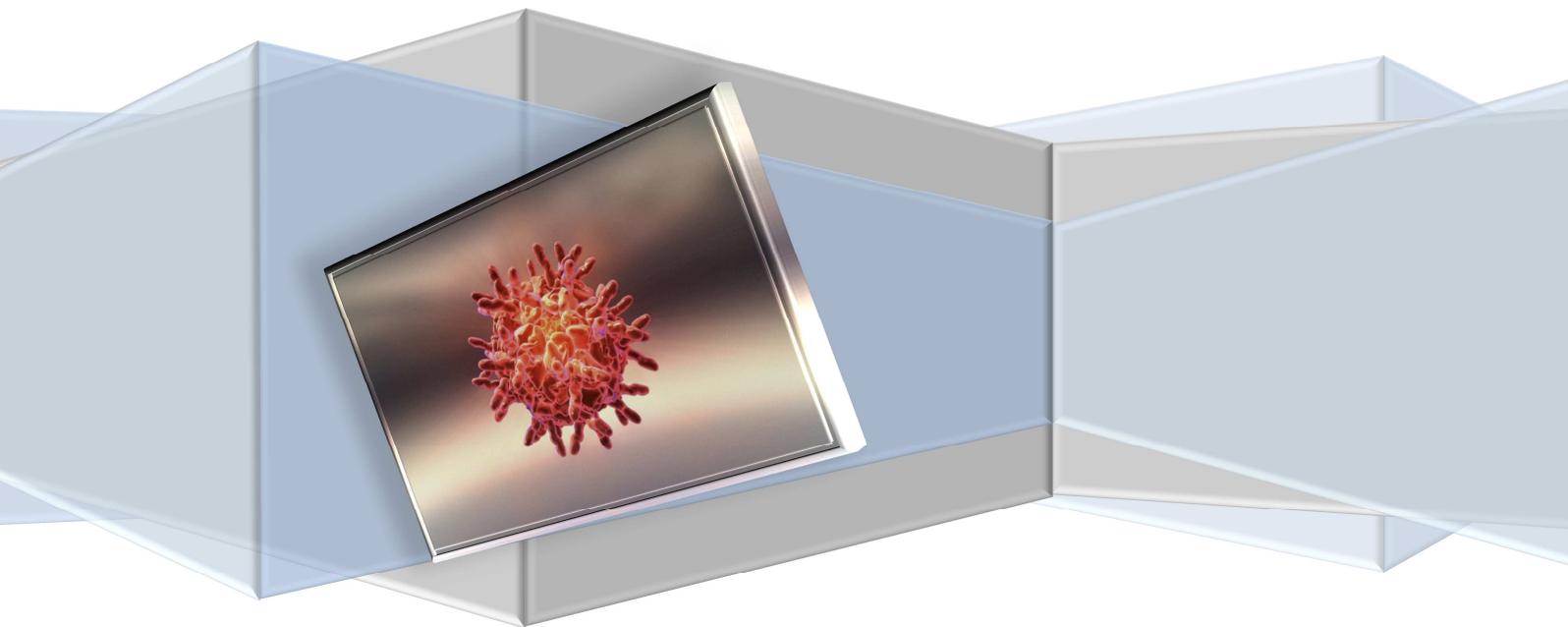
ROL DEL RINOVIRUS EN NIÑOS HOSPITALIZADOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR MÉDICA

Maestrando: Lic. JUAN MANUEL RUDI

Directora: MSc. ELSA VIRGINIA ZERBINI

Co-Directora: MSc. GABRIELA FABIANA KUSZNIERZ



ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS E INSTITUTOS DE SALUD
"DR. CARLOS G. MALBRÁN"

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"DR. EMILIO CONI"

AGRADECIMIENTOS

Mucho tiempo transcurrió (y cuando digo mucho, realmente esmucho) desde que decidí embarcarme en la aventura de navegar por las aguas de un posgrado. Y la verdad no fue fácil. Horas eternas y cientos de kilómetros semanales a bordo del Flecha Bus, fines de semana enteros frente a los apuntes tratando de volver a conseguir un ritmo de estudio perdido y algún que otro sinsabor que opacó este objetivo. Pero acá estoy... cerrando esta etapa. Y en verdad, la satisfacción que siento al escribir estas palabras es indescriptible. Y es tiempo de agradecer...

A Elsa Zerbini y Gabriela Kuszniez, por abrirme las puertas del laboratorio del Instituto Coni y por aceptar dirigirme, confiando en mí para la realización de este proyecto. Gracias Gabriela por haber estado conmigo en el día a día y por haberme enseñado el mundo de la biología molecular, respondiendo cada una de mis preguntas (que fueron muchas).

A Ale, Fer y Yose, mis “cargadoras oficiales del ARN”, por dejar de lado su trabajo y estar siempre bien dispuestas cada vez que les pedí ayuda. Gracias Ale por toda la mano que me diste y por hacerme sentir muy a gusto en tu territorio. Y gracias Fer por traficarme el control positivo desde Cuba!.

A todo el personal del laboratorio del Instituto Coni y a mis compañeros docentes de la FBCB, por el excelente clima de trabajo y la buena onda para conmigo.

A mis viejos, por haberme apoyado durante toda mi vida y por seguir haciéndolo hasta el día de hoy. Sin duda no sería quién soy sin la presencia de ustedes. Esto también es de ustedes y para ustedes. Gracias!.

A mis amigos y hermanos de más de veinte años, a mis amigos más recientes pero igualmente importantes, a las mujeres de mis amigos y que hoy son amigas, a mis amigos y compañeros de salidas, a mis antiguos compañeros de trabajo con los que hoy nos une una linda amistad... gracias a todos por tantos años de afecto y por haber estado presente en las buenas y en las malas.

A Agustina, mi ahijadita preciosa, por cada sonrisa y por tanto cariño recibido. Te quiero mucho!.

A mis compañeros de maestría, “los de acá y los de afuera”, por cada viernes y sábado compartido a lo largo de dos años, y en especial a Luis y su familia, quienes me abrieron las puertas de su casa y me prestaron un colchón para alivianar mi bolsillo. De todo corazón, gracias!.

A todos, GRACIAS!

RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA), cuyas patologías más frecuentes son la neumonía, la bronquiolitis y la enfermedad tipo influenza, afectan a toda la población, pero principalmente a los menores de 5 años y mayores de 65 años, encontrándose entre las primeras causas de mortalidad a nivel mundial. En Argentina, son la principal causa de consulta e internación en todas las edades, y en Santa Fe, representaron casi el 20% de las internaciones registradas en el hospital pediátrico de referencia de la ciudad durante el año 2010. Los patógenos virales más frecuentes causantes de IRA son el virus sincicial respiratorio (VSR), influenza, parainfluenza, adenovirus, metapneumovirus, coronavirus y rinovirus.

Los rinovirus humanos (HRV) pertenecen a la familia *Picornaviridae*. Son virus esféricos no envueltos y su genoma es una única molécula lineal de ARN de sentido positivo, que se encuentra recubierta por una cápside de simetría icosaédrica. Aislados por primera vez en 1956, en la actualidad se conocen más de 100 serotipos diferentes que se encuentran agrupados en tres especies, HRVA, HRVB y HRVC. Son termoestables y se diseminan a través de las secreciones respiratorias contaminadas mediante el contacto directo entre personas. Es posible hallarlos en personas de todas las edades, su diseminación es a nivel mundial y, aunque la frecuencia de circulación suele ser mayor en los meses de otoño y primavera, pueden detectarse en todos los meses del año. Si bien históricamente los HRV fueron considerados patógenos de las vías aéreas superiores, en la actualidad se ha demostrado que también ocasionan infecciones en el tracto respiratorio inferior, causando hospitalizaciones de niños con neumonía, bronquiolitis y obstrucciones pulmonares crónicas. También se encuentran

asociados a pacientes que presentan episodios de sibilancias recurrentes, exacerbaciones de asma, bronquitis, sinusitis y otitis media aguda.

El diagnóstico virológico es necesario para determinar la etiología de las IRAs, ya que los cuadros clínicos producidos por los distintos virus suelen ser similares. Además, permite restringir el uso innecesario de antibióticos. El aislamiento viral en cultivo de tejido seguido por el test de labilidad ácida representa el método estándar en el laboratorio para la confirmación de una infección por HRV, pero el tiempo requerido es superior a dos semanas, lo que es de valor limitado para una decisión terapéutica. Las técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han permitido incrementar la identificación de este virus.

El hecho de que en Santa Fe no se hayan efectuado hasta el momento estudios relacionados a los HRV motivó la realización de este trabajo, que se propuso seleccionar y optimizar una técnica de PCR que permitiera la detección del virus en pacientes pediátricos hospitalizados con IRA durante el período marzo 2010-febrero 2011, para luego estudiar su frecuencia, estacionalidad y epidemiología, como así también aspectos clínicos-epidemiológicos de los pacientes infectados.

Para el desarrollo del estudio, se seleccionó una RT-PCR anidada, altamente sensible y específica, que fue testeada por Steininger et al. (2001) para la mayoría de los serotipos de HRV conocidos y que amplifica un fragmento altamente conservado del genoma viral. Se optimizó la técnica con controles de positivos del virus, variando parámetros críticos del ensayo, y se corroboró la especificidad de la misma al ensayar controles positivos de otros virus respiratorios.

Se obtuvieron un total de 2020 aspirados nasofaríngeos (ANF) de pacientes durante el período estudiado, a los cuales se les realizó la detección de antígenos VSR, adenovirus, parainfluenza e influenza A y B por inmunofluorescencia (IF). La detección de influenza A y B se realizó además por RT-PCR real time. A un porcentaje representativo de ANF que resultaron negativos por IF (452 muestras) se les realizó la determinación de HRV mediante RT-PCR, detectando el genoma del virus en 172, lo que representó una positividad del 38,1% y un segundo lugar (8,5%) en la frecuencia de circulación de virus respiratorios. Se encontró en todos los meses del año, predominando durante marzo de 2010 y desde agosto hasta febrero de 2011.

El 60% de los niños hospitalizados con IRA atribuibles a HRV fueron menores de 6 meses, siendo la mediana de la edad de 4 meses. Se comprobó que la edad no fue un factor de riesgo para desarrollar enfermedad grave. La proporción de infectados fue similar para ambos géneros.

Se analizaron aspectos clínicos y epidemiológicos de 145 pacientes. El 31% presentó antecedentes clínicos, entre los que se destacaron la prematurez (55,6%) y las sibilancias recurrentes (51,1%). Los diagnósticos de egreso más frecuentes fueron la neumonía (35,2%), la bronquiolitis (32,4%) y la bronquitis (12,4%). Como hallazgos radiológicos se observó atrapamiento aéreo (75,2%), infiltrado intersticial (67,9%) e infiltrado alveolar (35,8%). El 72,7% de los pacientes presentó leucocitosis. Se utilizaron antibióticos en el 66,4% de los tratamientos y el 85,5% de los niños requirió suministro de oxígeno durante la internación. La mediana de la duración de la estadía hospitalaria fue de 6 días y el 15,9% de los pacientes requirió internación en unidad de terapia intensiva (UTI). No se observaron diferencias significativas entre las edades de

los pacientes internados en UTI y las de aquellos que no presentaron un cuadro clínico de gravedad, como así tampoco el presentar un antecedente clínico fue un factor de riesgo para desarrollar enfermedad severa.

El presente estudio evidenció que los HRV están asociados a hospitalizaciones de niños por IRA. La implementación de una técnica de RT-PCR de punto final logró detectar con rapidez, sensibilidad y especificidad un virus que se ubicó en el segundo lugar de circulación (luego del VSR), y permitirá, en forma rutinaria, disminuir los casos de IRA de origen desconocido, estableciendo el papel que desempeñan estos virus en nuestro medio y facilitando la elección de conductas terapéuticas apropiadas.

ABSTRACT

Acute respiratory infections (ARIs), among which the most frequent pathologies include pneumonia, bronchiolitis and influenza-like illness, affect the whole, but especially people under 5 and over 65. It is among the leading causes of mortality worldwide. In Argentina, ARIs are the leading cause for consultation and hospitalization in all ages, and in Santa Fe they accounted for nearly 20% of admissions at the local pediatric referral hospital in 2010. The most common IRA-causing viral pathogens are respiratory syncytial virus (RSV), influenza, parainfluenza, adenovirus, metapneumovirus, coronavirus and rhinovirus.

Human rhinovirus (HRV) belongs to the family *Picornaviridae*. They are non-enveloped spherical viruses and their genome is a single positive-sense RNA linear molecule which is coated by a capsid of icosahedral symmetry. First isolated in 1956, over 100 different serotypes are currently known which are grouped into three species, HRVA, HRVB and HRVC. They are heat stable and can spread through contaminated respiratory secretions through direct contact between people. They may be found in people of all ages and are spread worldwide. Although their frequency of circulation is usually higher in autumn and spring, they can be detected in every month of the year. While historically considered upper airways pathogens, they have recently been shown to cause infections in the lower respiratory tract as well, causing hospitalizations of children with pneumonia, bronchiolitis and chronic pulmonary obstruction. They are also associated with patients with recurrent episodes of wheezing, asthma exacerbations, bronchitis, sinusitis and acute otitis media.

Virological diagnosis is needed to determine the etiology of ARIs, since the clinical symptoms caused by each of these viruses are often similar. In addition, the unnecessary use of antibiotics can be thus restricted. Viral isolation in tissue culture followed by an acid liability test represents the standard method in the laboratory for confirmation of HRV infection, but the time required is longer than two weeks, which is of limited value for therapeutic decision. Techniques based on the detection of nucleic acids through chain reaction (PCR) have led to advance in ARI identification.

The fact that no HRV-related studies have been conducted in Santa Fe so far led to the completion of this work, which aims to select and optimize a PCR technique enabling the detection of the virus in ARI hospitalized pediatric patients during THE march 2010-february 2011 period, and then study their frequency, seasonality and epidemiology, as well as clinical and epidemiological aspects of infected patients.

In order to develop the study, a highly sensitive and specific nested RT-PCR was selected which was tested by Steininger et al. (2001) for most known HRV serotypes, amplifying a highly preserved fragment of the viral genome. Technique was optimized with positive virus controls, varying critical test parameters, and specificity was thereby confirmed by testing positive controls of other respiratory viruses.

A total of 2020 nasopharyngeal aspirates (NPA) were obtained during the study period from patients who underwent antigen detection RSV, adenovirus, parainfluenza and influenza A and B by immunofluorescence (IF). Detection of influenza A and B was also carried out through real time RT-PCR. For a representative proportion of NPAs who were negative by IF (452 samples) HRV was determined through RT-PCR, detecting the virus genome in 172. This resulted in a 38.1% positivity and a second

place (8.5%) in the rate of respiratory virus flow. It was found in all months of the year, predominantly during March 2010 and from August to February 2011.

60% of hospitalized children with HRV attributable to ARI were under 6 months, with a median age of 4 months. Age proved not to be a risk factor for developing severe disease. The proportion of infected children was similar for both genders.

Clinical and epidemiological aspects of 145 patients were analyzed. 31% had a medical history, including prematurity (55.6 %) and recurrent wheezing (51.1%) as prevailing conditions. The most common discharge diagnoses were pneumonia (35.2%), bronchiolitis (32.4%) and bronchitis (12.4%). The aerial radiological findings observed include (75.2%) trapping interstitial infiltrate (67.9 %) and alveolar infiltrates (35.8%). 72.7% of patients had leukocytosis. Antibiotics were used in 66.4 % of treatments and 85.5% of the children required oxygen supply during hospitalization. The median duration of hospital stay was 6 days and 15.9 % of patients required admission to intensive care unit (ICU). No significant differences were observed between the age of ICU patients and that of patients who did not have severe clinical symptoms. Similarly, having a clinical history did not prove a risk factor for developing severe disease.

This study showed that HRVs are associated with ARI-induced children hospitalizations. The implementation of an RT-PCR endpoint technique could quickly detect, with sensitivity and specificity, a virus that is the second in importance with greatest circulation (after VSR), and will be capable of routinely reducing ARI cases of unknown origin, thus establishing the role these viruses play in our environment and facilitating the choice of appropriate therapeutic approaches.

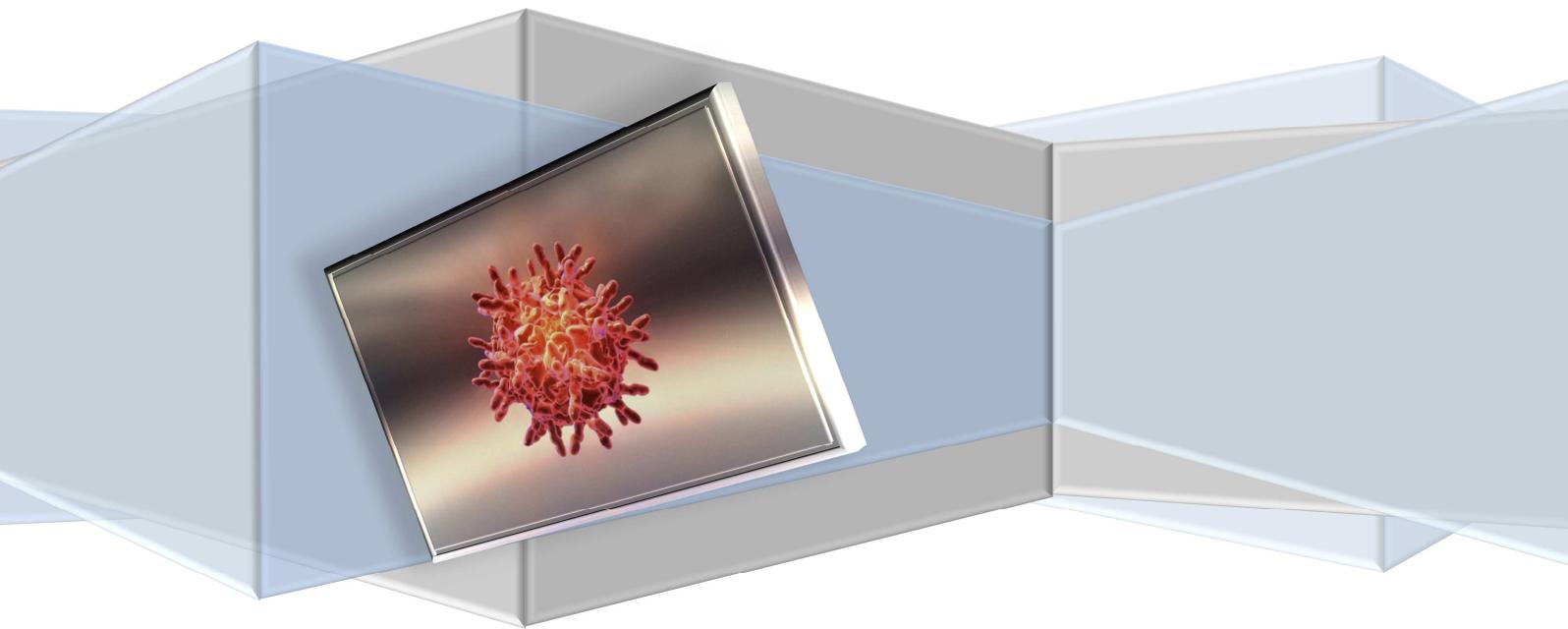
ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|----|
| ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS..... | 7 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 11 |
| 1.1 Generalidades de los virus..... | 11 |
| 1.2 Generalidades de los picornavirus..... | 13 |
| 1.3 Rinovirus..... | 13 |
| 1.3.1 Antecedentes históricos..... | 13 |
| 1.3.2 Clasificación taxonómica..... | 14 |
| 1.3.3 Estructura del virión..... | 15 |
| 1.3.4 Descripción de antígenos..... | 16 |
| 1.3.5 Propiedades..... | 16 |
| 1.3.6 Características del genoma..... | 17 |
| 1.3.7 Ciclo de replicación viral..... | 18 |
| 1.3.8 Mecanismo de transmisión..... | 19 |
| 1.3.9 Epidemiología de la infección por rinovirus..... | 19 |
| 1.3.10 Respuesta inmune del huésped..... | 20 |
| 1.3.11 Características clínicas de la infección..... | 23 |
| 1.3.12 Prevención y tratamiento..... | 24 |
| 1.3.13 Diagnóstico de laboratorio..... | 25 |
| 1.3.13.1 Selección y conservación de las muestras..... | 26 |
| 1.3.13.2 Aislamiento en cultivo celular..... | 26 |
| 1.3.13.3 Diagnóstico serológico..... | 27 |
| 1.3.13.4 Amplificación de ácidos nucleicos..... | 28 |
| 1.3.13.5 Diagnóstico de rinovirus por PCR..... | 28 |
| 2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA..... | 30 |
| 3. OBJETIVOS..... | 34 |
| 3.1 Objetivo general..... | 34 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 34 |
| 4. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 36 |
| 4.1 | Lugar y período del estudio..... | 36 |
| 4.2 | Población..... | 36 |
| 4.2.1 | Criterio de inclusión..... | 36 |
| 4.2.2 | Criterio de exclusión..... | 36 |
| 4.3 | Muestras..... | 36 |
| 4.4 | Técnicas diagnósticas..... | 37 |
| 4.5 | Tamaño y selección muestral..... | 37 |
| 4.6 | Extracción y purificación del genoma viral..... | 38 |
| 4.7 | RT-PCR..... | 40 |
| 4.7.1 | Controles de amplificación..... | 40 |
| 4.7.2 | Optimización de la RT-PCR de punto final..... | 40 |
| 4.7.2.1 | Transcripción reversa..... | 40 |
| 4.7.2.2 | PCR..... | 41 |
| 4.7.3 | Aplicación de ensayo de RT-PCR en muestras clínicas..... | 43 |
| 4.7.4 | Evaluación de la especificidad de la RT-PCR..... | 43 |
| 4.7.5 | Visualización de los productos de PCR..... | 43 |
| 4.7.6 | Precauciones del procedimiento..... | 44 |
| 4.8 | Instrumento de recolección de datos..... | 44 |
| 4.9 | Análisis estadístico..... | 45 |
| 5. | RESULTADOS..... | 47 |
| 5.1 | Selección de la técnica de RT-PCR..... | 47 |
| 5.2 | Optimización de la técnica de transcripción reversa..... | 49 |
| 5.3 | Optimización del ensayo de amplificación..... | 49 |
| 5.3.1 | Concentración de MgCl ₂ | 49 |
| 5.3.2 | Concentración de dNTPs..... | 50 |
| 5.4 | Especificidad de la técnica..... | 50 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.5 | Aplicación de ensayo de RT-PCR en muestras clínicas | 51 |
| 5.5.1 | Frecuencia y estacionalidad del rinovirus y otros virus respiratorios | 51 |
| 5.6 | Análisis clínico-epidemiológico de casos de IRA atribuibles a rinovirus | 54 |
| 5.6.1 | Población estudiada y datos demográficos | 54 |
| 5.6.2 | Antecedentes clínicos | 55 |
| 5.6.3 | Internaciones previas por IRA | 55 |
| 5.6.4 | Manifestaciones clínicas | 55 |
| 5.6.5 | Hallazgos radiológicos | 57 |
| 5.6.6 | Hallazgos de laboratorio | 57 |
| 5.6.7 | Tratamiento | 57 |
| 5.6.8 | Seguimiento de los pacientes | 61 |
| 6. | DISCUSIÓN | 63 |
| 7. | CONCLUSIONES | 73 |
| 8. | BIBLIOGRAFÍA | 77 |
| ANEXO 1 | | 91 |
| ANEXO 2 | | 95 |
| ANEXO 3 | | 96 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

°C: grados Celsius

A: adenina

A.C.S.: American Chemical Society (grado reactivo)

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia

ANF: aspirado nasofaríngeo

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATB: antibiótico

C: citosina

CARV: caso de IRA atribuible a rinovirus

CRIA: claudicación respiratoria inminente aguda

CVAS: cuadro de vías aéreas superiores

DICT₅₀: dosis infectiva para el 50% de los cultivos de tejidos

dNTP: deoxinucleótidos trifosfato

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

g/L: gramos por litro

G: guanina

GC: guanina-citosina

HCl: ácido clorhídrico

HRV: rinovirus humano

ICAM: molécula de adhesión intercelular

IF: inmunofluorescencia

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquina

INF: interferón

IRA: infección respiratoria aguda

KCl: cloruro de potasio

kpb: kilopares de bases

LDL: lipoproteína de baja densidad

mA: miliampere

Mg: magnesio

MgCl₂: cloruro de magnesio

min: minuto

MIP: proteína inflamatoria de macrófagos

ml: mililitro

mM: minimolar

N-terminal: extremo amino terminal

NCR: región no codificante

nm: nanómetro

OMS: Organización Mundial de la Salud

P: proteína

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pb: pares de bases

pH: medida de acidez o basicidad de soluciones

PM: peso molecular

pmol: picomol

RANTES: células T normales expresadas, secretadas y reguladas bajo activación

RNAsas: enzimas hidrolizantes del ARN

rpm: revoluciones por minuto

RT: transcripción reversa

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa

RV: rinovirus

seg: segundo

T: timina

TNF: factor de necrosis tumoral

Tris: tris (hidroximetil) aminometano

U: unidades

ug: microgramo

ul: microlitro

UTI: unidad de terapia intensiva

v: volumen

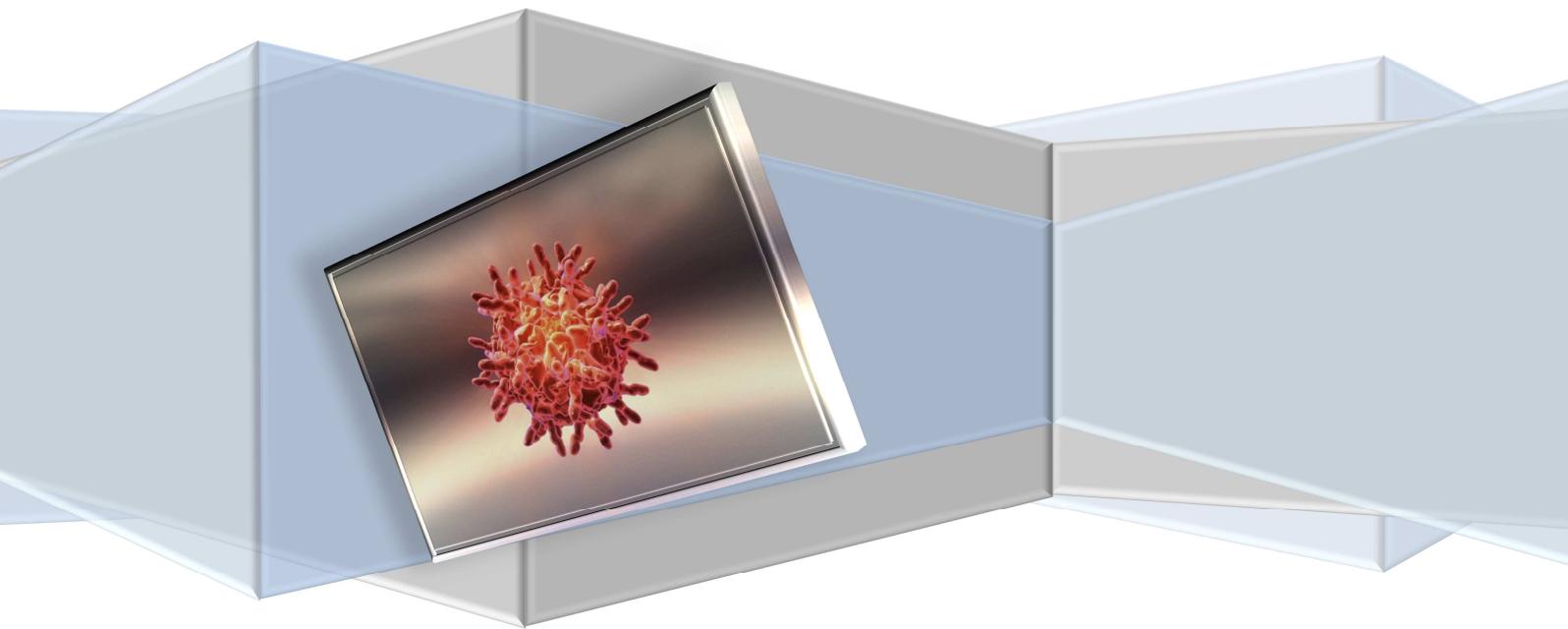
V: volt

VP: proteína viral

VSR: virus sincicial respiratorio

X: por

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DE LOS VIRUS

Los **virus** son los organismos más pequeños capaces de autoreplicarse y su característica principal es la de ser *parásitos intracelulares obligados*, es decir, son absolutamente dependientes de un organismo vivo para poder reproducirse y ser infectivos (1).

En su forma más básica, un virus consiste en una porción de ácido nucleico envuelta en una cubierta proteica, denominada **cápside**, que a su vez puede estar protegida o no por una membrana lipídica conocida como **envoltura**, dando origen así a los **virus envueltos** y **virus desnudos**, respectivamente (2). El genoma viral puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), y éste es el responsable de dirigir la síntesis de varias copias de todos los componentes virales dentro de un huésped adecuado. El ensamblaje de estos componentes sintetizados da origen a las progenies virales, denominadas **viriones**, que constituyen la vía de transmisión del genoma viral hacia la siguiente célula del huésped (1).

El **sistema clásico de taxonomía viral** (Figuras N° 1 y N° 2) distribuye los distintos virus en *familias*, en función de las propiedades compartidas entre ellos. Entre las características principales que se consideran para dicha clasificación se destacan la naturaleza del ácido nucleico del virión (ADN o ARN), la simetría de la cápside, la presencia o ausencia de una envoltura y las dimensiones del virión y de la cápside. Otra manera de agrupar los virus es teniendo en cuenta los distintos mecanismos que éstos utilizan para generar el ARN mensajero (ARNm) a partir del cual se sintetizan las

proteínas necesarias para la replicación viral. En base a estas estrategias de síntesis, se diferencian seis grupos que constituyen la llamada **clasificación de Baltimore** (1).

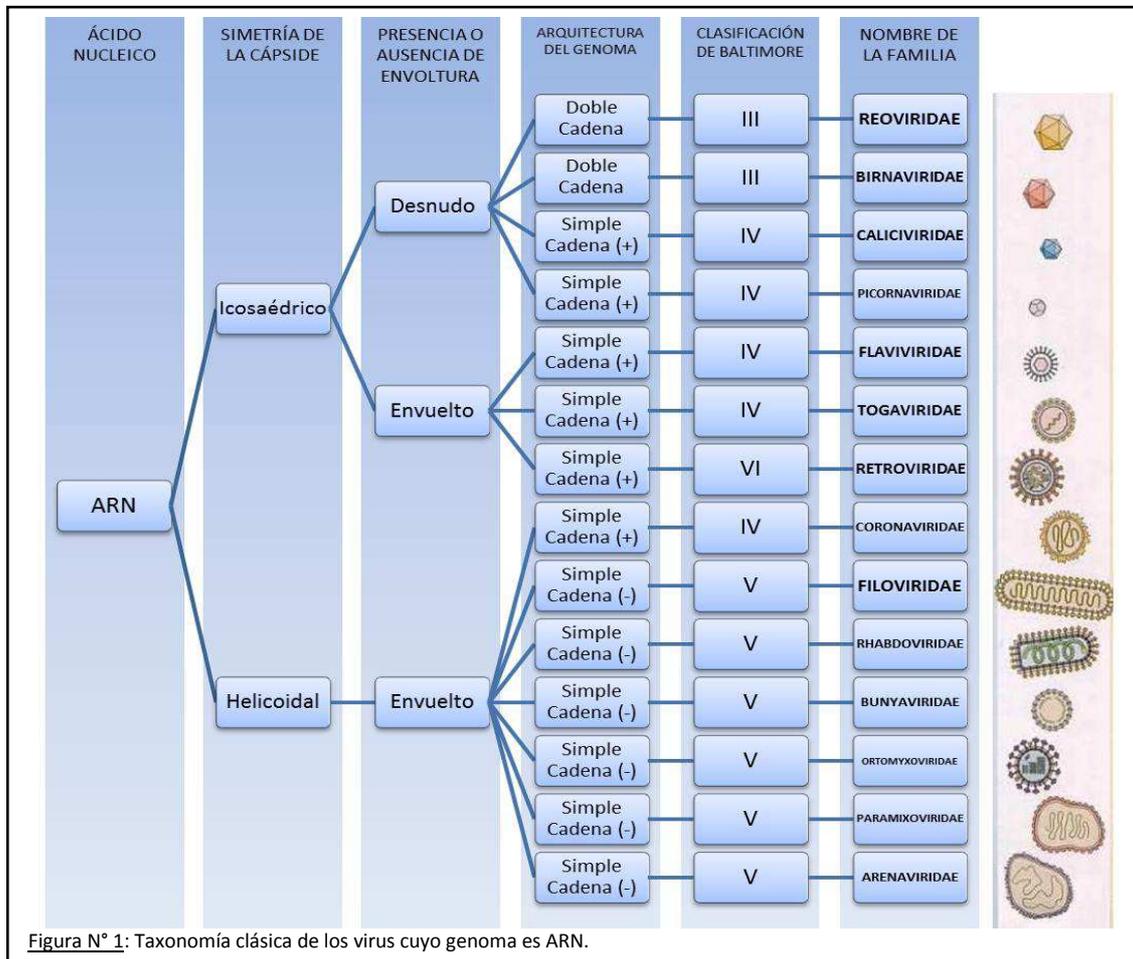


Figura N° 1: Taxonomía clásica de los virus cuyo genoma es ARN.

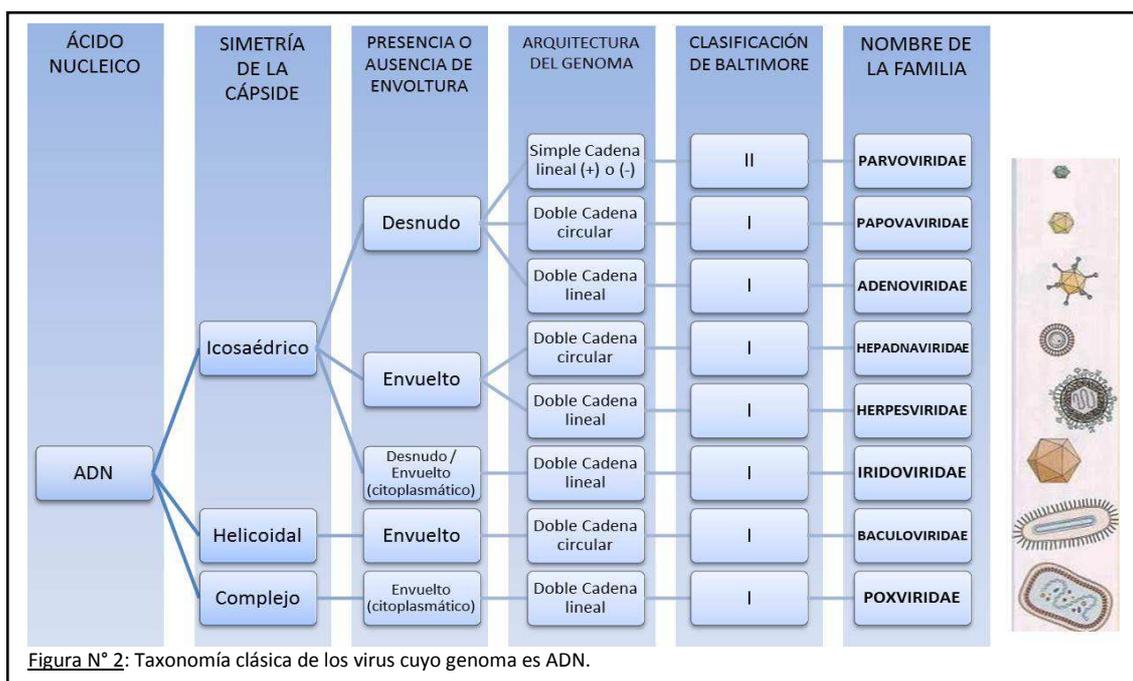


Figura N° 2: Taxonomía clásica de los virus cuyo genoma es ADN.

1.2 GENERALIDADES DE PICORNAVIRUS

La familia *Picornaviridae* se clasifica en seis géneros (2, 3, 4): **Aphthovirus**, **Cardiovirus**, **Enterovirus**, **Hepatovirus**, **Parechovirus** y **Rinovirus**. El nombre **Picornavirus** (pico: pequeño; RNA: ácido ribocucleico) se utilizó para designar a un grupo de virus de tamaño pequeño, que no contienen envoltura y cuyo genoma viral está constituido por ARN simple cadena de polaridad positiva (3). Esta familia contiene importantes patógenos humanos y animales. En humanos, estos virus tienen la capacidad de generar diversos síndromes clínicos, entre ellos parálisis, meningitis e infecciones respiratorias y gastrointestinales (5).

Los rinovirus, junto con los enterovirus, constituyen los patógenos humanos clínicamente más importantes de la familia *Picornaviridae*, siendo cada año la causa de millones de infecciones en todo el mundo (6, 7). Ambos tipos de virus generan enfermedades respiratorias, pero se diferencian en el sitio de replicación, ya que los rinovirus lo hacen exclusivamente en el tracto respiratorio, mientras que los enterovirus se replican predominantemente en el tracto gastrointestinal. Los rinovirus también se diferencian de los enterovirus en su mayor especificidad de especies y en los fastidiosos requerimientos para su crecimiento. In vitro, difieren en la temperatura óptima de crecimiento, en la labilidad a los ácidos, en los receptores utilizados para la infección viral y en el tropismo celular (8, 9).

1.3 RINOVIRUS

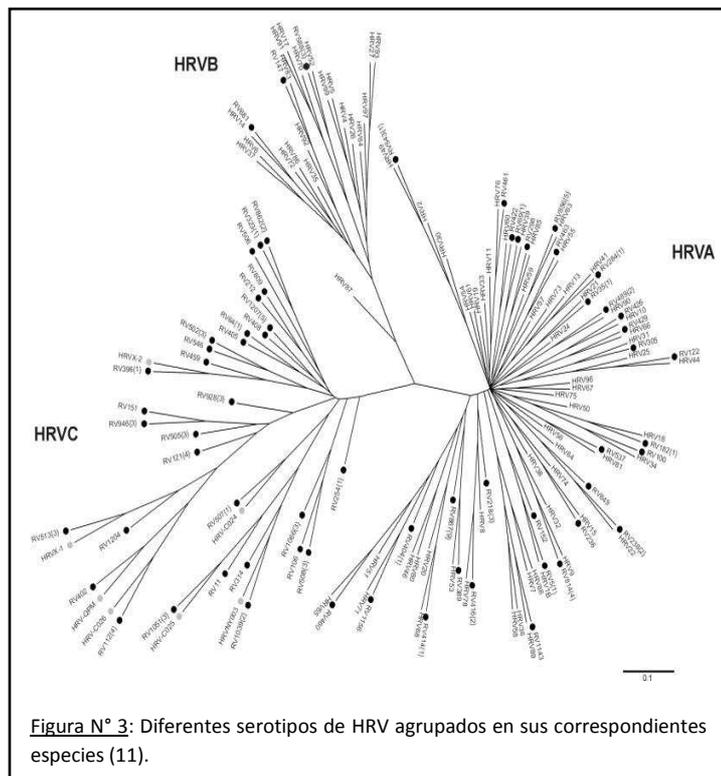
1.3.1 Antecedentes históricos

Los primeros aislamientos de rinovirus, inicialmente clasificados como Echovirus, fueron realizados a mediados de la década del '50 por grupos de investigación

comandados por Price y Pelon, quienes cultivaron tejidos de riñón de mono rhesus inoculados con lavados nasofaríngeos de individuos con tos. Luego de una definición posterior de propiedades, estos aislamientos fueron reclasificados como **Rinovirus humano tipo 1A (HRV1A)**. En 1960, Tyrrell y Parsons, en Salisbury, variando las condiciones de los cultivos que imitaban “el ambiente de la nariz” (temperatura de incubación cercana a los 33°C, pH neutro del medio y leve agitación de los cultivos), y mediante la utilización de cultivos de tejidos humanos, aislaron cepas HGP (posteriormente reclasificadas como HRV2). Cuando se utilizaron cultivos de tejidos de fibroblastos embrionarios humanos, como lo describen Hayflick y Moorehead, y bajo las condiciones de trabajo empleadas por el grupo de Salisbury, se detectaron una variedad de serotipos de rinovirus, los cuales se clasificaron con números consecutivos conforme se iban descubriendo (2, 10).

1.3.2 Clasificación taxonómica

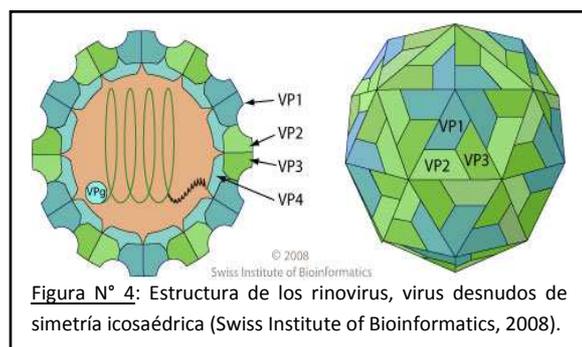
Desde el punto de vista filogenético, y gracias al surgimiento de la secuenciación que permitió analizar en detalle el genoma viral, los rinovirus humanos se agrupan en tres especies (Figura N° 3). **HRVA** es la especie más numerosa e incluye 74 serotipos, **HRVB**



reúne 25 serotipos y la especie **HRVC**, recientemente descubierta, incluye nuevos tipos de rinovirus que no se asemejan a las especies anteriores y que poseen una estructura y una organización del genoma similar a los miembros del género Enterovirus. Esta última es muy prevalente, tiene una distribución mundial y al parecer, es muy infectiva (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17). La diversidad genética observada entre sus miembros, como así también la ocurrencia de recombinación y la imposibilidad de propagar con éxito estos virus en cultivos celulares, dificultan la determinación exacta del número de integrantes; sin embargo, algunos autores han propuesto la existencia de más de 60 tipos distintos en función de las diferencias encontradas en regiones específicas del genoma (16, 17), como así también la posible existencia de una nueva especie, **HRVD** (18).

1.3.3 Estructura del virión

Los viriones de rinovirus (Figura N° 4) son partículas esféricas de aproximadamente 30 nm de diámetro, que carecen de envoltura lipídica y cuyo genoma está recubierto por una cápside de simetría icosaédrica compuesta por 60 subunidades o **protómeros**, y cada subunidad está constituida por 4 proteínas: **Proteína Viral 1 (VP1)**, **VP2** y **VP3**, localizadas en la superficie del virión, y **VP4**, asociada íntimamente al



ARN (3). Las variaciones en la estructura que permiten diferenciar los distintos serotipos de rinovirus están localizadas en los extremos N-terminal de las proteínas VP1 y VP4 que integran la cápside viral (10).

1.3.4 Descripción de antígenos

La infectividad de los rinovirus es neutralizada utilizando **antisueros específicos**. Los **epitopes antigénicos** del virus se localizan en las regiones hipervariables de las proteínas de la cápside, especialmente en VP1, que se encuentra en la zona más externa de la superficie viral (19). Los anticuerpos neutralizan la infectividad de los rinovirus mediante diferentes mecanismos, que incluyen agregación de los virus, cambios conformacionales de las proteínas de la cápside, impedimento del desarme viral durante la replicación y bloqueo estérico de los receptores celulares a los que puede unirse el virus (10).

La clasificación de los rinovirus en serotipos se basa en reacciones de neutralización entre los virus estudiados y antisueros específicos en cultivos celulares. Haciendo uso de estas reacciones es como se detectan los nuevos serotipos, ya que la ausencia de reactividad cruzada del antisuero policlonal con los serotipos definidos constituye el criterio para la aceptación de un nuevo serotipo (2, 10). Datos de secuencia en los serotipos HRV1A, HRV2, HRV14, HRV16 y HRV89 indicaron que la identidad aminoacídica de las proteínas de la cápside entre serotipos varía entre 41% y 83%. La secuenciación de la región del genoma, que incluyó el sitio de unión al anticuerpo de neutralización del serotipo HRV21, reveló, al menos, 70% de identidad aminoacídica, con un 84% de identidad entre los serotipos HRV3, HRV14 y HRV72 (2).

1.3.5 Propiedades

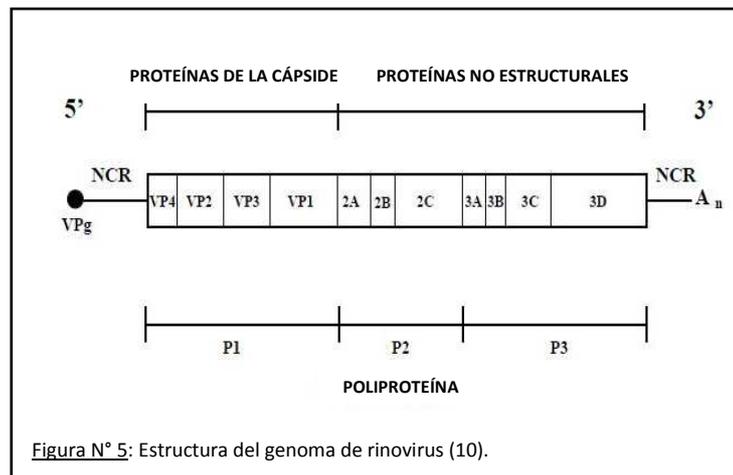
La labilidad a los ácidos es una de las principales propiedades que caracteriza a los rinovirus. Si bien es posible inactivar estos virus a pH menores a 6, la inactivación es total y muy rápida cuando se trabaja a pH por debajo de 3. Debido a la falta de la

bicapa lipídica en su estructura, son resistentes a soluciones etéreas al 20% y soluciones clorofórmicas al 5%, como así también a detergentes y mezclas con fluorocarbonos (10). Por otra parte, los rinovirus son termoestables, pudiendo sobrevivir por horas a temperaturas comprendidas entre 24°C y 37°C. Algunos serotipos (HRV3-HRV12, HRV15, HRV18 y HRV19) presentan estabilidad a 50°C, y todos son estables por años a -70°C (2).

1.3.6 Características del genoma

El genoma viral es una única molécula lineal de ARN de sentido positivo, cuya

longitud varía entre 7,1 y 7,2 kpb (dependiendo del serotipo), con un porcentaje de secuencias guanina-citosina (GC) cercano al 40% y que presenta regiones no codificantes en ambos

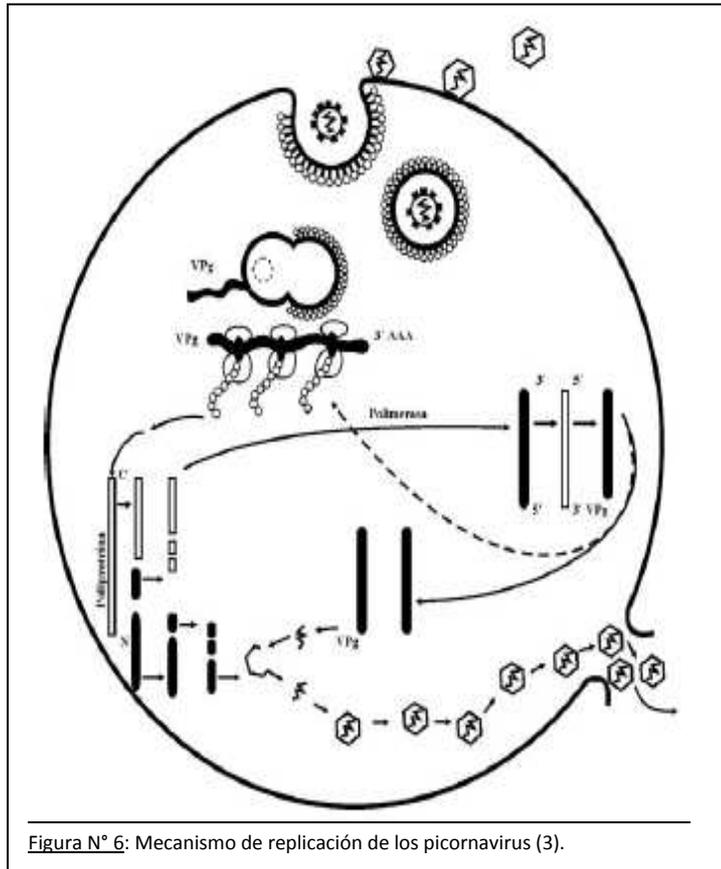


extremos, más pequeñas que aquellas presentes en los enterovirus (Figura N° 5). La región no codificante (NCR) 5' (610-625 pb) está implicada en el proceso de replicación viral y en su extremo final tiene unida covalentemente una proteína viral, **VPg**, cuya longitud varía entre los distintos serotipos (21-23 aminoácidos). La NCR 3' presenta entre 40 y 47 pb y el genoma finaliza en una cola poliadenilada. Las NCR flanquean un único marco abierto de lectura que codifica para una poliproteína de 2100-2200 aminoácidos, que luego es procesada por proteinasas generando proteínas más pequeñas. La región P1 codifica para las proteínas de la cápside VP1, VP2, VP3 y VP4,

mientras que las regiones P2 y P3 codifican para siete proteínas involucradas en la replicación del genoma (10, 20).

1.3.7 Ciclo de replicación viral

La mayoría de los serotipos de rinovirus se unen a la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 para el ingreso a la célula, mientras que los serotipos HRV1A, HRV1B, HRV2, HRV29, HRV30, HRV31, HRV44, HRV47, HRV49 y HRV62 utilizan como receptor a la lipoproteína de baja densidad (LDL) (2, 19). Luego de generarse en la cápside los cambios conformacionales necesarios para introducir el



ARN viral en el citoplasma de la célula huésped, éste es traducido para generar diferentes proteínas, entre ellas la ARN polimerasa-ARN dependiente que participa en la replicación del genoma. La cadena positiva de ARN es copiada a una cadena negativa complementaria (proceso iniciado por la proteína VPg), y esta cadena es utilizada como templatado en la síntesis de las copias del genoma viral, que luego se utilizan como ARNm para la traducción de las proteínas virales. Los viriones, con todos sus componentes ya sintetizados, se empaquetan en el citoplasma y emigran de la célula

huésped produciendo su lisis (Figura N° 6). Aproximadamente diez horas es lo que un rinovirus necesita para poder completar su ciclo de replicación viral (10).

1.3.8 Mecanismo de transmisión

Las infecciones por rinovirus son diseminadas de persona a persona a través de las secreciones respiratorias contaminadas. Diversos estudios han concluido que una vía factible de diseminación es la transmisión por contacto directo. Es normal hallar este virus en las manos de los individuos infectados y por ende, en todos aquellos objetos que puedan estar en contacto con los mismos, más aún si se tiene en cuenta que los rinovirus son capaces de sobrevivir en condiciones ambientales durante algunas horas. Así, toda persona sana que estreche una mano para un saludo o interactúe con distintos objetos infectados, y luego lleve su mano hacia la nariz u ojos, podría estar permitiendo el ingreso del virus al organismo para que ataque directamente las células del epitelio nasal (si la vía de ingreso del virus son los ojos, el pasaje se realiza a través del conducto lagrimal). También se ha demostrado que puede ocurrir la transmisión aérea de los rinovirus (2, 10).

1.3.9 Epidemiología de la infección por rinovirus

Distintos estudios longitudinales demuestran que los niveles de infección por rinovirus son mayores en los bebés y niños (2, 21, 22, 23), y decrecen a medida que la edad de las personas aumenta, probablemente debido a la mayor exposición de los adultos a este virus y a la generación previa de anticuerpos en respuesta a otras infecciones. Se considera a la familia como la unidad fundamental de diseminación de la infección viral, siendo los más pequeños quienes introducen el virus al contagiarse en escuelas o lugares públicos al que asisten. Las tasas de enfermedad observadas en

mujeres jóvenes suelen ser mayores que en hombres de la misma edad, probablemente debido al estrecho contacto de las madres jóvenes con los niños susceptibles a este virus (2, 24). En la tercera edad, la tasa de infección aumenta (25, 26) y es mayor en el género masculino (2). Numéricamente, la tasa de aislamiento del virus en personas con enfermedades respiratorias agudas (independientemente de la edad y el género) varía entre el 6% y el 23% (10).

Se han aislados rinovirus de personas con enfermedades respiratorias en todos los meses de año, sin embargo, se ha comprobado que la frecuencia de circulación en países con climas templados (como es el caso de Argentina) se incrementa en los meses de otoño y primavera (2). En climas tropicales, el pico de las infecciones respiratorias coincide con la época de mayores precipitaciones (10, 27). Por otra parte, si bien los estudios epidemiológicos más importantes se han realizado en Estados Unidos y Europa del Este, los datos de prevalencia de anticuerpos séricos indican que la infección por rinovirus se encuentra diseminada en todo el mundo (13, 14, 27, 28, 29, 30, 31).

Si bien existen numerosos serotipos de rinovirus, se ha sugerido que algunos de ellos se transmiten más frecuentemente que el resto (2), aunque, en contraposición a esto, también se ha observado que los serotipos más comunes varían año tras año, por lo que resultaría complejo establecer serotipos predominantes y más aún, asociar un serotipo determinado a una enfermedad puntual (10).

1.3.10 Respuesta inmune del huésped

Como se explicó previamente, los rinovirus tienen la capacidad de unirse a los receptores ICAM-1 o LDL e infectar las células epiteliales de la mucosa nasal. Esta

unión permite que se dispare la respuesta inmune innata del organismo, reclutando distintas citoquinas y mediadores en la zona de infección (Figura N° 7). Las primeras moléculas del sistema inmune en actuar son los macrófagos, los cuales ante la presencia del virus se activan y estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias tales como interleuquina (IL)-1, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interferón (INF)- γ , proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α y células T normales expresadas, secretadas y reguladas bajo activación (RANTES). La IL-8 es la encargada de reclutar neutrófilos en la zona infectada (generando con esto la inflamación característica de dicho lugar), la IL-1 favorece la expresión de TNF- α , la IL-6 estimula la producción de anticuerpos inmunoglobulina (Ig) G, MIP-1 α favorece la llegada de los Linfocitos T y B, y RANTES es un conjunto de factores que estimulan la activación de los eosinófilos, quienes luego estimulan la producción de IL-10 y actúan, además, como células presentadoras de antígenos a los Linfocitos T. Existe una correlación entre la concentración de estos mediadores en la zona de infección y la severidad del resfrío (19).

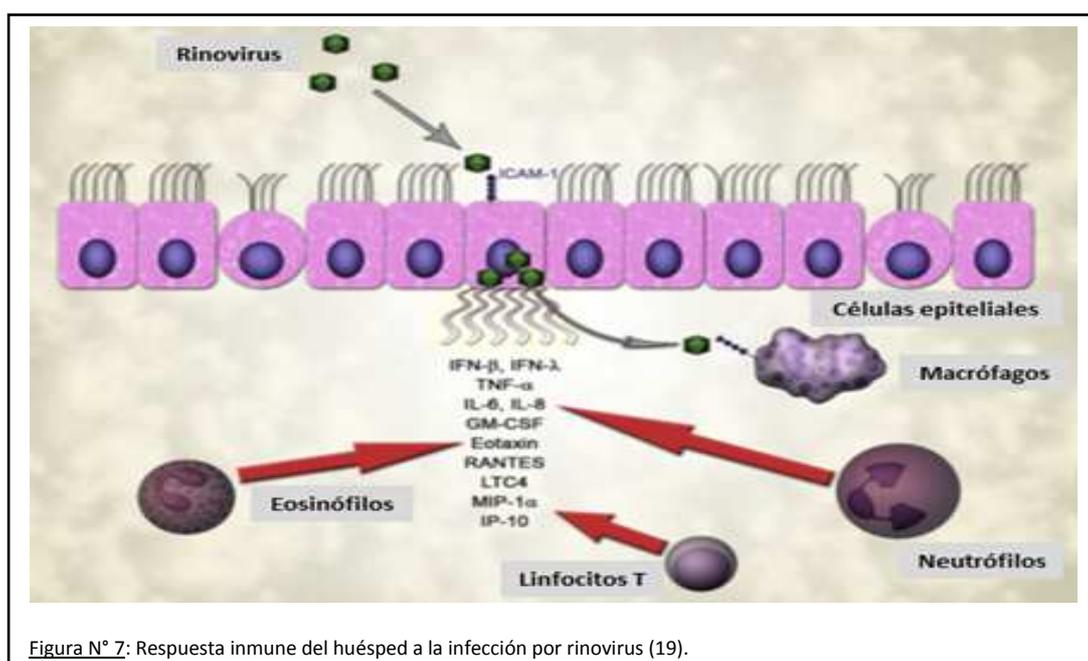


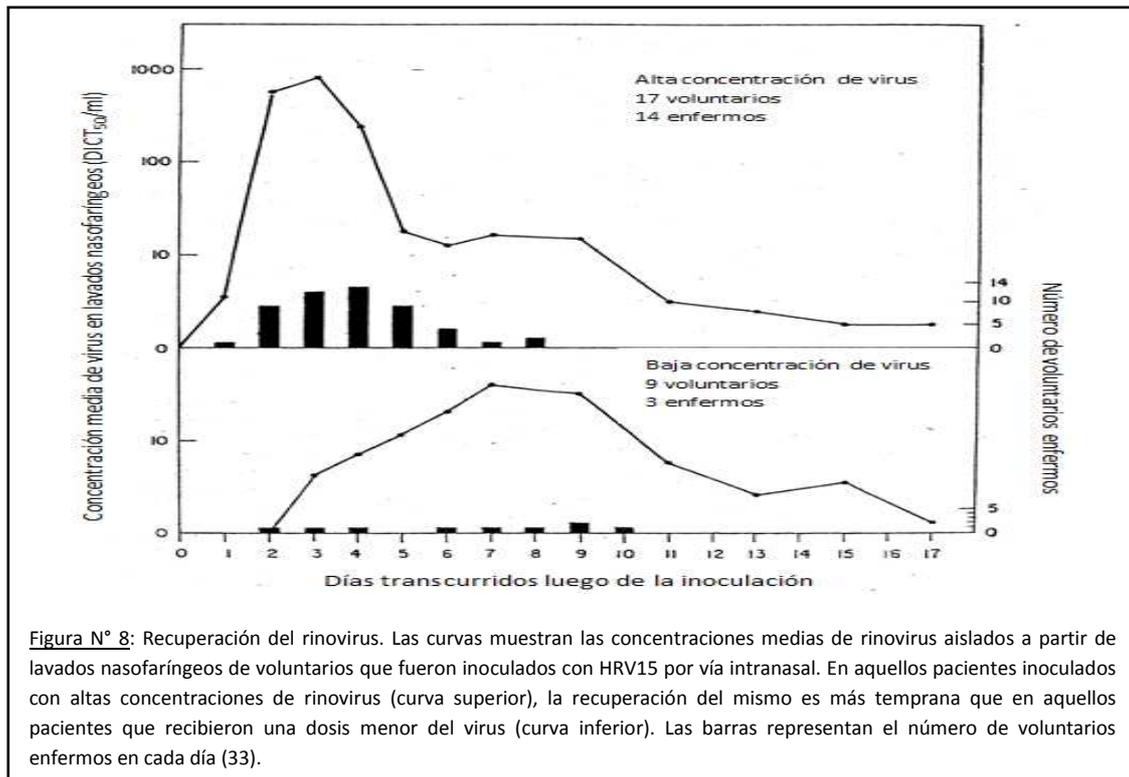
Figura N° 7: Respuesta inmune del huésped a la infección por rinovirus (19).

Una de las características de la respuesta inmune desarrollada por un individuo en respuesta a una infección por rinovirus es la aparición tardía de los anticuerpos en el suero y las secreciones nasales, por lo general, entre 7 y 14 días luego de la entrada del virus al organismo. Mediante el uso del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), pudo establecerse que en más del 70% de los individuos afectados por este virus, el anticuerpo del suero predominante es la IgG1. Durante el período agudo de la enfermedad, hay una importante migración de las proteínas séricas (sobre todo IgG estimulada por la IL-6) hacia las secreciones nasales y, finalizada esta etapa, cuando la migración cesa, comienzan a aumentar los niveles de IgA. En suero y secreciones nasales, los títulos de anticuerpos neutralizantes pueden continuar aumentando hasta 4 o 5 semanas luego de la infección primaria, y permanecen en el suero por años previniendo reinfecciones (2). El reclutamiento de los Linfocitos T, el otro componente de la respuesta inmune adaptativa del organismo, es efectuado por la acción de RANTES y el INF- γ (19).

Se ha demostrado que los pacientes asmáticos infectados con rinovirus tienen menor producción de INF- β , probablemente debido a la inactivación de proteínas esenciales para la producción de dicho componente del sistema inmune (32). Como consecuencia de esto, la proliferación del virus se ve aumentada debido a una menor apoptosis de células infectadas, lo que conduce a una mayor inflamación de la zona afectada, a una mayor obstrucción de las vías respiratorias y, por ende, a una exacerbación de los síntomas asmáticos (19).

1.3.11 Características clínicas de la infección

Rinovirus es el principal agente causante del resfrío común, afectando principalmente a los niños, aunque también a las personas mayores y a los inmunodeprimidos (25). Los estornudos, las obstrucciones y/o descargas nasales y el dolor de garganta son los síntomas predominantes del resfrío ocasionado por este virus, aunque también pueden observarse tos, dolor de cabeza y malestar en general. La fiebre no es común, ya que sólo se observa en el 10% de los pacientes. Si bien en el primer día de la enfermedad aumenta el recuento de neutrófilos en sangre periférica y disminuyen los linfocitos, al tercer día estos recuentos suelen ser normales. El período de incubación en las secreciones nasales varía de 1 a 4 días y, si bien la concentración del virus en éstas alcanza rápidamente su pico máximo y luego de un par de días decae notablemente, es posible seguir encontrando este patógeno durante varias semanas (Figura N° 8). Existe una correlación directa entre la concentración del virus en las secreciones y la severidad de la enfermedad. Así, aquellas personas que presentan un título viral alto son propensas a desarrollar enfermedades respiratorias, pudiendo no observarse ningún tipo de síntomas en aquellas personas en donde la concentración de virus es muy baja (33). El pico máximo de la enfermedad dura alrededor de tres días y pasado este período, los síntomas mejoran progresivamente. La duración media del cuadro es de 7 días, aunque en algunos pacientes este período puede prolongarse, como es el caso de los fumadores (2).



Si bien históricamente los rinovirus fueron considerados patógenos de las vías aéreas superiores, en la actualidad se ha demostrado que también ocasionan infecciones en el tracto respiratorio inferior. Hoy se sabe que, luego del virus sincicial respiratorio (VSR), el rinovirus es el segundo patógeno causante de hospitalizaciones de niños con neumonía, bronquiolitis y obstrucciones pulmonares crónicas (2, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42). Además de estar asociado a personas que presentan episodios de sibilancias recurrentes o exacerbaciones de asma y bronquitis (6, 18, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49), también ha sido posible recuperar rinovirus a partir de cultivos de fluidos de pacientes con sinusitis y otitis media aguda (2, 21, 50, 51, 52).

1.3.12 Prevención y tratamiento

Hasta el presente no existen métodos eficientes para la protección contra el rinovirus (50). La infección no puede evitarse con el uso de medicamentos o

suplementos nutricionales que mejorarían el sistema inmune de un individuo, aunque sí se ha demostrado que el uso de analgésicos, descongestivos, antihistamínicos y vitamina C, entre otros, ayudan a aliviar los síntomas del resfrío. También se ha observado que el uso de interferón por vía nasal es eficaz para evitar la propagación del virus (2).

La mayoría de los antivirales ensayados contra rinovirus no han demostrado una buena efectividad a nivel clínico (2). La multiplicidad de serotipos existentes, la variabilidad genética en las secuencias de los sitios antigénicos y el hecho de no conocer cuáles son los serotipos predominantes al carecer de una vigilancia adecuada para este virus son las principales causas que impiden el desarrollo de una vacuna efectiva (53), aunque ya se han testeado híbridos contruidos por la fusión de la proteína VP1 y de péptidos alergénicos que han producido un aumento en el título de anticuerpos, neutralizando algunos serotipos de rinovirus (54). Estudios recientes lograron descubrir un péptido de 6 aminoácidos que actúa como pseudosustrato de una proteasa viral ($2A^{pro}$) indispensable para la replicación del rinovirus, bloqueando la actividad de la misma e inhibiendo así la propagación del virus (55). Si bien este ha sido un paso muy importante, resta tiempo para el desarrollo de una vacuna clínicamente eficaz contra rinovirus.

1.3.13 Diagnóstico de laboratorio

Debido a que no pueden establecerse síntomas exclusivos que permitan diferenciar la enfermedad causada por rinovirus de infecciones producidas por otros virus respiratorios, es necesario recurrir a un análisis de laboratorio.

1.3.13.1 Selección y conservación de las muestras

Las muestras recomendadas para el aislamiento de los rinovirus son las secreciones nasofaríngeas, preferentemente tomadas dentro de los tres días de iniciados los síntomas. El aspirado nasofaríngeo (ANF) es la muestra de elección, aunque también pueden utilizarse hisopados nasales y faríngeos. Otras muestras que pueden utilizarse son los lavados broncoalveolares o biopsias de pulmón.

Una vez obtenidas las muestras, éstas deben colocarse en un medio de transporte adecuado (medio esencial mínimo con agregado de albúmina o caldo triptosa fosfato con gelatina) y almacenarse a 4-8°C (nunca deben congelarse) para su correcta conservación. Es recomendable el procesamiento de las mismas dentro de los 4 días de realizada la toma de muestra (2, 56).

1.3.13.2 Aislamiento en cultivo celular

El cultivo viral requiere de la utilización de líneas celulares para la propagación del virus, ya que éste necesita de la maquinaria celular para su replicación.

A pesar de haberse aislado inicialmente a partir de células de riñón de monos rhesus, el crecimiento eficiente de los rinovirus se observa en células humanas, principalmente las cepas WI-38 y MRC-5 de fibroblastos diploides, las células fetales de amígdalas y las líneas de células HeLa sensibles a rinovirus. Esto se explica debido a la presencia de receptores en la superficie de las células mencionadas que determinan la especificidad hacia este tipo de tejido. El medio de cultivo Eagle, suplementado con un 2% de suero fetal de ternero y antibióticos, es el recomendado para el crecimiento óptimo de estos virus, ya que cuenta con una concentración de bicarbonatos en el medio menor a 0,35 g/L, asegurando un pH que oscila entre 7 y 7,2. Es fundamental

una temperatura de incubación de 33°C y una suave agitación de los cultivos durante la incubación. En estas condiciones de trabajo, se observa un desarrollo óptimo de los rinovirus dentro de los 10-14 días de inoculados los cultivos. El crecimiento del cultivo celular, el **patrón de efectos citopáticos** observado dentro de la primera semana de incubación (cambios en la morfología de las células infectadas que se manifiestan por la visualización en el cultivo de células de tamaño pequeño y forma redondeada) y la labilidad a pH 3 permiten diagnosticar como rinovirus a un determinado aislamiento, sin embargo, la confirmación definitiva debe realizarse mediante pruebas de neutralización con antisueros específicos.

El cultivo celular permite incrementar la cantidad del patógeno estudiado, el cual, una vez propagado, puede caracterizarse o bien conservarse para futuros estudios. El elevado costo, los requerimientos en cuanto a materiales e instalaciones necesarias y los tiempos prolongados para la detección del crecimiento celular son algunas desventajas que pueden mencionarse para este procedimiento (2, 57).

1.3.13.3 Diagnóstico serológico

La multiplicidad de serotipos de rinovirus y la falta de antígenos de reactividad cruzada limitan el uso del diagnóstico serológico como herramienta para la detección de una infección causada por este virus. Los tests de macro y microneutralización, como así también las pruebas de neutralización por reducción en placa son algunos métodos serológicos que se han desarrollado, pero que sólo pueden emplearse si se conoce el serotipo de rinovirus que está ocasionando la infección (2).

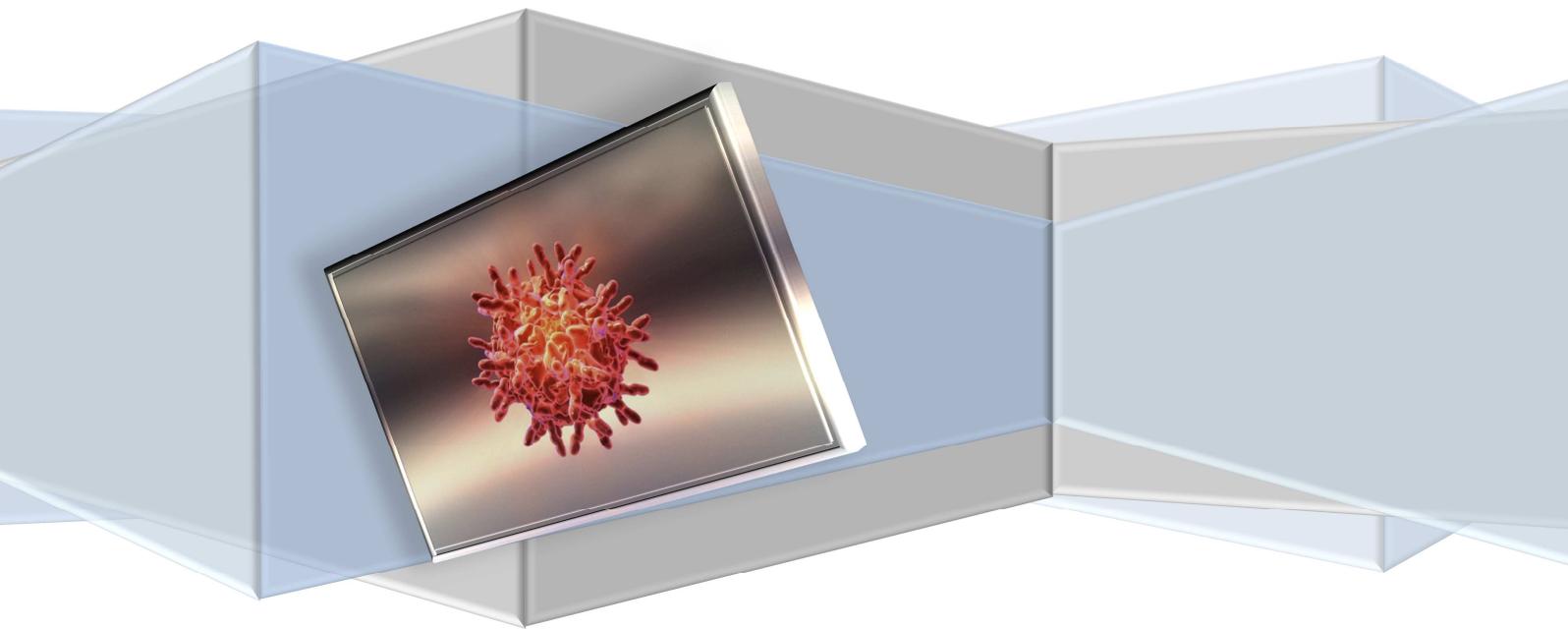
1.3.13.4 Amplificación de ácidos nucleicos

El desarrollo de la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** revolucionó el diagnóstico virológico, ya que permitió detectar con elevada sensibilidad, especificidad y rapidez un determinado grupo de virus relacionados, o bien un virus en particular, dependiendo de la región amplificada del genoma viral. Muchos virus que no podían cultivarse o que presentaban un crecimiento muy lento pudieron diagnosticarse sin mayores problemas, incluso cuando la cantidad del patógeno presente en la muestra analizada era escasa o cuando la calidad de la muestra no era óptima (2).

1.3.13.5 Diagnóstico de rinovirus por PCR

Los primeros diagnósticos de rinovirus por PCR se realizaron a finales de la década del '80, empleando primers que amplificaban pequeños fragmentos de la NCR 5' del genoma viral. Si bien constituyeron un importante avance en el estudio de estos virus, estos ensayos presentaban el inconveniente de que las regiones amplificadas también estaban presentes en la mayoría de los enterovirus, y por ende, no eran lo suficientemente específicos para caracterizar a los rinovirus en particular. Para sortear este inconveniente, debieron realizarse pasos adicionales tales como cortes con enzimas de restricción (58), utilización de sondas específicas (59, 60, 61, 62), secuenciación de amplicones de la PCR (63, 64) o desarrollo de una PCR con transcripción reversa (RT-PCR) (en algunos casos de manera anidada) con primers específicos para estos virus (57, 65, 66, 67, 68, 69). En la actualidad, ya existen protocolos de RT-PCR en tiempo real que permiten detectar a los rinovirus con notable sensibilidad y especificidad (37, 70, 71, 72, 73, 74).

PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA



2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Las enfermedades respiratorias representan uno de los principales motivos de consulta médica a nivel mundial, y se ubican entre las cinco causas más importantes de mortalidad. Estas enfermedades afectan a toda la población, aunque su prevalencia es mayor en menores de 5 años y mayores de 65 años (75). Un estudio reciente de meta-análisis demuestra que en todo el mundo 1,9 millones de niños murieron a causa de infección respiratoria aguda (IRA) en 2000, el 70% de ellos en África y el sudeste de Asia (76).

Las patologías del sistema respiratorio más frecuentes son la neumonía, la bronquiolitis y la enfermedad tipo influenza, y junto con otras, como bronquitis, coqueluche y otitis, representan la primera causa de consulta a los servicios de salud. (75). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), desde el final del período neonatal hasta los 5 años, la neumonía es una de las principales causas de muerte (77).

En Argentina, las IRAs bajas constituyen la tercera causa de muerte en los menores de 1 año (78). Más de la mitad de los pacientes menores de 1 año y el 50% de los menores de 5 años, padecen un episodio de IRA en el transcurso del primer año, ocurriendo la mayoría de las muertes antes del año de edad, especialmente entre los 2 y 3 meses (75).

En el hospital “Dr. Orlando Alassia”, uno de los hospitales en los que se realizó este estudio y referente para la región centro-norte de la provincia de Santa Fe, se registraron 13988 internaciones durante 2010, de las cuales 2797 (19,9%) correspondieron a IRAs, siendo el 55% menores de 1 año de edad.

La infección viral es una causa importante de enfermedad respiratoria entre los menores de 5 años (79, 80). Aproximadamente 400000 niños son hospitalizados en los Estados Unidos cada año con un diagnóstico clínico de infección viral del tracto respiratorio inferior, pero históricamente, solamente la mitad de estos pacientes tienen una etiología viral identificada como la causa de su enfermedad. Los patógenos virales más frecuentes causantes de IRA son el VSR, influenza, parainfluenza, adenovirus, metapneumovirus, coronavirus y rinovirus (81).

Existe una proporción sustancial de infecciones del tracto respiratorio que permanecen sin diagnosticar. En diferentes estudios de etiología, en el 12-39% de los casos no han sido detectados agentes etiológicos, sugiriendo que agentes desconocidos podrían estar involucrados.

El diagnóstico virológico es necesario para determinar la etiología de las IRAs, ya que los cuadros clínicos producidos por los distintos virus suelen ser similares. Además, permite restringir el uso de antibióticos (ATB) innecesarios en niños con IRA con el consiguiente impacto en la disminución de los efectos adversos, resistencia bacteriana y costos, así como detectar la presencia de brotes. Para niños con riesgo de enfermedad severa (prematurez y enfermedad cardíaca congénita, entre otras), el diagnóstico viral temprano es útil, ya que en ellos, por ejemplo, una infección por VSR frecuentemente conduce a una IRA grave, requiriendo el monitoreo de la enfermedad y en el caso de deterioro, la hospitalización temprana (79).

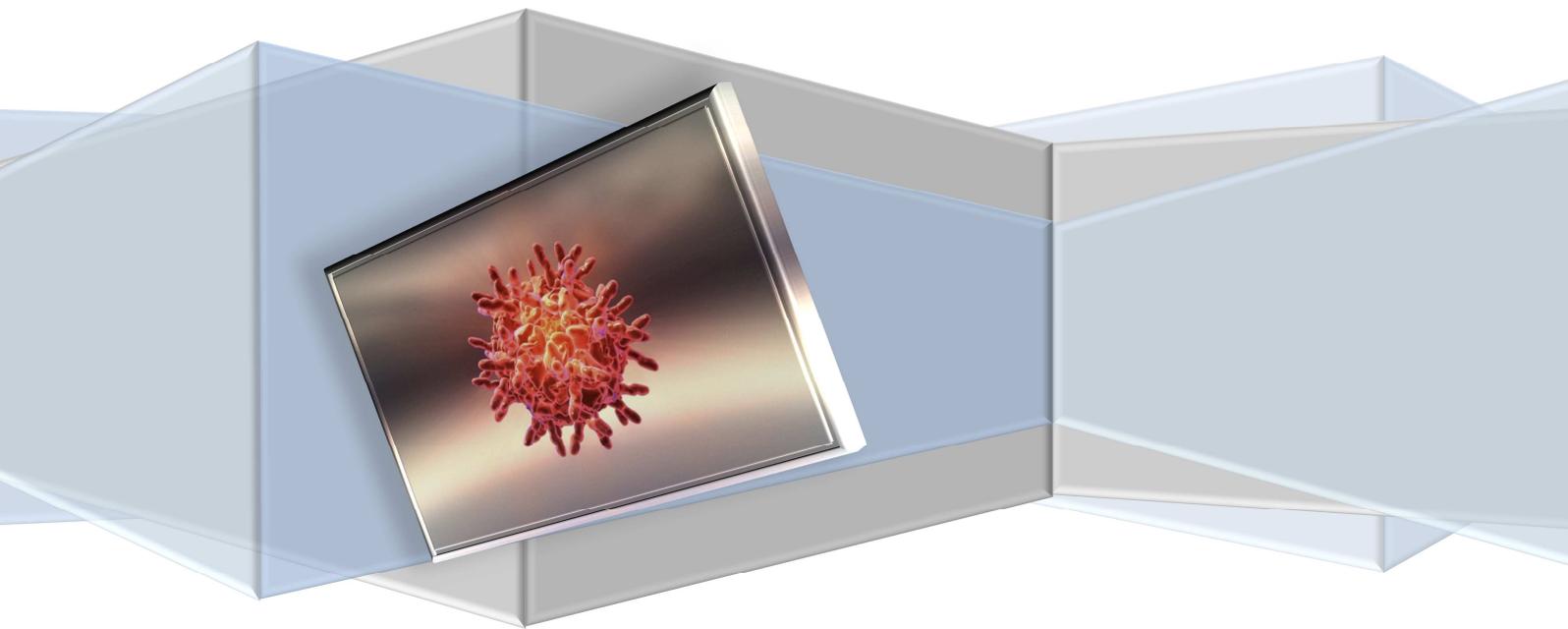
Por otro lado, el cultivo celular ha sido históricamente el “gold standard” para la detección en el laboratorio de los virus respiratorios, pero requiere de varios días para que el resultado esté disponible y además, muchos virus no se cultivan fácilmente.

Sumado a esto, debemos tener en cuenta los elevados costos y la infraestructura necesaria que demanda el desarrollo de esta técnica. La detección de antígenos virales por inmunofluorescencia (IF) tiene una sensibilidad limitada, requiere de experiencia en la observación microscópica y no está disponible para todos los virus respiratorios (81). Las técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos por PCR son significativamente más sensibles que los métodos citados previamente. Dicha superioridad analítica ha sido enunciada por Hyypiä y col. (57), quienes comparando ambas técnicas demostraron que la sensibilidad de una RT-PCR es 30% mayor que la correspondiente a un cultivo celular.

El rinovirus es uno de esos agentes virales cuya identificación se ha incrementado con el uso de técnicas de biología molecular como la PCR (82).

Los estudios que se han publicado acerca de las infecciones por rinovirus en niños hospitalizados en Argentina son escasos y están centrados en la población pediátrica de Buenos Aires. Este hecho y la falta de estudios en otras regiones del país motivaron la realización de este trabajo. El presente estudio aportará un mejor conocimiento acerca de la epidemiología y la relevancia clínica del rinovirus, aspectos sumamente importantes para el manejo terapéutico del niño y para la implementación de políticas de prevención y nuevas estrategias de tratamiento de la enfermedad respiratoria viral.

OBJETIVOS



3. OBJETIVOS

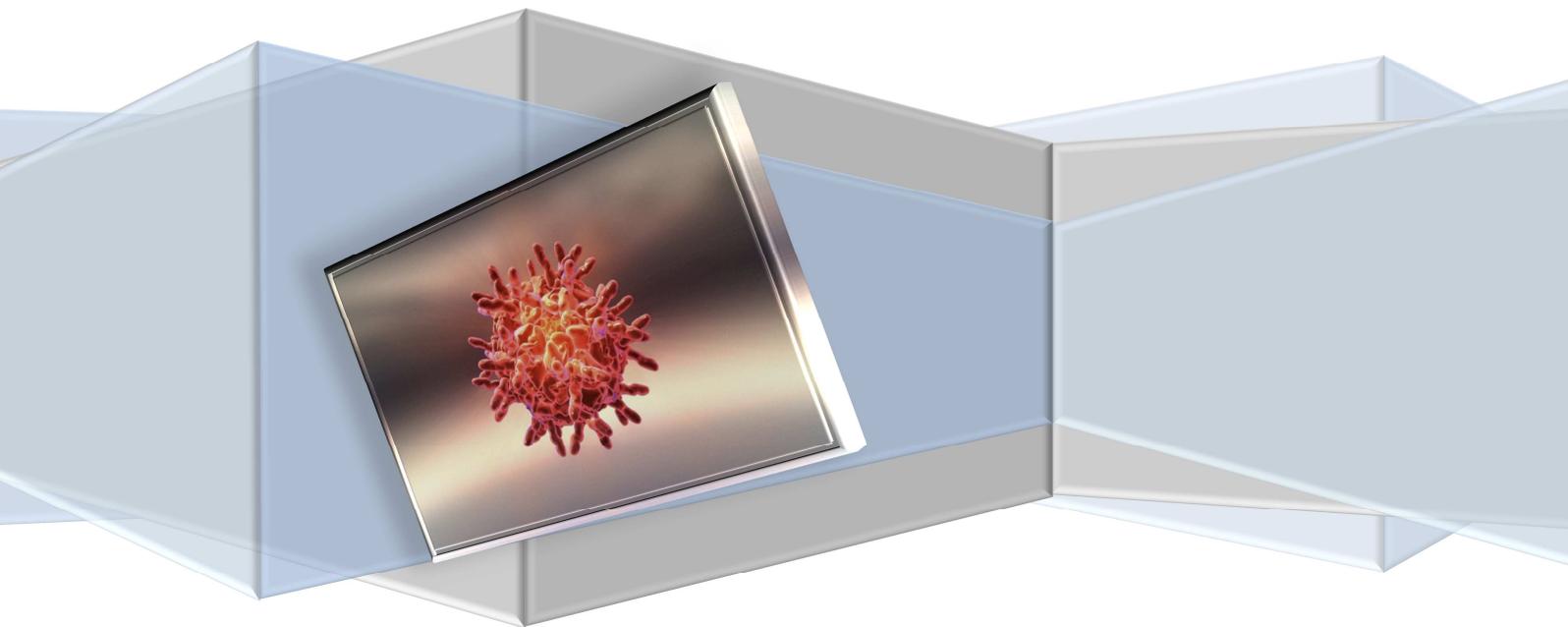
3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el rol del rinovirus en una población de niños hospitalizados con IRA de la ciudad de Santa Fe, Argentina, durante el período comprendido entre marzo de 2010 y febrero de 2011.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Seleccionar y optimizar una técnica de RT-PCR de punto final para la detección de rinovirus en muestras respiratorias.
- ✓ Conocer la frecuencia y estacionalidad del rinovirus durante el período estudiado.
- ✓ Analizar aspectos clínicos y epidemiológicos de los pacientes en cuyas muestras se detectó el genoma del rinovirus.

MATERIALES Y MÉTODOS



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 LUGAR Y PERÍODO DEL ESTUDIO

El estudio se concentró desde marzo de 2010 hasta febrero de 2011 en la ciudad de Santa Fe, provincia de Santa Fe, Argentina. Esta ciudad se caracteriza por presentar un clima subtropical pampeano, con temperaturas y precipitaciones más elevadas entre los meses de octubre y abril de cada año. Las menores temperaturas se registran durante los meses de julio y agosto.

4.2 POBLACIÓN

4.2.1 Criterio de inclusión

Se estudiaron niños menores de 15 años internados en los hospitales “Dr. Orlando Alassia”, “Dr. José Bernardo Iturraspe”, “Dr. Emilio Mira y López” y “Dr. Manuel Rodríguez” con diagnóstico de IRA en el momento de la admisión.

4.2.2 Criterio de exclusión

Se excluyeron del estudio pacientes ingresados con otros diagnósticos y que adquirieron posteriormente la IRA, o pacientes con infecciones intrahospitalarias. Teniendo en cuenta este criterio, se excluyeron 19 pacientes en los cuales se detectó el rinovirus.

4.3 MUESTRAS

Las muestras consistieron en ANF recolectados por personal de los nosocomios y que se derivaron a la Sección Virología del Laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Emilio Coni” para su procesamiento.

4.4 TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

La detección de antígenos virales se realizó mediante la técnica de IF indirecta para los siguientes virus respiratorios: VSR, adenovirus, influenza A, influenza B y parainfluenza, utilizando anticuerpos monoclonales específicos e IgG de cabra anti IgG de ratón conjugado a isocianato de fluoresceína (Chemicon). La detección de influenza A e influenza B se realizó además mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real.

La detección de rinovirus se realizó en muestras en las cuales no se detectaron antígenos virales por IF para los virus mencionados anteriormente. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su análisis para la correcta conservación del material genómico.

4.5 TAMAÑO Y SELECCIÓN MUESTRAL

Para el cálculo del tamaño muestral, se utilizó una frecuencia estimada de casos de rinovirus entre las muestras respiratorias negativas a los anticuerpos monoclonales específicos para otros virus del 40%. Considerando que durante el periodo analizado en este estudio el total de ANF en los que no se identificaron antígenos de virus respiratorios mediante IF fue de 1762, un nivel de confianza del 95%, una prevalencia esperada de rinovirus del 40% y un error del 4%, el número mínimo de muestras a estudiar resultó ser de 434 muestras respiratorias negativas al panel de anticuerpos virales.

Se analizaron al azar un total de 452 ANF durante el período estudiado, con la siguiente distribución mensual: 28 muestras en el mes de marzo, 36 muestras en el mes de enero, 37 muestras en los meses de mayo, octubre y diciembre, 38 muestras

en el mes de agosto, 39 muestras en los meses de julio y noviembre, 40 muestras en los meses de abril, junio y febrero, y 41 muestras en el mes de setiembre.

4.6 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL GENOMA VIRAL

La obtención y purificación del ARN viral de las muestras clínicas seleccionadas se realizó utilizando el kit QIAamp® Viral RNA (QIAGEN®), mediante las técnicas manual y automatizada. Para la extracción automatizada se utilizó el equipo QIAcube®. El etanol absoluto empleado fue de calidad A.C.S. (Sintorgan) y para las etapas de centrifugación durante el desarrollo de la técnica manual se utilizó una microcentrífuga refrigerada 5415 R (Eppendorf).

En el procedimiento de extracción, la muestra fue inicialmente lisada en condiciones altamente desnaturalizantes para inactivar las RNAsas, empleando Buffer AVL, que contiene tiocianato de guanidina como agente caotrópico, con el agregado de ARN Carrier, que asegura la obtención óptima del ARN viral. El lisado se cargó en una columna que posee una membrana de sílica gel que tiene la capacidad de unir reversiblemente el ARN extraído de las muestras, previo agregado de etanol absoluto para ajustar las condiciones óptimas del proceso de unión del ARN a la membrana. Los contaminantes se eliminaron mediante el uso de dos buffers de lavado (Buffers AW1 y AW2), y finalmente el ARN extraído se eluyó de la columna mediante el empleo de Buffer AVE libre de RNAsas (83).

El protocolo de extracción de ARN viral para grupos de 12 muestras consistió en los pasos que se detallan a continuación:

1. Descongelar las muestras a temperatura ambiente o en un baño a 25°C.

2. Mezclar en un tubo plástico 7,28 ml de Buffer AVL y 72,8 ul de RNA Carrier, el cual se prepara agregando 310 ul de Buffer AVE a 310 ug de RNA Carrier liofilizado provisto por el kit.
3. Rotular tubos de 1,5 ml y agregar a cada uno 560 ul de mezcla Buffer AVL–RNA Carrier preparado en el paso anterior.
4. Agregar 140 ul de muestra en los tubos correspondientes.
5. Vortexear durante 15 segundos cada tubo.
6. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente o en un baño a 25°C.
7. Agregar 560 ul de etanol absoluto a cada tubo.
8. Vortexear durante 15 segundos cada tubo.
9. Tomar 700 ul del cada lisado y colocarlos en las columnas de extracción rotuladas, dejando caer el líquido en el centro de la columna.
10. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
11. Descartar el filtrado y agregar el resto del lisado.
12. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto y descartar el filtrado.
13. Agregar 500 ul de Buffer AW1.
14. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto y descartar el filtrado.
15. Agregar 500 ul de Buffer AW2.
16. Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos.
17. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto más para secar la columna y descartar el filtrado.
18. Colocar la columna en nuevos tubos de 1,5 ml rotulados.
19. Agregar 60 ul de Buffer AVE para la elución del ARN.
20. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
21. Descartar las columnas y almacenar el ARN extraído a -70°C hasta su análisis.

En el caso de la extracción automatizada del material genómico, se realizaron los pasos 1-6 según el protocolo anterior, y luego se colocaron los lisados, las columnas de extracción y el resto de los reactivos necesarios en el equipo automático de extracción QIAcube® (QIAGEN®), según indicaciones del fabricante.

4.7 RT-PCR

4.7.1 Controles de amplificación

El control positivo de rinovirus fue cedido por la Dra. Clara Savón-Valdéz, investigadora del Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología, dependiente del Instituto “Pedro Kouri” de La Habana, Cuba. El control de reactivos se realizó con el agregado de agua destilada ultrapura (Genbiotech) en lugar de muestra. Estos controles de amplificación se incluyeron en cada una de las reacciones de RT-PCR de las muestras estudiadas.

4.7.2 Optimización de la RT-PCR de punto final

4.7.2.1 Transcripción reversa

Para la obtención del ADN copia (ADNc) se evaluaron dos alternativas diferentes sugeridas en los protocolos de los fabricantes de las enzimas utilizadas previas al proceso de transcripción reversa del ARN propiamente dicho. Se utilizó el control positivo para la evaluación de los dos procedimientos.

El primer procedimiento consistió en realizar una incubación del ARN previa al desarrollo de la transcripción reversa (RT) durante 5 minutos a 65°C (este paso es recomendado cuando el templado de ARN es rico en secuencias GC o contiene estructuras secundarias). Para ello, se agregaron 10 ul de ARN a una mezcla de reacción conteniendo 1 ul de Random Hexamers (100 pmol) y la cantidad de agua destilada ultrapura necesaria para obtener un volumen total de reacción de 13 ul. Finalizada la incubación inicial, este volumen se agregó a una nueva mezcla de reacción conteniendo 1 ul de RevertAid™ Reverse Transcriptase (200 U/ul, Fermentas), 4 ul de Buffer 5X (Tris-HCl 250 mM, KCl 250 mM, MgCl₂ 20 mM, DTT 50 mM, Fermentas) y 2 ul

de dNTP mix (10 mM c/u, Genbiotech). Las concentraciones mencionadas corresponden a concentraciones iniciales de los reactivos.

El segundo procedimiento se diferenció del anterior en que no se realizó la incubación previa al procedimiento de RT y el ARN sin incubar (10 ul) fue agregado a los componentes de la mezcla de reacción de la RT.

Las condiciones del proceso de transcripción para la obtención del ADNc fueron: incubar durante 10 minutos a 25°C, luego 60 minutos a 42°C y finalmente 10 minutos a 70°C para inactivar la enzima transcriptasa reversa. Las etapas de incubación se efectuaron en un bloque térmico AccuBlock® (Labnet International, Inc.). Las muestras de los ADNc obtenidos se conservaron a -20°C hasta su procesamiento por PCR.

4.7.2.2 PCR

Las secuencias de los primers sintetizados (Eurofins MGW Operon) para detectar la presencia del genoma del rinovirus, seleccionadas de la NCR 5', y las condiciones de ciclado, obtenidas a partir del estudio realizado por Steininger y col. (84), se detallan en las Tablas N° 1, N° 2 y N° 3.

Tabla N° 1: Secuencias de primers utilizados en los ensayos de PCR.

| Oligonucleótido | Secuencia |
|-----------------|-------------------------------|
| RV1 | 5'-CCCCTGAATGCTGGCTAACCT-3' |
| RV2 | 5'-CGGACACCCAAAGTAGTCTGGTC-3' |
| RV3 | 5'-GAATGCTGGCTAACCTTAAACCC-3' |
| RV4 | 5'-CAAAGTAGTCTGGTCCCAGTCC-3' |

Tabla N° 2: Programa de ciclado utilizado para la primera reacción de PCR.

| Número de ciclos | Temperatura | Tiempo |
|------------------|-------------|--------|
| 50 | 94°C | 20 seg |
| | 60°C | 30 seg |
| | 72°C | 9 seg |
| 1 | 72°C | 5 min |

Tabla N° 3: Programa de ciclado utilizado para la PCR anidada.

| Número de ciclos | Temperatura | Tiempo |
|------------------|-------------|--------|
| 1 | 94°C | 10 min |
| 45 | 94°C | 15 seg |
| | 60°C | 30 seg |
| | 72°C | 8 seg |
| 1 | 72°C | 5 min |

Para la optimización de la amplificación de los segmentos correspondientes, se trabajó con un volumen final de 25 ul, utilizando reactivos comerciales. La reacción se llevó a cabo en una mezcla de reacción conteniendo 5 ul del ADNc de la muestra control, 0,1 ul de Taq DNA polymerase (5 U/ul, Fermentas), 2,5 ul de Taq Buffer 10X (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, Nonidet P40 0,8% (v/v), Fermentas), dNTP mix (10 mM c/u) y MgCl₂ (25 mM, Fermentas) en concentraciones apropiadas, 0,25 ul de primer RV1 (50 mM), 0,25 ul de primer RV2 (50 mM) y agua destilada ultrapura en cantidad suficiente. Para la PCR anidada, se tomaron 2 ul del amplificado anterior y se colocaron en una mezcla de reacción idéntica a la detallada anteriormente, con la excepción de los primers que fueron reemplazados por los primers RV3 y RV4 en concentraciones idénticas. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Techne Genius con el programa específico para cada etapa.

En primer lugar, se evaluó la concentración de $MgCl_2$ y en segundo lugar, la de dNTPs. En el primer caso, se probaron concentraciones finales crecientes de 1 a 4 mM, manteniendo el resto de los reactivos en concentraciones constantes. En segundo lugar, la concentración de dNTPs se tituló en un rango de concentración final de 0,1 a 0,3 mM, con las mismas condiciones para los reactivos restantes.

4.7.3 Aplicación de ensayo de RT-PCR en muestras clínicas

Para el estudio de las muestras clínicas, las mezclas de reacción y las condiciones de ciclado de ambas PCR fueron idénticas a las detalladas anteriormente. No se realizó la incubación previa al procedimiento de RT, y las concentraciones utilizadas de $MgCl_2$ y dNTPs fueron 2 mM y 0,2 mM, respectivamente.

4.7.4 Evaluación de la especificidad de la RT-PCR

Con el propósito de evaluar la especificidad de la RT-PCR optimizada en este estudio, se seleccionaron muestras positivas para VSR, parainfluenza, adenovirus, influenza A, influenza B y metapneumovirus, y se realizó la RT-PCR en idénticas condiciones que las muestras ensayadas para rinovirus.

4.7.5 Visualización de los productos de PCR

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa ultrapura (BIORAD) con una concentración del 2%. Para su preparación se empleó Buffer TAE 1X (Tris-Acetato 400 mM, EDTA 10 mM, Gibco), con el agregado de 5 ul de Gel Red® 10000X (Biotium) para la visualización del ADN. Una vez completado el proceso de gelificación, se sembraron 12,5 ul de una mezcla compuesta por 12,5 ul de cada amplificado y 2,5 ul de Buffer de siembra 6X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 60 mM, azul de bromofenol 0,03%, xileno cianol FF 0,03%, glicerol 60%, Genbiotech). Como

marcador de tamaño se utilizó una mezcla de fragmentos de ADN de 100 pb (Solis Biodyne). Todos los reactivos detallados fueron de grado biología molecular. Las corridas electroforéticas se realizaron en una cuba electroforética BIORAD, empleando TAE 1X como buffer de corrida, a 120 V y 292 mA durante 45 minutos. Los fragmentos de ADN resueltos en el gel se visualizaron en el equipo fotográfico LAS-3000 (FujiFilm).

4.7.6 Precauciones del procedimiento

Se tomaron diversas precauciones para evitar contaminaciones. Durante el desarrollo de las reacciones de RT-PCR se respetaron el flujo unidireccional de trabajo y las normas de bioseguridad. Además de la separación física de los procedimientos de post-amplificación, extracción de ARN y preparación de Master-Mix, se utilizaron puntas de micropipetas con barreras descartables y se trataron las superficies de trabajo con solución de hipoclorito de sodio al 10% y radiación ultravioleta.

4.8 INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se utilizó como instrumento una planilla clínico-epidemiológica estandarizada para recolectar los datos personales, antecedentes perinatales (semanas de gestación, peso al nacer, patología neonatal), diagnóstico de admisión, diagnóstico de egreso, enfermedades subyacentes, hallazgos radiológicos, hallazgos de laboratorio, tratamiento y evolución (días de hospitalización, oxigenoterapia, internación en terapia intensiva, requerimientos de asistencia respiratoria) de cada caso de IRA atribuible a rinovirus (CARV). Las fichas clínico-epidemiológicas fueron completadas por profesionales de los distintos hospitales a partir de la información detallada en las historias clínicas de los pacientes.

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez disponible la información, se generó una base de datos, haciendo uso del software Epi Info™ 3.5.3., en donde fueron ingresados todos los datos recolectados. El análisis clínico-epidemiológico y estadístico de los resultados se realizó utilizando la herramienta “*Analyze data*” de dicho software.

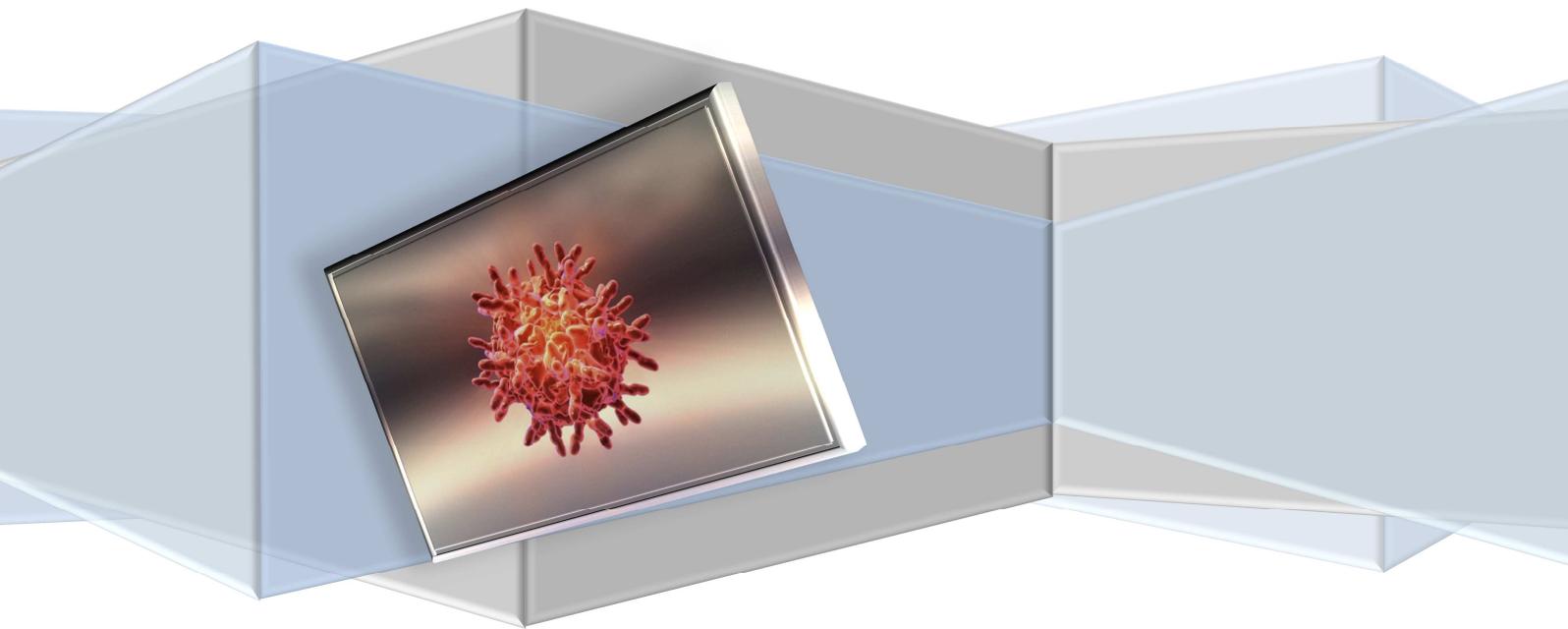
Las variables continuas se expresaron como *media* y *rango*, y las variables categóricas, como *proporciones*. El **test chi-cuadrado Mantel-Haenszel** se utilizó para comparar variables discretas, mientras que el **test Mann-Whitney** se empleó para comparar variables continuas. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Definiciones

La severidad de la enfermedad fue clasificada en **moderada** y **severa**, de forma similar a Bicer y col. (80). La **enfermedad moderada** fue descrita como aquella que presenta signos/síntomas del tracto respiratorio superior/inferior que requieran hospitalización en salas de internación generales. La **enfermedad severa** fue descrita como aquella que presenta signos/síntomas del tracto respiratorio inferior que requieran hospitalización en cuidados intensivos.

Se consideró **caso de IRA atribuible a rinovirus (CARV)** a todo paciente con IRA que presentó PCR positiva para rinovirus, resultado negativo de IF para VSR, influenza A, influenza B, parainfluenza y adenovirus, y ausencia de aislamiento bacteriano en hemocultivo.

RESULTADOS



5. RESULTADOS

5.1 SELECCIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR

Con el objetivo de seleccionar la técnica de RT-PCR a optimizar en este estudio, se analizaron distintos trabajos publicados, los cuales utilizaron diferentes estrategias para la detección del rinovirus: la técnica de RT-PCR simple, anidada o combinada con enzimas de restricción. En la Tabla N° 4 se mencionan los parámetros que se evaluaron para la selección de la técnica.

Tabla N° 4: Comparación de RT-PCR para detección de rinovirus según distintas técnicas estudiadas, PM del genoma amplificado, especificidad y sensibilidad, número de serotipos de rinovirus estudiados y número de muestras analizadas.

| AUTOR | TÉCNICA EMPLEADA | PM DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO (pb) | SENSIBILIDAD (%) | ESPECIFICIDAD (%) | N° DE SEROTIPOS DE RV ESTUDIADOS | N° DE MUESTRAS ESTUDIADAS |
|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------|-------------------|----------------------------------|---------------------------|
| Olive y col. (1990) | RT-PCR simple | 530 | 96,4 | 100 | 3 | 28 |
| Papadopoulos y col. (1999) | RT-PCR + enzimas de restricción | 190 | 100 | 92,4 ¹ | 18 | 32 |
| Papadopoulos y col. (1999) | RT-PCR anidada | 202 | 100 | NE ² | 18 | 32 |
| Halonen y col. (1995) | RT-PCR + detección con sondas | 120 | 97,2 | NE ³ | 15 | 63 |
| Arruda y col. (1993) | RT-PCR anidada | 110 | 93 | 100 | 2 | 31 |
| Ireland y col. (1993) | RT-PCR anidada | 202 | 100 | 100 | 1 | 159 |
| Hyypiä y col. (1998) | RT-PCR anidada | 120 | 98 | NE ⁴ | 5 | 192 |
| Steininger y col. (2001) | RT-PCR anidada | 93 | 100 | 100 | 87 | 556 |

NE: porcentaje no especificado. ¹ Los genomas de Echovirus 32 y Coxsackievirus B6 fueron digeridos por las enzimas de restricción de manera similar a los rinovirus; ² los genomas de Poliovirus 1, Poliovirus 2 y Poliovirus 3 fueron amplificados por los primers utilizados; ³ los genomas de Echovirus 5, Echovirus 18 y Echovirus 30 fueron detectados por las sondas utilizadas; ⁴ el genoma de Coxsackievirus A9 fue amplificado por los primers utilizados.

La técnica seleccionada fue la propuesta por Steininger y col. (84), ya que reportó una sensibilidad y especificidad del 100%, estudió la mayoría de los serotipos de rinovirus conocidos y analizó un número elevado de muestras clínicas (Tabla N° 5).

Tabla N° 5: Resultados de la técnica de RT-PCR frente a serotipos de rinovirus y otras cepas de virus de referencia estudiados.

| Positivo | Negativo |
|----------|----------------------|
| RV 1A | Coxsackievirus B1-B6 |
| RV 1B | Echovirus 18, 24, 30 |
| RV 2-9 | Poliovirus 1-3 |
| RV 11-15 | Influenza A (H3N2) |
| RV 17-19 | Influenza B/Harbin |
| RV 21-24 | Adenovirus 5 |
| RV 26-89 | VSR |

La RT-PCR anidada permitió la amplificación de un fragmento de la NCR 5'. Los primers diseñados para este ensayo amplifican zonas de alta homología entre los serotipos del rinovirus (regiones B y C, Figura N° 9), generando un producto final de 93 pb (Figuras N° 9 y N° 10).

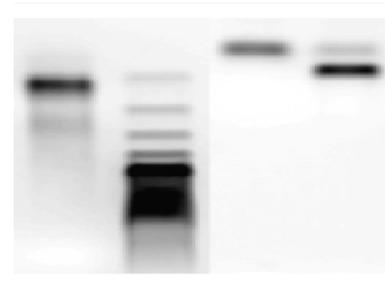
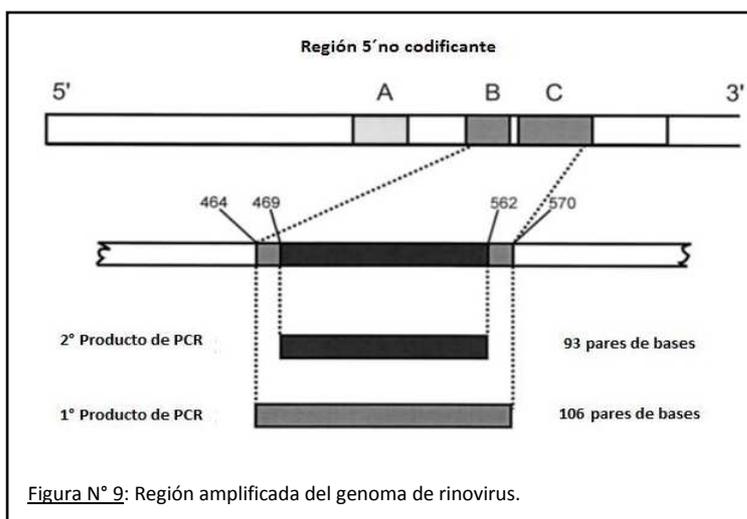


Figura N° 10: Gel de agarosa en donde se visualizan los amplicones de la RT-PCR optimizada. Calle 1: fragmento de 106 pb obtenido luego de la primera PCR; calle 2: marcador de PM de 100 pb; calle 3: control negativo con agua destilada; calle 4: fragmento de 93 pb obtenido luego de la PCR anidada.

5.2 OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Se optimizó la RT-PCR trabajando con el control positivo y se analizó la conveniencia de realizar o no, una incubación a 65°C durante 5 minutos previa a la reacción de RT. En ambos procedimientos se visualizó el producto final de 93 pb (Figura N° 11), pero la intensidad de la banda de la muestra control fue mayor cuando la incubación previa no fue realizada. Teniendo en cuenta que esta incubación es aconsejable cuando el porcentaje de secuencias GC es alto (en este caso el contenido de GC es del 40,6%) y observando los resultados obtenidos en este estudio, se decidió no realizar la incubación previa.

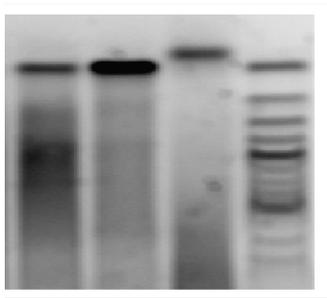


Figura N° 11: Optimización de la RT-PCR. Calle 1: producto de 93 pb con una cantidad inicial de ARN de 10 ul y una incubación (65°C, 5 min) previa a la RT; calle 2: producto de 93 pb con una cantidad inicial de ARN de 10 ul sin incubación previa a la RT; calle 3: control negativo con agua destilada; calle 4: marcador de PM de 100 pb.

5.3 OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO DE AMPLIFICACIÓN

Dentro de los parámetros críticos de un ensayo de RT-PCR, se analizaron las concentraciones óptimas de $MgCl_2$ y dNTPs.

5.3.1 Concentración de $MgCl_2$

Cuando la concentración final de $MgCl_2$ en la mezcla de reacción fue 2 mM, se detectó una banda adecuada (Figura N° 12). Para el resto de las concentraciones ensayadas, no se observaron las bandas esperadas en el gel de agarosa o bien éstas

fueron tenues, por lo cual se decidió que la concentración más apropiada para esta reacción fuera 2 mM.

5.3.2 Concentración de dNTPs

Analizando la imagen de la Figura N° 13, el producto final de PCR se visualizó con concentraciones de dNTPs de 0,1 mM y 0,2 mM, siendo casi imperceptible con una concentración de 0,3 mM. A pesar de que con una concentración de 0,1 mM la banda fue levemente más intensa, se optó por la concentración final de 0,2 mM en las mezclas de reacción para el análisis de las muestras del estudio, al no observar productos inespecíficos y para garantizar cantidad suficiente de dNTPs.

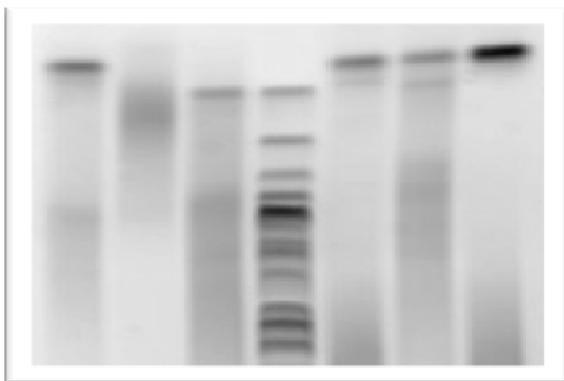


Figura N° 12: Variación de la concentración final de $MgCl_2$ en las mezclas de reacción de las PCR. Calle 1: control negativo de reactivos; calle 2: concentración final de 1 mM; calle 3: concentración final de 2 mM; calle 4: marcador de PM de 100 pb; calle 5: concentración final de 3 mM; calle 6: concentración final de 4 mM; calle 7: control negativo con agua destilada.

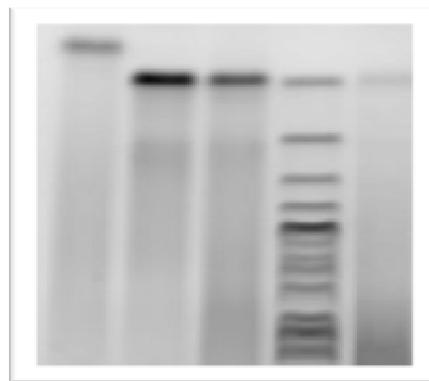


Figura N° 13: Variación de la concentración final de dNTPs en las mezclas de reacción de las PCR. Calle 1: control negativo con agua destilada; calle 2: concentración final de 0,1 mM; calle 3: concentración final de 0,2 mM; calle 4: marcador de PM de 100 pb; calle 5: concentración final de 0,3 mM.

5.4 ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA

La RT-PCR optimizada en este trabajo demostró ser altamente específica para la detección de rinovirus, ya que cuando la misma se realizó utilizando muestras con otros virus respiratorios no se observó el producto final de 93 pb (Figura N° 14).

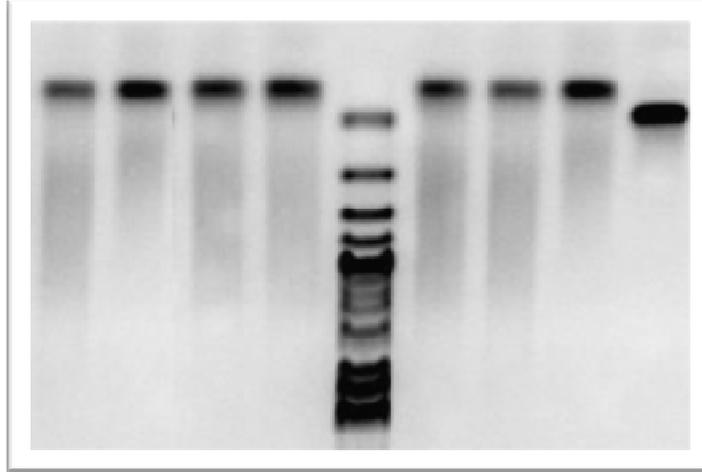


Figura N° 14: Especificidad de la PCR para detección de rinovirus. Calle 1: control negativo con agua destilada; calle 2: control positivo de VSR; calle 3: control positivo de parainfluenza; calle 4: control positivo de adenovirus; calle 5: marcador de PM de 100 pb; calle 6: control positivo de influenza A; calle 7: control positivo de influenza B; calle 8: control positivo de metapneumovirus; calle 9: control positivo de rinovirus.

5.5 APLICACIÓN DE ENSAYO DE RT-PCR EN MUESTRAS CLÍNICAS

Una vez estandarizada la técnica de RT-PCR, se aplicó esta metodología en muestras clínicas provenientes de pacientes que cumplían con los criterios de inclusión del estudio.

Se seleccionaron aquellas muestras en las cuales no se detectaron los demás virus respiratorios estudiados.

5.5.1 Frecuencia y estacionalidad del rinovirus y otros virus respiratorios

Durante el período estudiado, sobre un total de 2020 muestras respiratorias provenientes de pacientes con IRA para el diagnóstico virológico, se seleccionaron 452 para la detección del rinovirus. De las 452 muestras estudiadas, se detectó el genoma del rinovirus en 172, lo que representa un porcentaje de positividad para rinovirus del 38,1%.

El análisis de la distribución mensual del rinovirus indicó que circuló a lo largo de todo el año estudiado, aunque los meses de mayor circulación fueron marzo y octubre de 2010, y febrero de 2011, con porcentajes de positividad que variaron entre 16,7% y 26,7% (Gráfico N° 1). En los meses en los cuales se observó mayor circulación de VSR (mayo a julio), se detectó un bajo número de casos confirmados de rinovirus, el cual comenzó a aumentar a partir del mes de octubre, y predominando respecto de los otros virus respiratorios. Analizando las frecuencias de los diferentes virus respiratorios, los resultados demostraron que el rinovirus se ubicó en segundo lugar con un porcentaje del 8,5%, luego del VSR (10,4%) (Gráfico N° 2).

La frecuencia de los virus respiratorios a lo largo del año de estudio se describe en la Tabla N° 6.

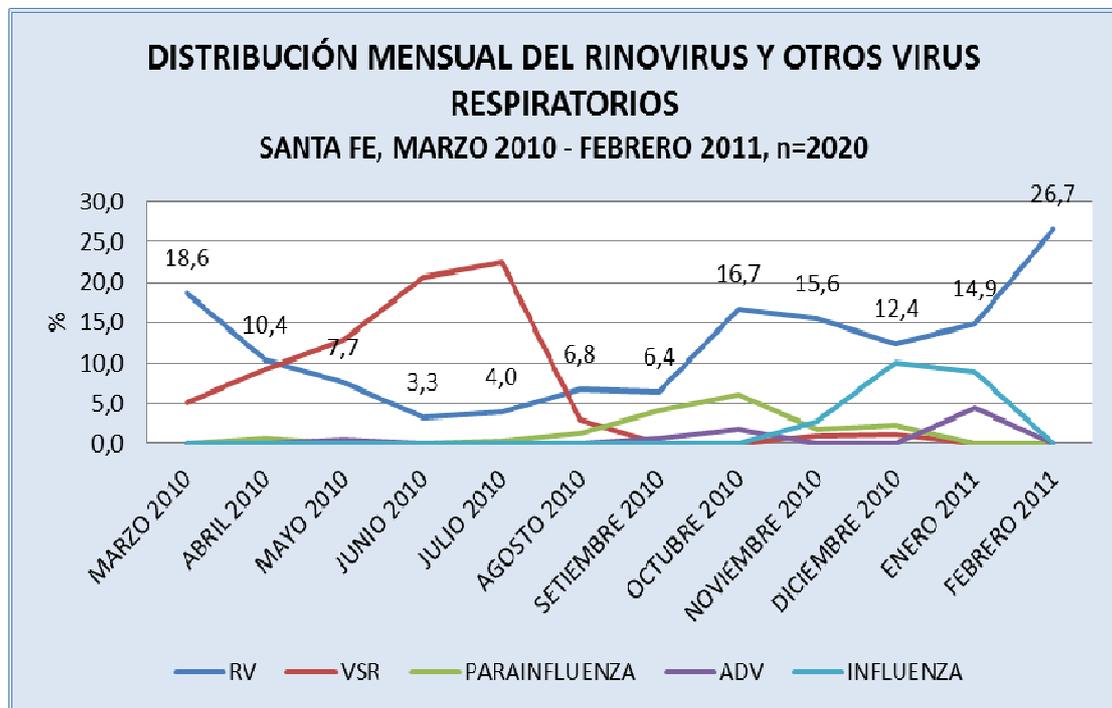


Gráfico N° 1: Distribución mensual del rinovirus y otros virus respiratorios, marzo 2010-febrero 2011, Santa Fe, Argentina.

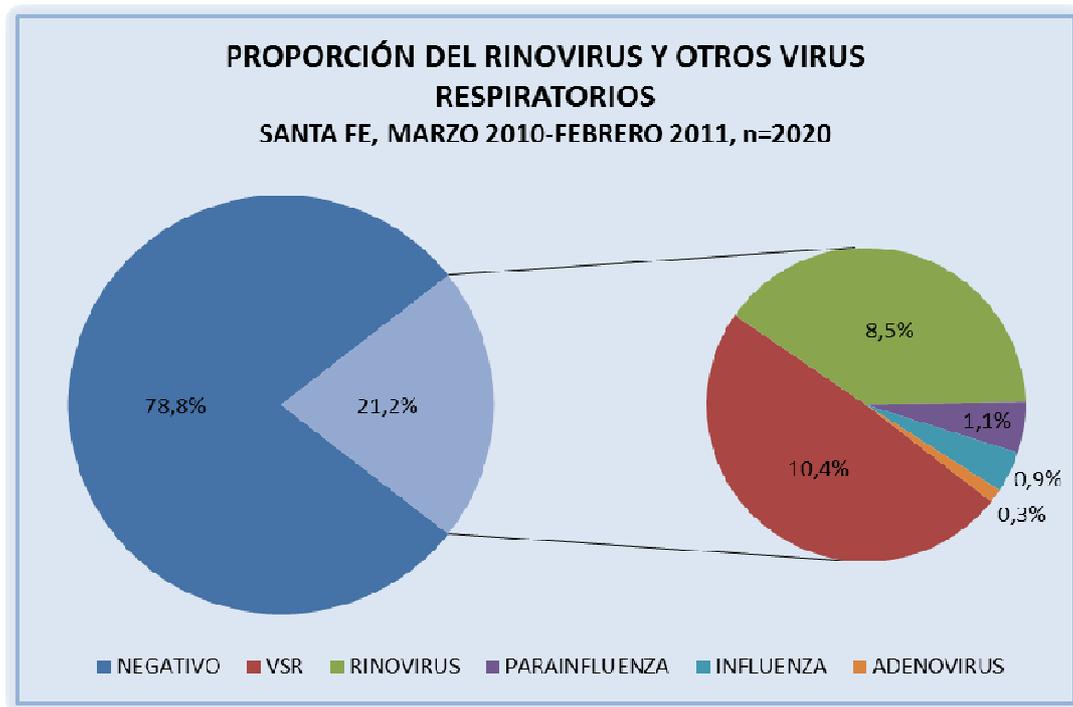


Gráfico N° 2: Proporción del rinovirus y otros virus detectados en muestras respiratorias, marzo 2010-febrero 2011, Santa Fe, Argentina.

Tabla N° 6: Frecuencia de rinovirus y otros virus respiratorios, marzo 2010-febrero2011, Santa Fe, Argentina.

| MES | TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS N° | MUESTRAS NEGATIVAS N° (%) | RV (+) N° (%) | VSR (+) N° (%) | PARAINFLUENZA (+) N° (%) | ADV (+) N° (%) | INFLUENZA (+) N° (%) |
|----------------|---------------------------------|---------------------------|------------------|-------------------|--------------------------|----------------|----------------------|
| Marzo 2010 | 59 | 45 (76,3) | 11 (18,6) | 3 (5,1) | 0 | 0 | 0 |
| Abril 2010 | 163 | 130 (79,8) | 17 (10,4) | 15 (9,2) | 1 (0,6) | 0 | 0 |
| Mayo 2010 | 248 | 196 (79,0) | 19 (7,7) | 32 (12,9) | 0 | 1 (0,4) | 0 |
| Junio 2010 | 429 | 326 (76,0) | 14 (3,3) | 89 (20,7) | 0 | 0 | 0 |
| Julio 2010 | 276 | 202 (73,1) | 11 (4,0) | 62 (22,5) | 1 (0,4) | 0 | 0 |
| Agosto 2010 | 234 | 208 (88,9) | 16 (6,8) | 7 (3,0) | 3 (1,3) | 0 | 0 |
| Setiembre 2010 | 172 | 153 (88,9) | 11 (6,4) | 0 | 7 (4,1) | 1 (0,6) | 0 |
| Octubre 2010 | 114 | 86 (75,4) | 19 (16,7) | 0 | 7 (6,1) | 2 (1,8) | 0 |
| Noviembre 2010 | 109 | 86 (78,9) | 17 (15,6) | 1 (0,9) | 2 (1,8) | 0 | 3 (2,8) |
| Diciembre 2010 | 89 | 66 (74,2) | 11 (12,4) | 1 (1,1) | 2 (2,2) | 0 | 9 (10,1) |
| Enero 2011 | 67 | 48 (71,6) | 10 (14,9) | 0 | 0 | 3 (4,5) | 6 (9,0) |
| Febrero 2011 | 60 | 44 (73,3) | 16 (26,7) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 2020 | 1590 (78,8) | 172 (8,5) | 210 (10,4) | 23 (1,1) | 7 (0,3) | 18 (0,9) |

5.6 ANÁLISIS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DE CASOS DE IRA ATRIBUIBLES A RINOVIRUS

5.6.1 Población estudiada y datos demográficos

De los 172 pacientes en los cuales se detectó rinovirus en las muestras respiratorias, se recolectaron y analizaron las historias clínicas de 145; las restantes no se localizaron en los archivos de los distintos nosocomios. El número de pacientes analizados representó el 84,3% del total de los CARV obtenidos en este estudio.

Los casos en los cuales se detectó rinovirus en las muestras respiratorias correspondieron a pacientes de los siguientes grupos etareos: 11%, menores de 1 mes de edad; 49%, 1 a 6 meses, 13,8%, 6 a 12 meses; 11,7%, 1 a 2 años; 11%, 2 a 5 años y 3,5%, mayores a 5 años de edad. (Gráfico N° 3). La mediana de la edad calculada fue de 4 meses (Rango: 0,3 – 108 meses).

El 53,1% de los casos de los CARV fueron pacientes de género femenino.

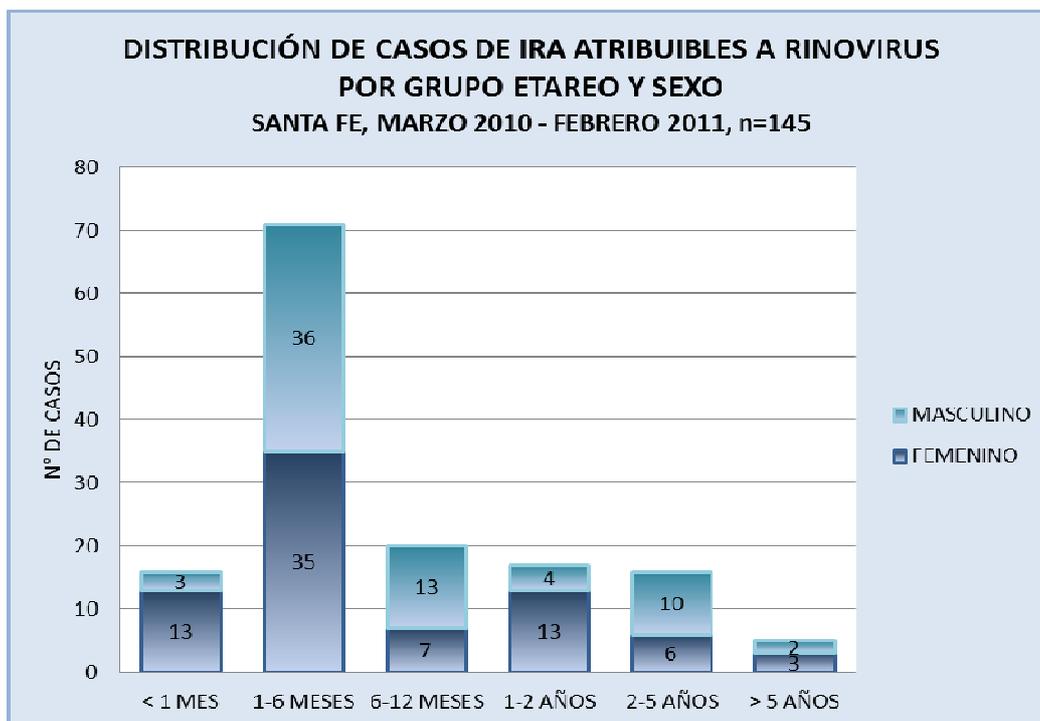


Gráfico N° 3: Distribución de CARV por grupo etareo y sexo, marzo 2010-febrero 2011, Santa Fe, Argentina.

5.6.2 Antecedentes clínicos

El 31% de los CARV presentó antecedentes clínicos, siendo los más frecuentes la prematurez (55,6%) y las sibilancias recurrentes (51,1%) (Tabla N° 7).

Tabla N° 7: Antecedentes clínicos de CARV, marzo 2010-febrero 2011, Santa Fe, Argentina.

| ANTECEDENTES CLÍNICOS | N° DE PACIENTES (%) (n=45) |
|--------------------------|-------------------------------|
| Prematurez | 25 (55,6) |
| Sibilancias recurrentes | 23 (51,1) |
| Cardiopatía congénita | 5 (11,1) |
| Desnutrición | 3 (6,7) |
| Asma | 3 (6,7) |
| Displasia broncopulmonar | 2 (4,4) |
| Síndrome convulsivo | 1 (2,2) |
| Leucemia | 1 (2,2) |
| Otros antecedentes* | 5 (11,1) |

*Otros antecedentes: hipotiroidismo congénito, microcefalia, epilepsia, enfermedad celíaca, contacto con TBC.

5.6.3 Internaciones previas por IRA

Del total de casos, 47 (32,4%) presentaron internaciones previas por enfermedad respiratoria, de los cuales 23 (52,3%) fueron en una única oportunidad. En 15 casos (34,1%) se registraron entre 2 y 5 internaciones previas por causas similares, y sólo en 6 pacientes (13,6%) se registraron más de 5 internaciones. Los diagnósticos de admisión más frecuentes fueron bronquiolitis (40,4%), neumonía (31,2%) y bronquitis obstructiva respiratoria (19,1%).

5.6.4 Manifestaciones clínicas

Los diagnósticos de egreso más frecuentes fueron neumonía (35,2%) y bronquiolitis (32,4%) (Tabla N° 8).

La fiebre se documentó en 74 pacientes (51,7%).

Se observaron complicaciones por sepsis en 5 casos, por claudicación respiratoria inminente aguda (CRIA) en 6 casos, por hipertensión pulmonar en 1 caso y por neumotórax en 1 caso.

Tabla N° 8: Diagnóstico de egreso, hallazgos radiológicos, hallazgos de laboratorio y medicaciones empleadas en CARV, marzo 2010-febrero 2011, Santa Fe, Argentina.

| DIAGNÓSTICO DE EGRESO | N° DE PACIENTES (%) (n=145) |
|--|--|
| Neumonía | 51 (35,2) |
| Bronquiolitis | 47 (32,4) |
| Bronquitis | 18 (12,4) |
| Episodios de sibilancias | 14 (9,7) |
| Cuadro de vías aéreas superiores | 8 (5,5) |
| Síndrome coqueluchoide | 8 (5,5) |
| IRA sin especificar | 4 (2,8) |
| Crisis asmática | 3 (2,1) |
| HALLAZGOS RADIOLÓGICOS DE TÓRAX | N° DE PACIENTES (%) (n=137) |
| Atrapamiento aéreo | 103 (75,2) |
| Infiltrado intersticial | 93 (67,9) |
| Infiltrado alveolar | 49 (35,8) |
| Atelectasia | 29 (21,2) |
| Infiltrado alveolar múltiple | 17 (12,4) |
| Infiltrado alveolar unilobar | 15 (10,9) |
| Derrame pleural | 2 (1,5) |
| Otros hallazgos radiológicos* | 3 (2,2) |
| HALLAZGOS DE LABORATORIO | N° DE PACIENTES (%) (n=132) |
| Leucocitosis | 96 (72,7) |
| Eritrosedimentación aumentada | 59 (44,7) |
| Proteína C Reactiva positiva | 49 (37,1) |
| MEDICACIONES EMPLEADAS | N° DE PACIENTES (%) (n=122) |
| Antibióticos | 81 (66,4) |
| Broncodilatador (Salbutamol) | 73 (59,8) |
| Corticoide (Hidrocortisona) | 25 (20,5) |
| Antiviral (Oseltamivir) | 22 (18,0) |

*Otros hallazgos radiológicos: infiltrado paracardíaco y sinusitis.

5.6.5 Hallazgos radiológicos

El hallazgo radiológico de tórax más frecuente fue el atrapamiento aéreo (75,2%), seguido del infiltrado intersticial (67,9%) y el infiltrado alveolar (35,8%) (Tabla N° 8).

5.6.6 Hallazgos de laboratorio

Con el objetivo de conocer el tiempo de recuperación del rinovirus, se asoció el tiempo transcurrido entre el comienzo de la enfermedad respiratoria y la toma de la muestra. En 51 casos (37,5%), el tiempo transcurrido fue menor a 72 horas, en 79 casos (58,1%), transcurrieron entre 4 y 14 días, y en 6 casos (4,4%), se logró detectar el genoma del virus luego de 15 días del inicio de los síntomas. La media del tiempo transcurrido para la toma de la muestra fue de 5,6 días (Rango: 1-23 días). La toma de la muestra se realizó dentro de las 72 horas de internación en el 76,4% de los casos. La media del tiempo transcurrido para la toma de la muestra durante la internación fue de 2,2 días (Rango: 1-13 días).

Cinco casos presentaron sepsis, pero sólo en 2 de ellos se obtuvo el dato del agente etiológico, lográndose el aislamiento de neumococo y de *Klebsiella*. En el 72,7% de los casos se observó leucocitosis (Tabla N° 8).

5.6.7 Tratamiento

Ciento veinticuatro internados (85,5%) requirieron suministro de oxígeno. La mediana de la duración del tratamiento con oxígeno fue de 5 días (Rango: 1–120 días; n=119). El 68,1% de los casos requirió oxígeno por menos de 7 días (Gráfico N° 4).

Ochenta y uno pacientes (66,4%) fueron tratados con ATB y 22 de ellos (18%) recibieron oseltamivir (Tabla N° 8). Los ATB más utilizados fueron ampicilina (50,6%), gentamicina (21%) y cefotaxima (17,3%).

Veintitrés casos (15,9%) requirieron internación en la UTI, con una mediana de permanencia de 7 días (Rango: 2–24 días; n=21) (Gráfico N° 5). En 18 casos (12,4%) fue necesaria la asistencia respiratoria mecánica, con una mediana de 5 días de duración (Rango: 2-15 días, n=17) (Gráfico N° 4). No se registraron casos fatales en el grupo estudiado.

El 54,4% de los casos permaneció internado menos de 7 días (Gráfico N° 5). La mediana de la estadía hospitalaria para el total de los pacientes fue de 6 días (Rango: 1–140 días). De los 7 pacientes que requirieron estadía prolongada por más de 15 días, 4 de ellos eran menores de 6 meses de edad (2 eran prematuros), otros dos tenían 2 y 4 años (uno de ellos presentaba leucemia) y el paciente restante de 9 años tenía diagnóstico de asma.

Los pacientes que desarrollaron enfermedad severa fueron 23 (15,9%) y los pacientes con enfermedad moderada, 122 (84,1%). A pesar de que el 78,3% (18) de los pacientes graves fueron pacientes menores de 6 meses de edad (Gráfico N° 6), no se evidenció asociación entre la edad de los pacientes y el desarrollo de enfermedad grave ($p=0,194$).

Nueve pacientes graves (39,1%) presentaron antecedentes clínicos, siendo el más frecuente la prematurez (Gráfico N° 7). Se analizó la asociación entre enfermedad grave y la existencia de un antecedente clínico, pero no se evidenció diferencia estadísticamente significativa ($p=0,374$).

En la Tabla N° 9, se detallan las principales características diferenciales de los niños menores y mayores de 2 años hospitalizados. La neumonía fue más frecuente en los pacientes menores de 2 años; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos etareos ($p=0,38$). La internación en UTI fue mayor en los niños menores de 2 años, no observándose diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,07$).

Tabla N° 9: Características diferenciales de CARV menores y mayores de 2 años hospitalizados, marzo 2010-febrero 2011, Santa Fe, Argentina.

| | | N° DE PACIENTES <2 AÑOS (%) (n=124) | N° DE PACIENTES >2 AÑOS (%) (n=21) |
|---|----------------|---|--|
| DIAGNÓSTICO | Neumonía | 40 (32,3) | 11 (52,4) |
| | Bronquiolitis | 47 (37,9) | 0 |
| | Bronquitis | 12 (9,7) | 6 (28,6) |
| | Sibilancias | 11 (8,9) | 2 (9,5) |
| | CVAS | 7 (5,6) | 1 (4,8) |
| | Crisis de Asma | 0 | 3 (14,3) |
| INTERNACIÓN EN UTI | | 21 (16,9) | 2 (9,5) |
| MEDIANA DE LA ESTADÍA HOSPITALARIA (días) | | 6 | 5 |

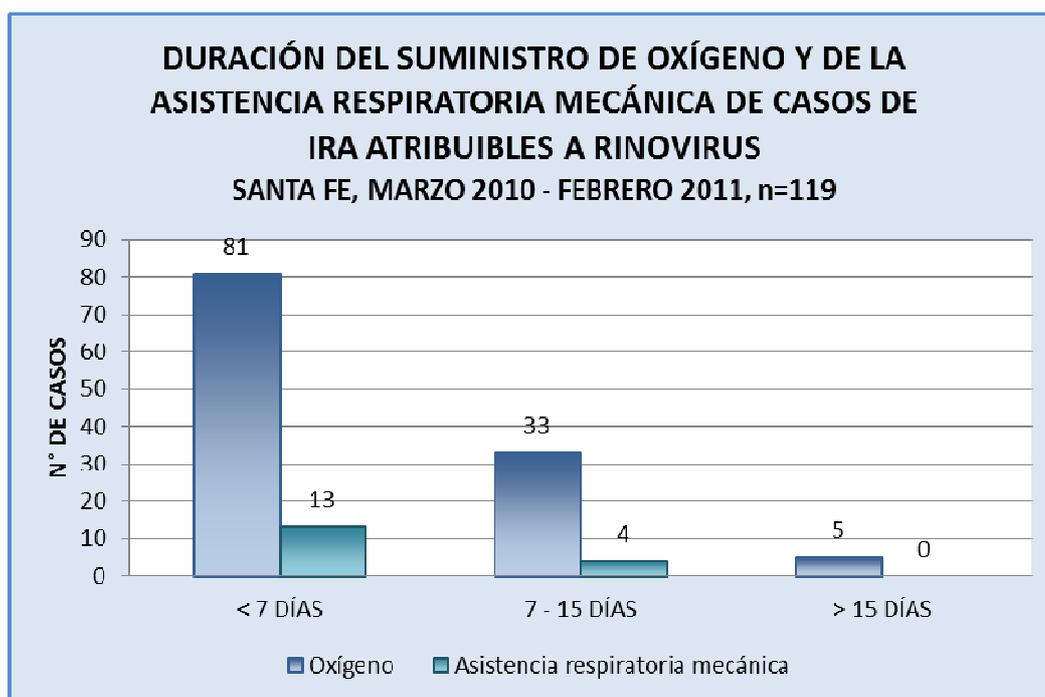


Gráfico N° 4: Duración del suministro de oxígeno y de la asistencia respiratoria mecánica en CARV, marzo 2010-febrero 2011, Santa Fe, Argentina.

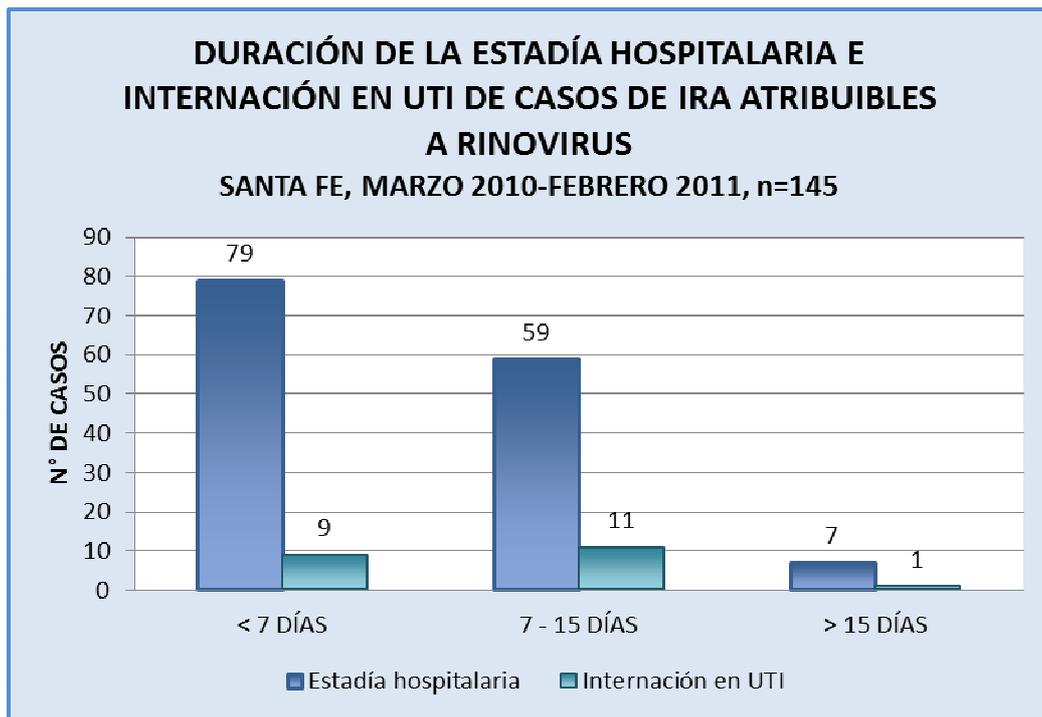


Gráfico N° 5: Duración de la estadía hospitalaria e internación en UTI en CARV, marzo 2010-febrero 2011, Santa Fe, Argentina.

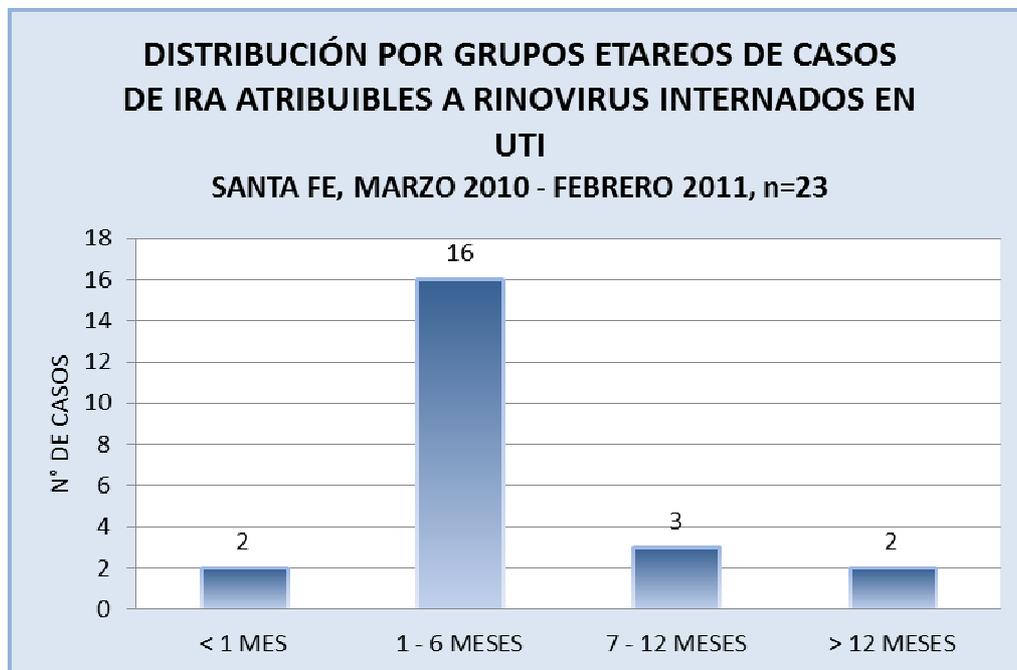


Gráfico N° 6: Distribución por grupo etareo de CARV internados en UTI, marzo 2010-febrero 2011, Santa Fe, Argentina.

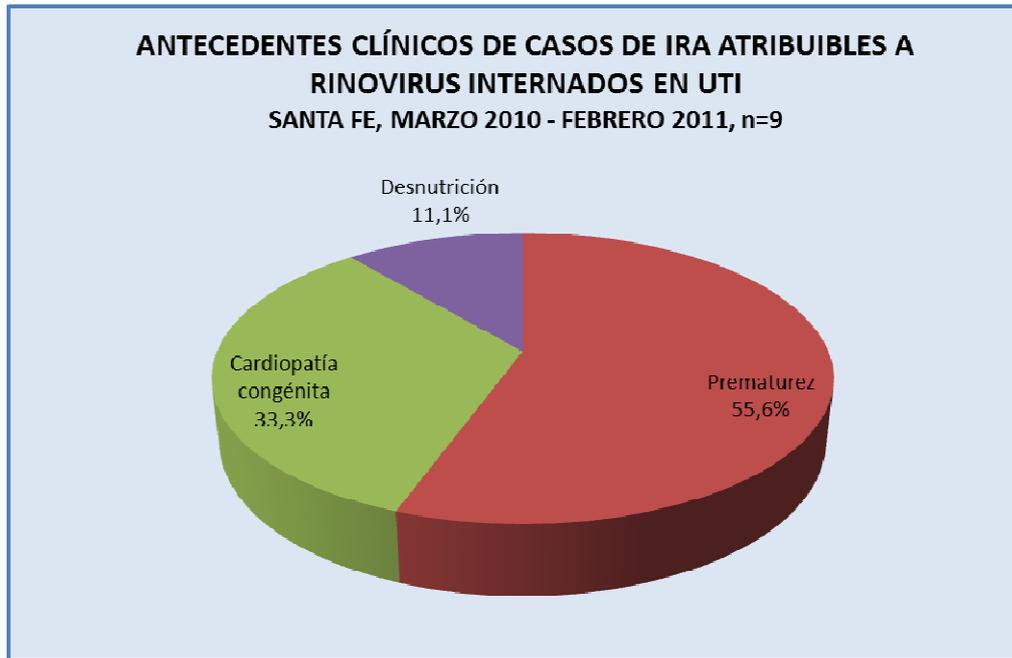
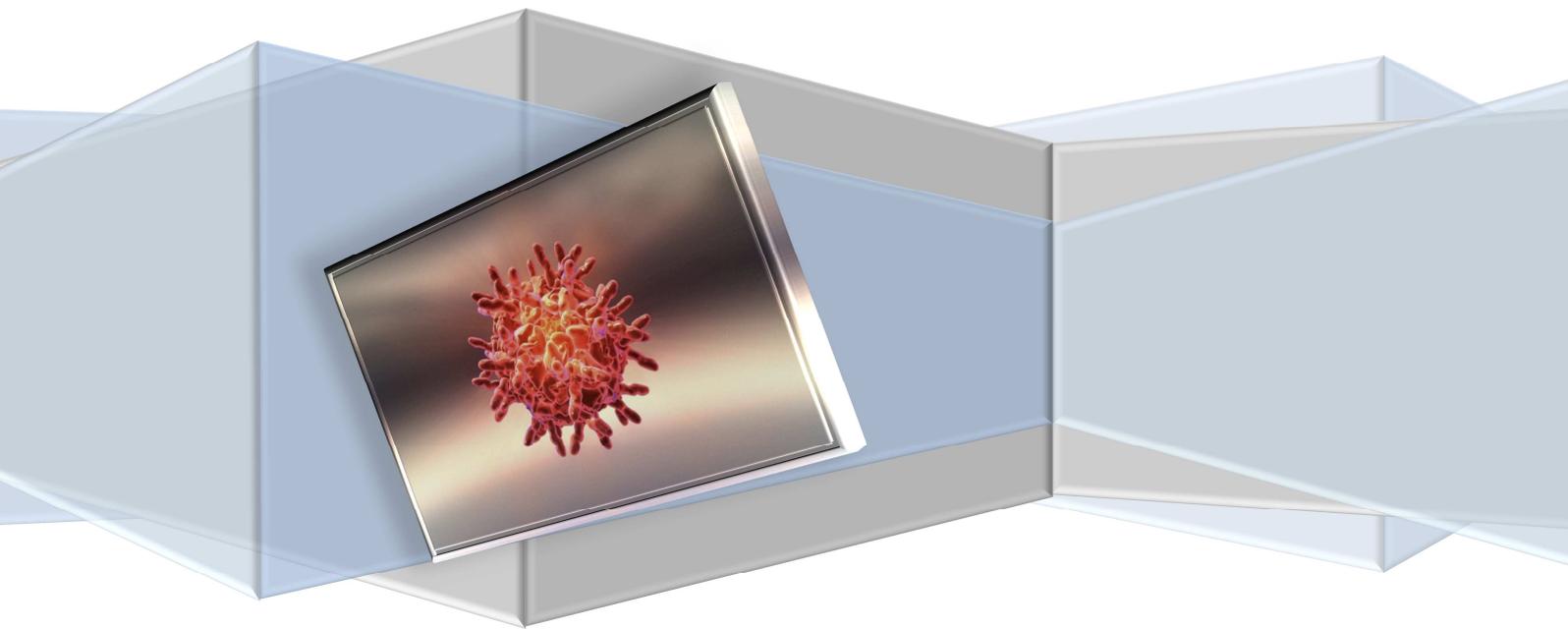


Gráfico N° 7: Antecedentes clínicos en CARV internados en UTI, marzo 2010-febrero 2011, Santa Fe, Argentina.

5.6.8 Seguimiento de los pacientes

De un total de 145 casos analizados, 27 (18,6%) registraron internaciones posteriores por IRA, y 2 de ellos (7,4%) estuvieron internados en UTI. La mediana del tiempo transcurrido para la internación posterior fue de 3,8 meses (Rango: 0,4-14,5 meses). Los diagnósticos de alta más frecuentes fueron la bronquitis obstructiva respiratoria (35%) y la neumonía (30%).

DISCUSIÓN



6. DISCUSIÓN

Por primera vez en Santa Fe, este estudio ha aportado conocimientos acerca de la epidemiología y el cuadro clínico de la IRA atribuible a rinovirus en niños, asociando este virus a hospitalizaciones debidas a enfermedad respiratoria moderada y severa.

La aplicación de la técnica de PCR ha permitido en esta ciudad la detección del rinovirus, agente que no puede ser identificado por la técnica de IF que se utiliza de rutina para la detección de otros virus respiratorios. Previamente, la detección de rinovirus resultaba dificultosa debido a que el cultivo y el test de labilidad ácida eran laboriosos e insumían mucho tiempo, situación que se ha ido modificando con los avances de la tecnología molecular (57). En el presente estudio se ha optimizado una RT-PCR convencional anidada, diseñada por Steininger y col. (84), que se ha basado en la elección estratégica de los primers y en la optimización de las condiciones de ciclado, que permitieron amplificar zonas de la NCR 5' de los picornavirus que presentan alta homología entre los distintos serotipos de rinovirus y poca similitud con el genoma de los enterovirus, diferenciándose de otros ensayos (4, 7) que han utilizado targets que amplificaron otros picornavirus.

En la optimización de la técnica seleccionada, se han analizado los parámetros críticos de un ensayo de RT-PCR, como son los efectos de la concentración de dNTPs y la concentración óptima de Mg^{+2} , concluyendo que la concentración adecuada ha sido 0,2 mM y 2 mM, respectivamente. En concordancia con otros autores, con concentraciones en defecto se ha producido una disminución en el rendimiento del producto formado. En forma opuesta, con un exceso de dNTPs puede observarse una disminución en la señal esperada debido, fundamentalmente, a que se favorecería la

formación de productos no deseados, comprometiendo la especificidad del ensayo, así como a la menor disponibilidad de Mg^{+2} libre (85).

Cuando se intentaron amplificar genomas de los virus respiratorios comunes, en ningún caso se visualizó el producto final de 93 pb. Los resultados obtenidos confirman la elevada especificidad de la técnica, que fuera descrita previamente por Steininger y col. (84).

En este estudio, se han detectado virus respiratorios en el 21,2% de los casos, ubicándose el rinovirus en segundo lugar, con el 8,5% y luego del VSR (10,4%). Comparar la prevalencia de infección por rinovirus con otros estudios ha sido dificultoso, ya que se han empleado distintos denominadores en su obtención y además, porque el tamaño de la muestra analizada es muy variable. Si utilizamos como denominador las muestras analizadas por PCR, el porcentaje de detección del rinovirus es del 38,1%. Diferentes investigaciones han determinado la frecuencia del rinovirus en niños hospitalizados con IRA, variando del 16% al 57,8%, encontrándose nuestro resultado en este rango de valores (23, 28, 42, 80, 86, 87, 88, 89, 90, 91). Sin embargo, algunos trabajos (23, 38, 86) han mostrado al rinovirus como el virus más prevalente asociado con hospitalizaciones por IRA, seguido del VSR. Estos hallazgos se pueden deber a la utilización de una técnica de RT-PCR en tiempo real, mucho más sensible, o bien a variaciones anuales de circulación del virus.

La diseminación mundial del rinovirus ha quedado demostrada por estudios similares realizados en diferentes países como Estados Unidos (23), Trinidad y Tobago (27), Sudáfrica (29), España (42), Holanda (38), Brasil (88) o China (92).

El rinovirus ha circulado durante todos los meses del año, aunque los meses de mayor circulación han sido marzo de 2010, y desde octubre de 2010 a febrero de

2011, con porcentajes de positividad que han variado entre el 12% y el 27%, coincidiendo a su vez con la baja circulación del VSR. Por lo tanto, el patrón estacional indica que la mayor circulación ha ocurrido durante las estaciones de primavera y verano, observándose el pico de circulación en el mes de febrero, en donde no se ha detectado ningún otro virus respiratorio. Nuestros hallazgos están en consonancia con las observaciones que se han realizado en estudios previos (23, 28, 42, 80). Sin embargo, Vidaurreta (86) ha reportado que la circulación ha sido más prevalente durante el otoño e invierno, pero sin llegar a desaparecer en los meses de primavera y verano. En Brasil (88), el pico de circulación también ha sido detectado en el otoño e invierno. Es probable que existan diferencias en la estacionalidad del virus según el año que se estudie. Por eso, es importante extender el período estudiado como mínimo a 3 años para poder observar las eventuales diferencias anuales.

Evaluando la relación entre la prevalencia del virus y las edades de los pacientes, se ha observado que el 60% de los niños infectados han sido menores de 6 meses, siendo la mediana de la edad de 4 meses. Los niños mayores a 2 años de edad han representado sólo el 14% de la totalidad de los casos de IRA atribuibles a rinovirus. Esto coincide con la mayor prevalencia del virus durante los primeros meses de la vida manifestada en publicaciones precedentes (23, 28, 30, 38, 40, 41, 89).

La mayoría de los pacientes hospitalizados (70%) han sido niños que no registraban antecedentes clínicos, pero en el grupo de pacientes que sí los presentaba, los más frecuentes han sido la prematuridad y las sibilancias recurrentes. Recientemente, los resultados de un estudio en la ciudad de Buenos Aires (93) han revelado que el rinovirus ha sido el patógeno predominante de las infecciones respiratorias en infantes prematuros.

Las sibilancias son una frecuente manifestación de la infección del tracto respiratorio bajo en infantes y niños pequeños, siendo la infección viral la causa más común (29, 34, 35, 43). Los resultados de varios trabajos han sugerido que el rinovirus puede estar asociado a cuadros de sibilancias. Maffey y col. (34), en la ciudad de Buenos Aires, han hallado al rinovirus en muestras respiratorias de niños con sibilancias recurrentes, con una frecuencia del 23% y detrás del VSR, mientras que en África (29) y en Japón (35) se los han hallado en el 58% y en el 31% de los casos, respectivamente. Los principales trabajos que han estudiado la historia natural del asma bronquial, han informado que para la edad de 6 años, el 50% de los niños ha tenido, al menos, un episodio de sibilancias, de los cuales solamente el 25% desarrollará asma bronquial en un futuro (94).

Muchos estudios de etiología de las exacerbaciones del asma (27, 43, 48, 88) han mencionado al rinovirus como el agente más comúnmente detectado en este grupo de pacientes. Miller y col. (23) encontraron que los niños con asma tuvieron una cantidad mayor de hospitalizaciones asociadas al rinovirus que aquellos sin historia de sibilancia o asma. En nuestra población, sólo el 2% de los casos ha presentado el diagnóstico de asma, en discordancia con el 28% encontrado en el estudio de Miller, y todos fueron mayores de 5 años de edad.

Si bien tradicionalmente los rinovirus se han asociado únicamente a los resfriados comunes, las nuevas técnicas de diagnóstico desarrolladas permitieron detectar su presencia en pacientes con infecciones del tracto respiratorio inferior, como neumonía y bronquiolitis. En el año 2000, Papadopoulos y col. (95) han investigado la infección respiratoria baja in vitro por exposición de las células epiteliales bronquiales humanas al rinovirus, y en vivo en voluntarios humanos. La infección se ha confirmado

en ambos modelos, induciendo respuesta proinflamatoria en sujetos normales y asmáticos. En el estudio de Kusel y col. (82), en 2006, se ha reconocido el rol patogénico del rinovirus asociado a las infecciones del tracto respiratorio inferior en el primer año de vida. En 2011, Costa (41) ha encontrado una prevalencia del 25% del rinovirus en lavados broncoalveolares de pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos. En consonancia con estos estudios, en nuestro trabajo la neumonía ha sido el diagnóstico de egreso más frecuente, y se ha observado en el 35% de los pacientes, coincidiendo con los datos presentados por Bicer y col. (80). En ninguno de los casos se han detectado otros patógenos virales, y sólo 2 casos presentaron sepsis debida a neumococo y *Klebsiella*. Por otra parte, la bronquiolitis es la causa principal de ingreso hospitalario en el niño menor de 2 años, siendo causada principalmente por el VSR, aunque existen otros virus respiratorios implicados, como se ha evidenciado previamente (37, 39, 96). Estudios recientes (39, 91) de etiología de las bronquiolitis han reportado al VSR y al rinovirus como los agentes etiológicos más importantes en niños hospitalizados, con tasas de detección del 39% y 13%, respectivamente. En nuestra serie, la bronquiolitis también se ha observado en un alto porcentaje (32%), mientras que en el trabajo de Calvo Rey (42), en el 21% de los internados. Estos hallazgos difieren de los observados en otros estudios, donde la neumonía se ha diagnosticado en el 8%-16% (23, 28, 40, 42) de los pacientes y la bronquiolitis en el 11%-13% de los casos (23, 40). Por el contrario, en el trabajo de Savón-Valdés y col. (30), la bronquiolitis se ha observado en un porcentaje elevado (74%).

La fiebre ha sido una de las manifestaciones clínicas más frecuentes, al igual que en otros trabajos publicados (29, 34, 37, 42, 86, 87).

Nuestros hallazgos soportan estudios recientes (37, 80) que han mostrado al rinovirus asociado con enfermedad severa, ya que el 15% de los pacientes ha presentado un cuadro grave que ha requerido internación en UTI, aunque no se registraron casos fatales. El 48% de los pacientes críticos presentó complicaciones, siendo las más frecuentes la sepsis y la claudicación respiratoria inminente aguda. En el estudio de Bicer y col. (80), el 36% de los infectados con rinovirus presentó enfermedad moderada a severa, mientras que en los niños infectados con VSR, el porcentaje fue del 33%. En el año 2008, en Vietnam, se ha asociado al rinovirus con un brote de infección respiratoria severa en 12 niños que fueron hospitalizados y desarrollaron síndrome de distress respiratorio agudo, de los cuales 7 fallecieron (97).

La mediana de la duración de la estadía hospitalaria ha sido de 6 días, período que ha resultado similar a lo informado en trabajos previamente publicados (34, 87). Se observó una prolongación de la estadía hospitalaria en 7 casos (4,8%). Si bien no pudo realizarse una asociación estadística debido al bajo número de casos, es importante mencionar que 4 de los 7 pacientes presentaban algún antecedente clínico y que 2 de ellos, si bien no padecían antecedentes, eran menores de 2 meses.

El suministro de oxígeno se ha empleado en una proporción elevada de pacientes (85%), a diferencia de la asistencia respiratoria mecánica que solo ha sido necesaria en poco más del 10% de los casos, valores más elevados que los evidenciados por otros autores (23, 89).

La edad menor de 3 meses, la presentación de inmunodeficiencias, la cardiopatía congénita, la enfermedad pulmonar crónica, la prematurez y la desnutrición son factores de riesgo para el desarrollo de IRA baja grave, según el consenso de la Sociedad Argentina de Pediatría. En nuestro estudio, la edad y la presentación de

algún antecedente clínico no representaron un factor de riesgo para el desarrollo de IRA grave, a pesar de que el 60% de los casos han sido menores de 6 meses y el 40% de los pacientes graves registraban algún tipo de antecedente clínico. Por otro lado, en el grupo analizado, más del 30% de los pacientes registraron, al menos, una internación por IRA previa a esta investigación, la cual tampoco ha sido un factor de riesgo. Hay muchos factores que pueden intervenir en la gravedad de la enfermedad, relacionados tanto al huésped como al virus. En cuanto a los factores relacionados al virus, se podrían citar la presencia de coinfecciones con otros virus respiratorios (40, 79), o la especie de rinovirus implicada (98), y que no han sido evaluadas en el presente trabajo. A pesar de que hay resultados controversiales en cuanto a la asociación entre las diferentes especies y el cuadro clínico (28, 98), hay algunos trabajos que han evidenciado el rol más frecuente de los HRVC en la IRA baja, asociándolos con enfermedad severa. Iwane y col. (89) han observado en su trabajo una asociación entre los pacientes infectados con HRVA y HRVC y el desarrollo de una enfermedad grave, requiriendo mayor estadía hospitalaria, UTI y ventilación mecánica, a diferencia de los pacientes infectados con HRVB.

El 66% de los casos confirmados se ha tratado con ATB. En este sentido, hay que considerar que este estudio ha sido retrospectivo y que el diagnóstico virológico ha sido negativo para los demás virus respiratorios. Esto nos indica la importancia de considerar el diagnóstico de otros virus respiratorios implicados en forma temprana, con el fin de evitar la administración innecesaria de ATB en los pacientes pediátricos y prevenir la resistencia antimicrobiana.

El rinovirus ha sido identificado en pacientes asintomáticos, variando la prevalencia de detección entre el 12% y el 28% (99, 100, 101). Esto puede estar

indicando una colonización asintomática o bien una eliminación prolongada del virus luego de una infección respiratoria, detectándose el ARN del rinovirus hasta 5 o 6 semanas después la infección respiratoria (99). Consecuentemente, la relevancia clínica de la detección del rinovirus en los pacientes hospitalizados puede ser dificultosa de interpretar. En nuestro estudio, si bien no evaluamos el tiempo máximo de excreción viral, en el 26% de los pacientes se ha detectado el virus luego de 7 días de iniciados los síntomas respiratorios. En todos estos casos, la toma de muestra se ha realizado dentro de las 48 horas de haber sido hospitalizado, como recomiendan los protocolos.

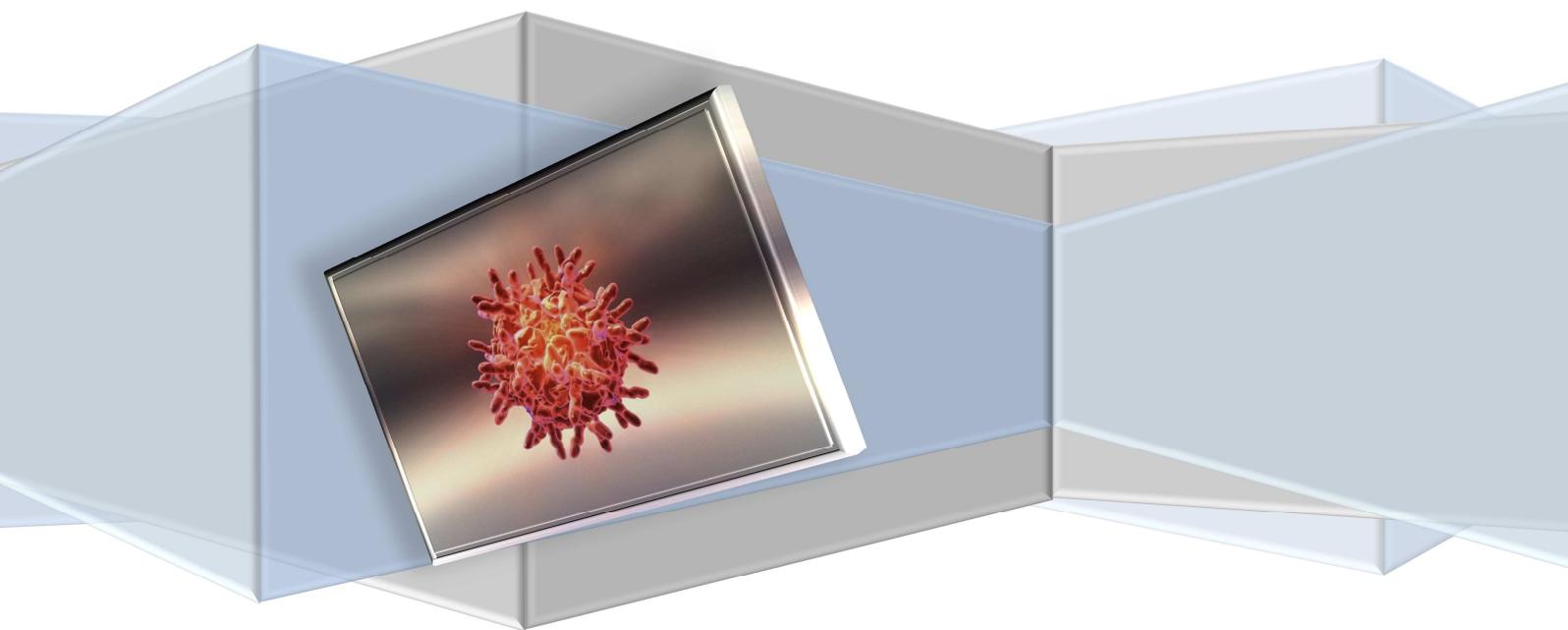
La fortaleza del presente estudio es el importante número de muestras evaluadas para la detección del rinovirus y el alto porcentaje de positividad obtenido en relación a otros estudios, lo que nos permitió realizar un exhaustivo análisis de los datos clínicos, aunque el mismo presenta algunas limitaciones. En primer lugar, no se realizó la detección del rinovirus en un grupo control. Uno de los mayores problemas en estudios de casos control es la selección de un grupo control apropiado, ya que debe valorarse si este grupo no ha padecido anteriormente (5 o 6 semanas previas) un catarro de vías respiratorias altas, por lo cual se decidió no incluirlo en nuestro trabajo. Sin embargo, realizamos estudios de detección de otros virus respiratorios conocidos y analizamos la población que resultó negativa, sugiriendo que el rinovirus podría ser el agente causante de la IRA. Es cierto que el hecho de haber utilizado PCR solamente para influenza e IF para el resto de los virus como técnica de tamizaje, que es menos sensible que las técnicas moleculares, podría ser una limitación de este trabajo. Sólo tendríamos la certeza de que la IRA ha sido causada por el rinovirus si se lograra determinar mediante técnicas moleculares una infección reciente, tal como se

ha realizado para bocavirus (102). Otra limitación de este trabajo es que el período de estudio ha correspondido a un año, y tal vez la situación estacional observada no sea reflejo de otros años.

A pesar de estas limitaciones, y a la vista de los resultados obtenidos, ha quedado demostrada la participación del rinovirus en las infecciones respiratorias agudas. Por otra parte, la implementación de una técnica de RT-PCR de punto final que detecta el rinovirus con rapidez, alta sensibilidad y especificidad, permitirá, en forma rutinaria, disminuir los casos de IRA de origen desconocido, permitiendo establecer el papel que desempeñan estos virus en nuestro medio y facilitando la elección de las conductas terapéuticas más apropiadas.

Distintas alternativas pueden plantearse como continuación del trabajo realizado. Una de ellas podría ser la expansión del diagnóstico de este virus hacia pacientes ambulatorios, en donde también es muy frecuente la circulación del virus. Desde el punto de vista analítico, futuros pasos podrían ser la optimización de una técnica de PCR en tiempo real, como así también la secuenciación de los rinovirus detectados, con el objetivo de determinar especies y serotipos, estableciendo las especies prevalentes y su asociación con la severidad de la enfermedad.

CONCLUSIONES



7. CONCLUSIONES

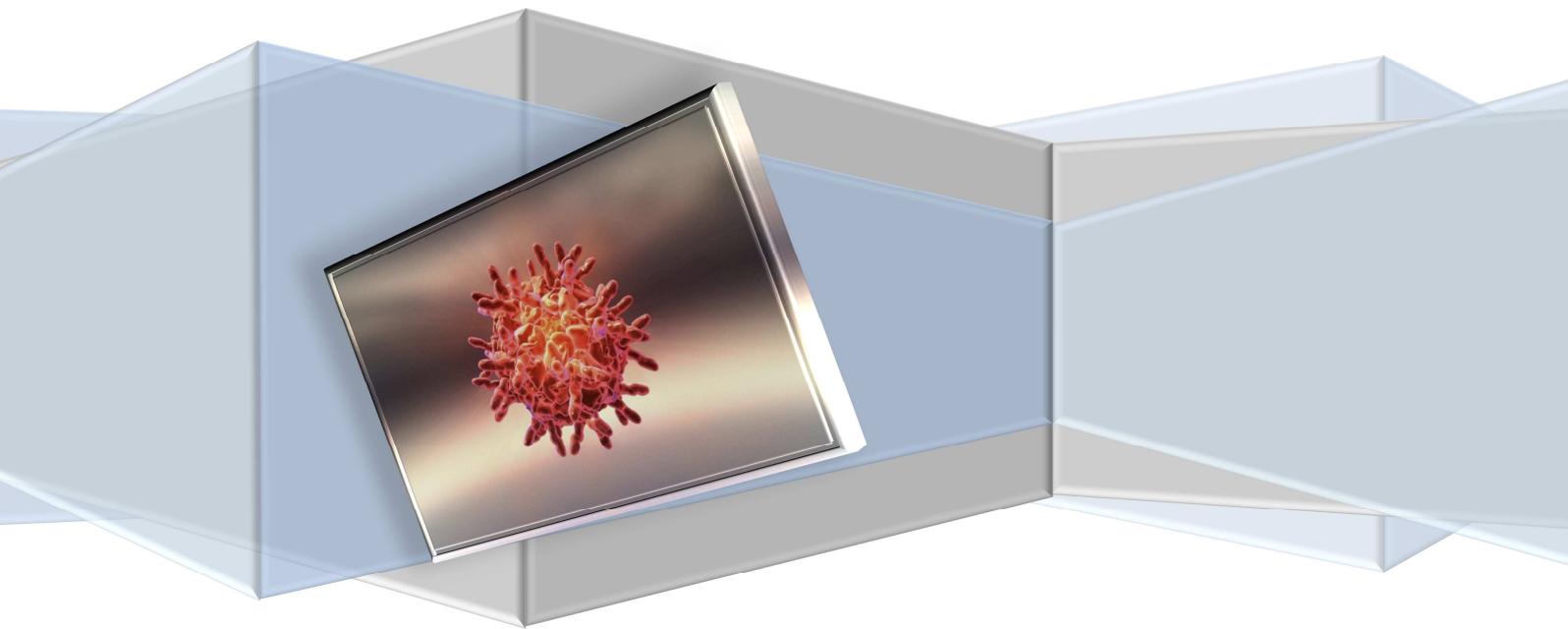
- ✓ La elección de la técnica de RT-PCR de punto final para detección de rinovirus se fundamentó en los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos por otros autores, quienes trabajaron con un elevado número de muestras y distintos serotipos del virus. La especificidad de la técnica fue corroborada en este trabajo al intentar amplificar sin éxito controles positivos de otros virus respiratorios comunes.
- ✓ La optimización de la técnica de RT-PCR de punto final incluyó la variación de las cantidades necesarias de dNTPs y de MgCl₂ en las mezclas de reacción de PCR, como así también la evaluación de la necesidad de realizar una incubación de las muestras clínicas ensayadas previa a la reacción de transcripción reversa. Las concentraciones de reactivos seleccionadas garantizaron la correcta visualización de los productos de amplificación, y la incubación previa de las muestras no se consideró necesaria, ya que no se observó un aumento en la sensibilidad de los resultados obtenidos.
- ✓ El rinovirus se encontró en todos los meses del año estudiado, siendo más frecuente su detección durante la primavera y el verano, con un pico máximo de circulación durante el mes de febrero.
- ✓ Nuestros datos revelaron que un alto porcentaje de hospitalizaciones por IRA están asociadas al rinovirus, siendo el porcentaje de positividad cercano al 40%, ubicándose en un segundo lugar, luego del VSR.

- ✓ La frecuencia de detección elevada en los menores de 6 meses (60%) sugiere que hasta ahora el rinovirus ha tenido un rol subestimado en las hospitalizaciones por IRA. La mediana de la edad de los CARV fue de 4 meses. En la población mayor de 2 años se observó una baja detección de rinovirus. La edad no fue un factor de riesgo para desarrollar enfermedad grave.
- ✓ La proporción de niños infectados fue similar para ambos géneros.
- ✓ El antecedente clínico más frecuentemente observado fue la prematurez, y más del 30% de los pacientes registraron internaciones por IRA previas a este estudio, la mayoría de ellos en una única oportunidad. Sin embargo, el presentar un antecedente clínico no fue un factor de riesgo para desarrollar enfermedad severa.
- ✓ Más del 85% de los pacientes infectados requirió suministro de oxígeno durante la hospitalización. El uso de broncodilatadores y antibióticos, en particular ampicilina, fueron los tratamientos más frecuentes.
- ✓ El 16% de los pacientes requirió internación en UTI, con una mediana en la duración de 7 días. No se observaron diferencias significativas entre las edades de los pacientes internados en UTI y aquellos que no presentaron un cuadro clínico de gravedad.
- ✓ La mediana de la duración de la estadía hospitalaria fue de 6 días y los diagnósticos de egreso más frecuentes fueron la neumonía y la bronquiolitis. Casi el 20% de los CARV registraron internaciones posteriores por síntomas similares.

- ✓ Nuestro estudio provee evidencia que el rinovirus está asociado a hospitalizaciones por IRA. Es necesaria la implementación de nuevas técnicas moleculares para determinar infección reciente, como así también la realización de estudios longitudinales con un grupo control apropiado para conocer mejor la asociación causal en los niños.

- ✓ Los datos presentados en este estudio contribuyen a mejorar el conocimiento del impacto del rinovirus en las infecciones respiratorias en la infancia, enfatizando la necesidad de un diagnóstico más exacto en respuesta a la emergencia de nuevos virus respiratorios.

BIBLIOGRAFÍA



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R. y Skalka, A. M. (2009). Principles of Virology: Volume I, Molecular Biology (Third Edition). American Society for Microbiology Press. Washington DC, USA.
2. Fields, B. N., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., Straus, S. E. y Knipe, D. M. (2001). Fields Virology, Volume I (Fourth Edition). Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Philadelphia, USA.
3. Bello Corredor, M. y Mas Lago, P. (2001). Microbiología y Parasitología Médicas. Capítulo 64. Editorial Ciencias Médicas. La Habana, Cuba.
4. Nijhuis, M., van Maarseveen, N., Schuurman, R., Verkuijlen, S., de Vos, M., Hendriksen, K. y van Loon, A. M. (2002). Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus enterovirus in different clinical specimens by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*, **40** (10), 3666-3670.
5. Kämmerer, U., Kunkel, B. y Korn, K. (1994). Nested PCR for specific detection and rapid identification of human picornavirus. *J Clin Microbiol*, **32** (2), 285-291.
6. Olive, D. M., Al-Mufti, S., AL-Mulla, W., Khan, M. A., Pasca, A., Stanway, G. y Al-Nakib, W. (1990). Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J Gen Virol*, **71**, 2141-2147.
7. Johnston, S. L., Sanderson, G., Pattemore, P. K., Smith, S., Bardin, P. G., Bruce, C. B., Lambden, P. R., Tyrrell, D. A. J. y Holgate, S. T. (1993). Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms. *J Clin Microbiol*, **31** (1), 111-117.
8. Tapparel, C., Cordey, S., Van Belle, S., Turin, L., Lee, W., Regamey, N., Meylan, P., Mühlemann, K., Gobbini, F. y Kaiser, L. (2009). New molecular detection tools adapted to emerging rhinoviruses and enteroviruses. *J Clin Microbiol*, **47** (6), 1742-1749.

9. Tapparel, C., Junier, T., Gerlach, D., Van Belle, S., Turin, L., Cordey, S., Mühlemann, K., Regamey, N., Aubert, J. D., Soccal, P. M., Eigenmann, P., Zdobnov, E. y Kaiser, L. (2009). New respiratory enterovirus and recombinant rhinoviruses among circulating picornaviruses. *Emerg Infect Dis*, **15** (5), 719-726.
10. Blomqvist, S. (2004). Epidemiology of human rhinoviruses. Publications of the National Public Health Institute. A 17. Helsinki, Finland.
11. Miller, E. K. (2010). New human rhinovirus species and their significance in asthma exacerbation and airway remodeling. *Immunol Allergy Clin North Am*, **30** (4), 541-552.
12. Lau, S. K. P., Yip, C. C. Y., Tsoi, H., Lee, R. A., So, L., Lau, Y., Chan, K., Woo, P. C. Y. y Yuen, K. (2007). Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. *J Clin Microbiol*, **45** (11), 3655-3664.
13. Briese, T., Renwick, N., Venter, M., Jarman, R. G., Ghosh, D., Köndgen, S., Shrestha, S. K., Hoegh, A. M., Casas, I., Adjogoua, E. V., Akoua-Koffi, C., Myint, K. S., Williams, D. T., Chidlow, G., van den Berg, R., Calvo, C., Koch, O., Palacios, G., Kapoor, V., Villari, J., Dominguez, S. R., Holmes, K. V., Harnett, G., Smith, D., Mackenzie, J. S., Ellerbrok, H., Schweiger, B., Schønning, K., Chadha, M. S., Leendertz, F. H., Mishra, A. C., Gibbons, R. B., Holmes, E. C. y Lipkin, W. I. (2008). Global distribution of novel rhinovirus genotype. *Emerg Infect Dis*, **14** (6), 944-947.
14. Li, M., Lin, H., Xie, W., Gao, M., Huang, Z., Wu, J., Li, C. Lin, R. y Zhu, X. (2009). Human rhinovirus group C in hospitalized children, Singapore. *Emerg Infect Dis*, **15** (8), 1318-1320.
15. Calvo, C., García, M. L., Pozo, F., Reyes, N., Pérez-Breña, P. y Casas, I. (2009). Role of rhinovirus C in apparently life-threatening events in infants, Spain. *Emerg Infect Dis*, **15** (9), 1506-1508.

16. Bochkov, Y. A., Palmenberg, A. C., Lee, W., Rathe, J. A., Amineva, S. P., Sun, X., Pasic, T. R., Jarjour, N. N., Liggett, S. B. y Gern, J. E. (2011). Molecular modeling, organ culture and reverse genetics for a newly identified human rhinovirus C. *Nat Med*, **17** (5), 627–632.
17. McIntyre, C. L., McWilliam Leitch, E. C., Savolainen-Kopra, C., Hovi, T. y Simmonds, P. (2010). Analysis of genetic diversity and sites of recombination in human rhinovirus species C. *J Virol*, **84** (19), 10297-10310.
18. Palmenberg, A. C., Rathe, J. A. y Liggett, S. B. (2010). Analysis of complete genome sequences of human rhinovirus. *J Allergy Clin Immunol*, **125** (6), 1190-1201.
19. Kelly, J. T. y Busse, W. W. (2008). Host immune responses to rhinovirus: mechanisms in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, **122**, 671-682.
20. Stanway, G., Hughes, P. J., Mountford, R. C., Minor, P. D. y Almond, J. W. (1984). The complete nucleotide sequence of a common cold virus: human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Res*, **12** (20), 7859-7875.
21. Papadopoulos, N. G. y Johnston, S. L. (2001). The rhinovirus-not such an innocent?. *Q J Med*, **94**, 1-3.
22. van Benten, I., Koopman, L., Niesters, B., Hop, W., van Middelkoop, B., de Waal, L., van Drunen, K., Osterhaus, A., Neijens, H. y Fokkens, W. (2003). Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. *Pediatr. Allergy Immunol*, **14**, 363–370.
23. Miller, E. K., Lu, X., Erdman, D. D., Poehling, K. A., Zhu, Y., Griffin, M. R., Hartert, T. V., Anderson, L. J., Weinberg, G. A., Hall, C. B., Iwane, M. K. y Edwards, K. M. (2007). Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. *J Infect Dis*, **195**, 773-781.
24. Sperber, S. J. y Hayden, F. G. (1988). Chemotherapy of rhinovirus colds. *Antimicrob Agents Chemother*, **32** (4), 409-419.

25. Kiang, D., Kalra, I., Yagi, S., Louie, J. K., Boushey, H., Boothby, J. y Schnurr, D. P. (2008). Assay for 5' noncoding region analysis of all human rhinovirus prototype strains. *J Clin Microbiol*, **46** (11), 3736-3745.
26. Watanabe, A. S. A., Carraro, E., Grisi Candeias, J. M., Donalísio, M. R., Leal, E., Hernandez Granato, C. F. y Bellei, N. (2011). Viral etiology among the elderly presenting acute respiratory infection during the influenza season. *Rev Soc Bras Med Trop*, **44** (1), 18-21.
27. Matthew, J., Pinto Pereira, L. M., Pappas, T. E., Swenson, C. A., Grindle, K. A., Roberg, K. A., Lemanske Jr, R. F., Lee, W. y Gern, J. E. (2009). Distribution and seasonality of rhinovirus and other respiratory viruses in a cross-section of asthmatic children in Trinidad, West Indies. *Ital J Pediatr*, **35**, 16-25.
28. Fry, A. M., Lu, X., Olsen, S. J., Chittaganpitch, M., Sawatwong, P., Chantra, S., Baggett, H. C. y Erdman, D. (2011). Human rhinovirus infections in rural Thailand: epidemiological evidence for rhinovirus as both pathogen and bystander. *PLoS ONE*, **6** (3), e17780.
29. Smuts, H. E., Workman, L. J. y Zar, H. J. (2011). Human rhinovirus infection in young african children with acute wheezing. *BMC Infect Dis*, **11**, 65-72.
30. Savón-Valdés, C., Valdés-Ramírez, O., Acosta-Herrera, B., González-Muñoz, G., Piñón-Ramos, A., González-Báez, G. y Goyenechea-Hernández, A. (2008). Infección por rinovirus en niños hospitalizados menores de un año. Cuba 2006. *Rev Biomed*, **19**, 122-123.
31. Jartti, T., Lehtinen, P., Vuorinen, T., Österback, R., van den Hoogen, B., Osterhaus, A. D. M. E. y Ruuskanen, O. (2004). Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg Infect Dis*, **10** (6), 1095-1101.
32. Drahos, J. y Racaniello, V. R. (2009). Cleavage of IPS-1 in cells infected with human rhinovirus. *J Virol*, **83** (22), 11581-11587.

- 33.** Douglas, R. G. Jr, Cate, T. R. y Gerone, J. P. (1966). Quantitative rhinovirus shedding patterns in volunteers. *Am Rev Respir Dis*, **94**, 159–167.
- 34.** Maffey, A., Venialgo, C., Barrero, P. R., Fuse, V. A., Márques, M. A., Saia, M., Villalba, A., Teper, A. M. y Mistchenko, A. S. (2008). Nuevos virus respiratorios en niños de 2 meses a 3 años con sibilancias recurrentes. *Arch Argent Pediatr*, **106** (4), 302-309.
- 35.** Fujitsuka, A., Tsukagoshi, H., Arakawa, M., Goto-Sugai, K., Ryo, A., Okayama, Y., Mizuta, K., Nishina, A., Yoshizumi, M., Kaburagi, Y., Noda, M., Tashiro, M., Okabe, N., Mori, M., Yokota, S. y Kimura, H. (2011). A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infect Dis*, **11**, 168-177.
- 36.** Hara, K., Yahara, K., Gotoh, K., Nakazono, Y., Kashiwagi, T., Imamura, Y., Hamada, N., Khositsakulchai, W., Sanchai, T., Khantawa, B., Tharavichitkul, P., Maneekarn, N., Sirisanthana, T. y Watanabe, H. (2011). Clinical study concerning the relationship between community-acquired pneumonia and viral infection in Northern Thailand. *Intern Med*, **50**, 991-998.
- 37.** Papadopoulos, N. G., Moustaki, M., Tsofia, M., Bossios, A., Astra, E., Prezerakou, A., Gourgiotis, D. y Kafetzis, D. (2002). Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*, **165**, 1285–1289.
- 38.** Meerhoff, T. J., Houben, M. L., Coenjaerts, F. E. J., Kimpen, J. L. L., Hofland, R. W., Schellevis, F. y Bont, L. J. (2010). Detection of multiple respiratory pathogens during primary respiratory infection: nasal swab versus nasopharyngeal aspirate using real-time polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **29**, 365–371.
- 39.** Nascimento, M. S., Vieira de Souza, A., Vada de Souza Ferreira, A., Rodrigues, J. C., Abramovici, S., Ferreira da Silva Filho, L. V. (2010). High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. *Clinics*, **65** (11), 1133-1137.

40. de Paula, N. T., Carneiro, B. M., Yokosawa, J., Ramos Oliveira e Freitas, G., de Mattos Oliveira, T. F., Faria Costa, L., Lopes da Silveira, H. y Oliveira Queiróz, D. A. (2011). Human rhinovirus in the lower respiratory tract infections of young children and the possible involvement of a secondary respiratory viral agent. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **106** (3), 316-321.
41. Costa, C., Bergallo, M., Sidoti, F., Terlizzi, M. E., Astegiano, S., Botto, S., Elia, M. y Cavallo, R. (2009). What role for human rhinoviruses in the lower respiratory tract?. *New Microbiol*, **32**, 115-117.
42. Calvo Rey, C., García García, M. L., Casas Flecha, I., Sánchez Mateos, M. F., Rodrigo García, G., de Cea Crespo, J. M. y Pérez-Breña, P. (2006). Papel del rinovirus en las infecciones respiratorias en niños hospitalizados. *An Pediatr*, **65** (3), 205-210.
43. Gern, J. E. (2010). The ABCs of Rhinoviruses, Wheezing, and Asthma. *J Virol*, **84** (15), 7418-7426.
44. Jackson, D. J. y Lemanske Jr., R. F. (2010). The role of respiratory virus infections in childhood asthma inception. *Immunol Allergy Clin North Am*, **30** (4), 513-522.
45. Kimpen, J. L. L. (2000). Viral infections and childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, **162**, 108-112.
46. Nicholson, K. G., Kent, J. y Ireland, D. C. (1993). Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ*, **307**, 982-986.
47. Hayden, F. G. (2004). Rhinovirus and the lower respiratory tract. *Rev Med Virol*, **14** (1), 17-31.
48. Sears, M. R. (2008). Epidemiology of asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*, **122** (8), 662-668.
49. Friedlander, S. y Busse, W. (2005). The role of rhinovirus in asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*, **116**, 267-273.
50. Patick, A. K. (2006). Rhinovirus chemotherapy. *Antivir Res*, **71**, 391-396.

51. Pitkäranta, A., Arruda, E., Malmberg, H. y Hayden, F. G. (1997). Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, **35** (7), 1791-1793.
52. Arola, M., Ziegler, T. y Ruuskanen, J. (1988). Rhinovirus in acute otitis media. *J Pediatr*, **113**, 693-695.
53. Rohde, G. G. U. (2011). Rhinovirus vaccination: the case in favour. *Eur Respir J*, **37**, 3-4.
54. Edlmayr, J., Niespodziana, K., Linhart, B., Focke-Tejkl, M., Westritschnig, K., Scheiblhofer, S., Stoecklinger, A., Kneidinger, M., Valent, P., Campana, R., Thalhamer, J., Popow-Kraupp, T. y Valenta, R. (2009). A combination vaccine for allergy and rhinovirus infections based on rhinovirus-derived surface protein VP1 and a nonallergenic peptide of the major timothy grass pollen allergen Phl p 1. *J Immunol*, **182**, 6298-6306.
55. Falah, N., Violot, S., Décimo, D., Berri, F., Foucault-Grunenwald, M. L., Ohlmann, T., Schuffenecker, I., Morfin, F., Lina, B., Riteau, B. y Cortaya, J. C. (2012). Ex vivo and in vivo inhibition of human rhinovirus replication by a new pseudosubstrate of viral 2A protease. *J Virol*, **86** (2), 691-704.
56. Cabrera, A. M., Echenique, H. M., Uez, O., Kuznierz, G. y Del Mónaco, R. (2011). Manual para el fortalecimiento de la vigilancia de la enfermedad tipo influenza utilizando la estrategia de unidades centinelas de infecciones respiratorias agudas graves (IRAG). Ministerio de Salud de la Nación con el apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
57. Hyypiä, T., Puhakka, T., Ruuskanen, O., Mäkelä, M., Arola, A. y Arstila, P. (1998). Molecular diagnosis of human rhinovirus infections: comparison with virus isolation. *J Clin Microbiol*, **36** (7), 2081-2083.
58. Papadopoulos, N. G., Hunter, J., Sanderson, G., Meyer, J. y Johnston, S. L. (1999). Rhinovirus identification by Bgl I digestion of picornavirus RT-PCR amplicons. *J Virol Methods*, **80**, 179-185.

59. Halonen, P., Rocha, E., Hierholzer, J., Holloway, B., Hyypiä, T., Hurskainen, P. y Pallansch, M. (1995). Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization. *J Clin Microbiol*, **33** (3), 648-653.
60. Freymuth, F., Vabret, A., Galateau-Salle, F., Ferey, J., Eugene, G., Petitjean, J., Gennetay, E., Brouard, J., Jokik, M., Duhamel, J. F. y Guillois, B. (1997). Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. *Clin Diagn Virol*, **8**, 31-40.
61. Samuelson, A., Westmoreland, D., Eccles, R. y Fox, J. D. (1998). Development and application of a new method for amplification and detection of human rhinovirus RNA. *J Virol Methods*, **71**, 197–209.
62. Blomqvist, S., Skyttä, A., Roivainen, M. y Hovi, T. (1999). Rapid detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates by a microwell reverse transcription-PCR–hybridization assay. *J Clin Microbiol*, **37** (9), 2813-2816.
63. Loens, K., Ieven, M., Ursi, D., de Laat, C., Sillekens, P., Oudshoorn, P. y Goossens, H. (2003). Improved detection of rhinoviruses by nucleic acid sequence-based amplification after nucleotide sequence determination of the 5' noncoding regions of additional rhinovirus strains. *J Clin Microbiol*, **41** (5), 1971-1976.
64. Mori, J. y Clewley, J. P. (1994). Polymerase Chain Reaction and sequencing for typing rhinovirus RNA. *J Med Virol*, **44**, 323-329.
65. Arruda, E. y Hayden, F. G. (1993). Detection of human rhinovirus RNA in nasal washings by PCR. *Mol Cell Probe*, **7**, 373-379.
66. Bellau-Pujol, S., Vabret, A., Legrand, L., Dina, J., Gouarin, S., Petitjean-Lecherbonnier, J., Pozzetto, B., Ginevra, C. y Freymuth, F. (2005). Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods*, **126**, 53–63.
67. Ireland, D. C., Kent, J. y Nicholson, K. G. (1993). Improved detection of rhinoviruses in nasal and throat swabs by seminested RT-PCR. *J Med Virol*, **40**, 96-101.

68. Andeweg, A. C., Bestebroer, T. M., Huybregths, M., Kimman, T. G. y de Jong, J. C. (1999). Improved detection of rhinoviruses in clinical samples by using a newly developed nested reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol*, **37** (3), 524-530.
69. Lam, W. Y., Yeung, A. C. M., Tang, J. W., Ip, M., Chan, E. W. C., Hui, M. y Chan, P. K. S. (2007). Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*, **45** (11), 3631-3640.
70. Do, D. H., Laus, S., Leber, A., Marcon, M. J., Jordan, J. A., Martin, J. M. y Wadowsky, R. M. (2010). A one-step, Real-Time PCR assay for rapid detection of rhinovirus. *J Mol Diagn*, **12** (1), 102-108.
71. Deffernez, C., Wunderli, W., Thomas, Y., Yerly, S., Perrin, L. y Kaiser, L. (2004). Amplicon sequencing and improved detection of human rhinovirus in respiratory samples. *J Clin Microbiol*, **42** (7), 3212-3218.
72. Dagher, H., Donninger, H., Hutchinson, P., Ghildyal, R. y Bardin, P. (2004). Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *J Virol Methods*, **117**, 113-121.
73. Lu, X., Holloway, B., Dare, R. K., Kuypers, J., Yagi, S., Williams, J. V., Hall, C. B. y Erdman, D. D. (2008). Real-time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. *J Clin Microbiol*, **46** (2), 533-539.
74. Kares, S., Lönnrot, M., Vuorinen, P., Oikarinen, S., Taurianen, S. y Hyöty, H. (2004). Real-time PCR for rapid diagnosis of entero- and rhinovirus infections using LightCycler. *J Clin Virol*, **29**, 99-104.
75. Abordaje integral de las infecciones respiratorias agudas. Guía para el equipo de salud N° 6 (Segunda Edición). (2011). Dirección de Epidemiología, Ministerio de Salud, Argentina.
76. Acute respiratory infections. Organización Mundial de la Salud. Disponible en http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/. Revisado el 17/02/2014.

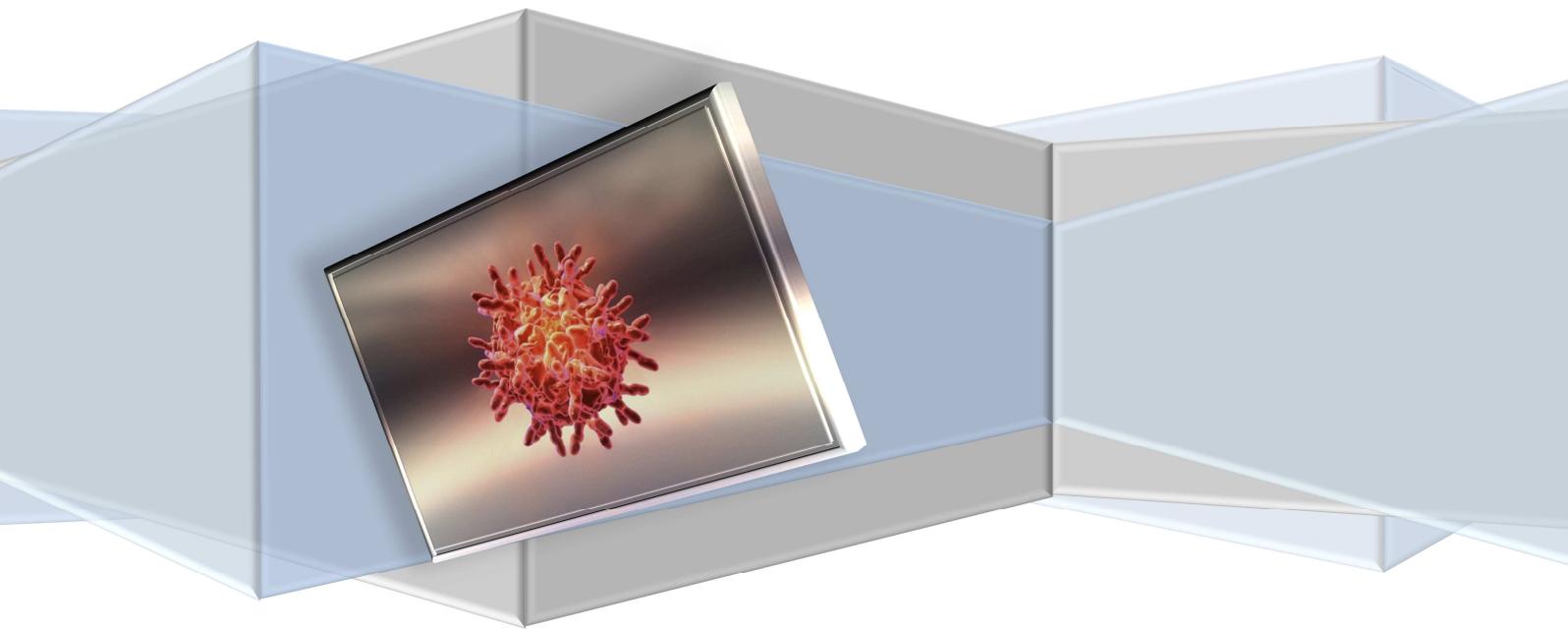
- 77.** Children: reducing mortality. (2012). Organización Mundial de la Salud. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/en/>. Revisado el 17/02/2014.
- 78.** Bossio, J. C. y Arias, S. J. Mortalidad infantil en la Argentina. (1999). *Arch Argent Pediatr*, **99**, 481-576.
- 79.** Tregoning, J. S. y Schwarze, J. (2010). Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology and immunology. *Clin Microbiol Rev*, **23** (1), 74-98.
- 80.** Bicer, S., Giray, T., Cöl, D., Erdag, G. C., Vitrinel, A., Gürol, Y., Celik, G., Kaspar, C. y Küçük, Ö. (2013). Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. *Ital J Pediatr*, **39** (22), 1-10.
- 81.** Suryadevara, M., Cummings, E., Bonville, C. A., Bartholoma, N., Riddell, S., Kiska, D., Rosemberg, H. F. y Domachowske, J. B. (2011). Viral etiology of acute febrile respiratory illnesses in hospitalized children younger than 24 months. *Clin Pediatr (Phila)*, **50** (6), 513-517.
- 82.** Kusel, M. M. H., de Klerk, N. H., Holt, P. G., Keadze, T., Johnston, S. L. y Sly, P. D. (2006). 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*, **25** (8), 680-686.
- 83.** QIAGEN (2010). QIAamp® Viral RNA Mini Handbook (Third Edition). Disponible en <http://www.qiagen.com>. Revisado el 17/02/2014.
- 84.** Steininger, C., Aberle, S. W. y Popow-Kraupp, T. (2001). Early detection of acute rhinovirus infections by a rapid reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol*, **39** (1), 129-133.
- 85.** Roux, K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harb. Protoc.* **4** (4), 1-6.
- 86.** Vidaurreta, S. M., Marcone, D. N., Ellis, A., Ekstrom, J., Cukier, D., Videla, C., Carballal, G. y Echavarría, M. (2011). Infección respiratoria aguda viral en niños menores de 5 años. Estudio epidemiológico en dos centros de Buenos Aires, Argentina. *Arch Argent Pediatr*, **109** (4), 296-304.

- 87.** Marcone, D. N., Videla, C., Ricarte, C., Carballal, G., Vidaurreta, S. y Echavarría, M. (2012). Rhinovirus detection by real-time PCR in children with acute respiratory infection in Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol*, **44**, 259-265.
- 88.** Albuquerque, M. C. M., Varella, R. B. y Santos, N. (2012). Acute respiratory viral infections in children in Rio de Janeiro and Teresópolis, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **54** (5), 249-255.
- 89.** Iwane, M. K., Prill, M. M., Lu, X., Miller, E. K., Edwards, K. M., Hall, C. B., Griffin, M. R., Staat, M. A., Anderson, L. J., Williams, J. V., Weinberg, G. A., Ali, A., Szilagyi, P. G., Zhu, Y. y Erdman, D. D. (2011). Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children. *J Infect Dis*, **204**, 1702-1710.
- 90.** Huijskens, E. G., Biesmans, R. C., Buiting, A. G., Obihara, C. C. y Rossen, J. W. (2012). Diagnostic value of respiratory virus detection in symptomatic children using real-time PCR. *Virol J*, **9** (276), 1-7.
- 91.** Piñero Fernández, J. A., Alfayete Migueléz, S., Menasalvas Ruiz, A., Salvador García, C., Moreno Docón, A. y Sánchez-Solís de Querol, M. (2012). Características epidemiológicas, clínicas y terapéuticas de lactantes hospitalizados por bronquiolitis. *An Pediatr*, **77** (6), 391-396.
- 92.** Zhang, G., Hu, Y., Wang, H., Zhang, L., Bao, Y. y Zhoun, X. (2012). High incidence of multiple viral infections identified in upper respiratory tract infected children under three years of age in Shanghai, China. *PLOS One*, **7** (9), 1-6.
- 93.** Miller, E. K., Bugna, J., Libster, R., Shepherd, B. E., Scalzo, P. M., Acosta, P. L., Hijano, D., Reynoso, N., Batalle, J. P., Coviello, S., Klein, M. I., Bauer, G., Benitez, A., Kleeberger, S. R. y Polack, F. P. (2012). Human rhinoviruses in severe respiratory disease in very low birth weight infants. *Pediatrics*, **129** (1), 60-67.
- 94.** Martínez, F.D., Wright, A. L., Taussig, L. M., Holberg, C. J., Halonen, M. y Morgan, W. J. (1995). Asthma and wheezing in the first six years of life. *New Engl J Med*, **332** (3), 133-138.

95. Papadopoulos, N. G., Bates, P. J., Bardin, P. G., Papi, A., Leir, S. H., Fraenkel, P. G., Meyer, J., Lackie, P. M., Sandreson, G., Holgate, S. T. y Johnston, S. L. (2000). Rhinoviruses infect the lower airways. *J Infect Dis*, **181**, 1875-1884.
96. Ochoa Sangrador, C. y González de Dios, J. (2010). Conferencia de consenso sobre bronquiolitis aguda (II): epidemiología de la bronquiolitis aguda. Revisión de la evidencia científica. *An Pediatr*, **72** (3), 222.e1-222.e26.
97. Hai, L. T., Bich, V. T. N., Ngai, L. K., Diep, N. T. N., Phuc, P. H., Hung, V. P., Taylor, W. R., Horby, P., Liem, N. T. y Wertheim, H. F. L. (2012). Fatal respiratory infections associated with rhinovirus outbreak, Vietnam. *Emerg Infect Dis*, **18** (11), 1886-1888.
98. Franco, D., Delfraro, A., Abrego, L., Cano, M., Castillo, C., Castillo, M., Castillo, J., Pascale, J. y Arbiza, J. (2012). High genetic diversity and predominance of rhinovirus A and C from Panamanian hospitalized children under five years with respiratory infections. *Virol J*, **9** (257), 1-6.
99. Jartti, T., Lehtinen, P., Vuorinen, T., Koskenvuo, M. y Ruuskanen, O. (2004). Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. *J Med Virol*, **72** (4), 695-699.
100. Jansen, R. R., Wieringa, J., Koekkoek, S. M., Visser, C. E., Pajkrt, D., Molenkamp, R., de Jong, M. D. y Schinkel, J. (2011). Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: toward defining clinically relevant cutoff values. *J Clin Microbiol*, **49** (7), 2631-2636.
101. Wright, P. F., Deatly, A. M., Karron, R. A., Belshe, R. B., Shi, J. R., Gruber, W. C., Zhu, Y. y Randolph, V. B. (2007). 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*, **45** (7), 2126-2129.

- 102.** Proenca-Modena, J. L., Gagliardi, T. B., de Paula, F. E., Iwamoto, M. A., Ferreira Criado, M., Camara, A. A., Olszanski Acrani, G., Leite Cintra, O. A., Cervi, M. C., de Paula Arruda, L. K. y Arruda, E. (2011). Detection of human bocavirus mRNA in respiratory secretions correlates with high viral load and concurrent diarrhea. *PLOS One*, **6** (6), e21083.

ANEXOS



ANEXO 1

GENOMA DEL RINOVIRUS Y ZONA DE APAREO DE PRIMERS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO

ORGANISMO: Human rhinovirus 14, genoma completo

NÚMERO DE ACCESO GENBANK: NC_001490

VERSION: NC_001490.1 GI:9626735

DBLINK: Project 15309

AUTORES: Callahan, P. L., Mizutani, S. y Colonno, R. J.

SECUENCIA

```

1  ttaaaacagc ggatgggtat cccaccattc gaccattgg gtgtagtact ctggtactat
61  gtacctttgt acgcctgttt ctcccccaacc acccttcctt aaaattccca cccatgaaac
121 gttagaagct tgacattaaa gtacaatagg tggcgccata tccaatgggtg tctatgtaca
181 agcacttctg tttcccagga gcgagggtata ggctgtaccc actgccaaaa gcctttaacc
241 gttatccgcc aaccaactac gtaacagtta gtaccatctt gttcttgact ggacgttcga
301 tcaggtggat tttccctcca ctagtttggt cgatgaggct aggaattccc cacgggtgac
361 cgtgtcctag cctgcgtggc ggccaacca gcttatgctg ggacgccctt ttaaggacat
421 ggtgtgaaga ctgcgatgtg cttggtttgtg agtcctcgg ccctgaatg cggtaacct
481 taacctaga gccttatgcc acgatccagt ggttgaagg tcgtaatgag caattccggg
541 acgggaccga ctactttggg tgccgtggt tctcattttt cttcatattg tcttatggtc
601 acagcatata tatacatata ctgtgatcat gggcgctcag gtttctacac agaaaagtgg
661 atctcacgaa aatcaaaaaca ttttgaccaa tggatcaaat cagactttca cagtataaaa
721 ttactataag gatgcagcaa gtacatcatc agctggtcaa tcaactgtcaa tggaccatc
781 taagtttaca gaaccagtta aagatctcat gcttaagggt gcaccagcat tgaattcacc
841 caatgttgag gcctgtgggt atagtgatag agtacaaca atcacactcg ggaattcaac
901 aataacaaca caagaagcag ccaacgctgt tgtgtgttat gctgaatggc cagagtacct
961 tccagatgtg gacgctagtg atgtcaataa aacttcaaaa ccagacactt ctgtctgtag
1021 gttttacaca ttggatagta agacatggac aacaggttct aaaggctggg gctggaaatt
1081 accagatgca ctcaaggata tgggtgtggt cgggcaaaac atgtttttcc actcactagg
1141 aagatcaggt tacacagtac acgttcagtg caatgccaca aaattccata gcggttgctt
1201 acttgtagtt gtaataccag aacaccaact ggcttcacat gagggtggca atgtttcagt
1261 taaatacaca ttcacgcata caggtgaacg tggatatagat ttatcatctg caaatgaagt
1321 gggagggcct gtcaaggatg tcatatacaa tatgaatggg actttattag gaaatctgct
1381 cattttocct caccagttca ttaatctaag aaccaataat acagccacaa tagtgatacc
1441 atacataaac tcagtacca ttgattcaat gacacgtcac aacaatgtct cactgatggt
1501 catccctatt gccctctta cagtaccaac tggagcaact ccctcactcc ctataacagt
1561 cacaatagca cctatgtgca ctgagttctc tgggataagg tccaagtcaa ttgtgccaca
1621 aggtttgcca actacaactt tgccggggtc aggacaattc ttgaccacag atgacaggca
1681 atccccagc gcactgcca attatgagcc aactccaaga atacacatac tagggaaagt
    
```

106 pb

NCR 5'

1741 tcataacttg ctagaatta tacaggtaga tacactcatt cctatgaaca acacgcatac
 1801 aaaagatgag gttaacagtt acctcatacc actaaatgca aacaggcaaa atgagcaggt
 1861 ttttgggaca aacctgttta ttggtgatgg ggtcttcaaa actactcttc tgggtgaaat
 1921 tgttcagtac tatacacatt ggtctggatc acttagattc tcttcgatgt atactggtcc
 1981 tgccttgctc agtgctaaac tcaactctagc atacaccccg cctgggtgctc gtggtccaca
 2041 ggacaggaga gaagcaatgc taggtactca tgttgtctgg gatattggtc tgcaatccac
 2101 catagtaatg acaataccat ggacatcagg ggtgcagttt agatatactg atccagatac
 2161 atacaccagt gctggctttc tatcatgttg gtatcaaact tctcttatac ttccccaga
 2221 aacgaccggc caggctact tattatcatt cataagtgca tgtccagatt ttaagcttag
 2281 gctgatgaaa gatactcaaa ctatctcaca gactgttgca ctcaactgaag gcttaggtga
 2341 tgaattagaa gaagtcacg ttgagaaaac gaaacagacg gtggcctcaa tctcatctgg
 2401 tccaaaacac acacaaaag tcccatact aactgcaaac gaaacagggg ccacaatgcc
 2461 tgttcttcca tcagacagca tagaaaccag aactacctac atgcaactta atggttcaga
 2521 aactgatgta gaatgctttt tgggtcgtgc agcttgtgtg catgtaactg aaatacaaaa
 2581 caaagatgct actggaatag ataatcacag agaagcaaaa ttgttcaatg attggaaaat
 2641 caacctgtcc agcctgttcc aacttagaaa gaaactggaa ctcttcactt atgttaggtt
 2701 tgattctgag tataccatac tggccactgc atctcaacct gattcagcaa actattcaag
 2761 caatttggtg gtccaagcca tgtatgttcc acatgggtgcc ccgaaatcca aaagagtggg
 2821 cgattacaca tggcaaagt cttcaaacc cagtgtattc ttcaaggtgg gggatacatc
 2881 aaggtttagt gtgccttatg taggattggc atcagcatat aattgttttt atgatggtta
 2941 ctacatgat gatgcagaaa ctcaagtatg cataactggt ctaaaccata tgggtagtat
 3001 ggcatcaga atagtaaatg aacatgatga acacaaaact cttgtcaaga tcagagtta
 3061 tcacagggca aagctcgttg aagcatggat tccaagagca cccagagcac taccctacac
 3121 atcaataggg cgcacaaatt atcctaagaa tacagaacca gtaattaaga agaggaaagg
 3181 tgacattaaa tcctatgggt taggacctag gtacgggtggg atttatacat caaatgttaa
 3241 aataatgaat taccacttga tgacaccaga agaccacat aatctgatag caccctatcc
 3301 aaatagagat ttagcaatag tctcaacagg aggacatggt gcagaaacaa taccacactg
 3361 taaccgtaca tcagggtggtt actattccac atattacaga aagtattacc ccataatttg
 3421 cgaaaagccc accaacatct ggattgaagg aagcccttat tacccaagta gatttcaagc
 3481 aggagtgatg aaaggggttg ggccggcaga gctaggagac tgcgggtggga ttttgagatg
 3541 catacatggt cccattggat tgtaacagc tgaaggtagt ggatatggtt gttttgctga
 3601 catacgacag ttggagtgta tcgcagagga acaggggctg agtgattaca tcacagggtt
 3661 gggtagagct tttggtgctg ggttcaactga ccaaactca acaaaagtca cagaactaca
 3721 agaagtggcg aaagatttcc tcaccacaaa agttttgtcc aaagtgggtca aaatgggttc
 3781 agcttttagt atcatttgca gaaatcatga tgaactgggtc actgttacgg ccaactctagc
 3841 actacttggg tgtgatggat ctcttggag atttctgaag atgtacattt ccaaactt
 3901 tcagggtgct tacattgaaa gacaagcaaa tgatggatgg ttcagaaagt ttaatgatgc
 3961 atgtaatgct gcaaagggat tggaatggat tgctaataag atttccaaac tgattgaatg
 4021 gataaaaaac aaagtacttc ccaagccaa agaaaaacta gaattttgta gtaaactcaa
 4081 acaacttgat atactagaga gacaataaac caccatgcat atctcgaatc caacacagga
 4141 aaaacgagag cagttgttca ataactgatt gtggttgga caaatgtcgc aaaagtttgc
 4201 cccattttat gccgttgaat caaaaagaat cagggaaactc aagaacaaaa tggtaaatta
 4261 tatgcaattt aaaagtaaac aaagaactga accagtgtgt gtattaatcc atggtacacc
 4321 cggttctggt aatcattaa caacatccat tgtgggacgt gcaattgcag aacacttcaa

4381 ttcagcagta tattcaattc caccagatcc caagcacttt gatggttatc agcaacagga
4441 agttgtgatt atggatgatc tgaacaaaaa tccagatgga caggatataa gcatgttttg
4501 tcaaatgggt tcttcagtgg atttcttgcc tccaatggct agtttagata acaagggcat
4561 gttattcacc agtaattttg ttctagcctc cacaaattct aacacactaa gcccccaac
4621 aatcttgaat cctgaagctt tagtcaggag atttggtttt gacctagata tatgtttgca
4681 tactacctac acaaagaatg gaaaactcaa tgcaggcatg tcaaccaaga catgcaaga
4741 ttgccatcaa ccatctaatt tcaagaaatg ttgcccccta gtctgtggaa aagctattag
4801 cttggtagac agaactacca acgttaggta tagtgtggat caactggtca cggctattat
4861 aagtgatttc aagagcaaaa tgcaattac agattcccta gaaactgt ttcaaggacc
4921 agtgtataaa gatttagaga ttgatgtttg caacacacca ccttcagaat gtatcaacga
4981 tttactgaaa tctgtagatt cagaagagat tagggaatat tgtaagaaga agaatggat
5041 tatacctgaa attcctacca acatagaaag ggctatgaat caagccagca tgattattaa
5101 tactattctg atgtttgtca gtacattagg tattgtttat gtcatttata aattgtttgc
5161 tcaaaactcaa ggaccatatt ctggtaaccg gcctcacaat aaactaaaag ccccaacttt
5221 acgcccagtt gttgtgcaag gaccaaacac agaatttgca ctatccctgt taaggaaaaa
5281 cataatgact ataacaacct caaagggaga gttcacaggg ttaggcatac atgatcgtgt
5341 ctgtgtgata cccacacacg cacagcctgg tgatgatgta ctagtgaatg gtcagaaaat
5401 tagagttaag gataagtaca aattagtaga tccagagAAC attaatctag agcttacagt
5461 gttgacttta gatagaaatg aaaaattcag agatatacagg ggatttataat cagaagatct
5521 agaaggtgtg gatgccactt tggtagtaca ttcaataaac tttaccaaca ctatcttaga
5581 agttggcctt gtaacaatgg caggacttat taatttgagt agcaccacca ctaacagaat
5641 gattcgttat gattatgcaa caaaaactgg gcagtgtgga ggtgtgctgt gtgctactgg
5701 taagatcttt ggtattcatg ttggcggtaa tggaaagaca ggattttcag ctcaacttaa
5761 aaaacaatat tttgtagaga aacaaggcca agtaatagct agacataagg ttagggagtt
5821 taacataaat ccagtcaaca cggcaactaa gtcaaaatta catcccagtg tattttatga
5881 tgtttttcca ggtgacaagg aacctgctgt attgagtgac aatgatcca gactggaagt
5941 taaattgact gaatcattat tctctaagta caaggggaat gtaaatacgg aaccactga
6001 aaatatgctt gtggctgtag accattatgc agggcaacta ttatcactag atatccccac
6061 ttctgaactt aactaaaag aagcattata tggagtagat ggactagaac ctatagatat
6121 tacaaccagt gcaggatttc cctatgtgag tcttgggatc aaaaagagag acattctgaa
6181 taaagagacc caggacacag aaaagatgaa gttttatcta gacaagtatg gcattgactt
6241 gcctctagtt acatatatta aggatgaatt aagaagtgtt gacaaagtcc gattagggaa
6301 aagtagatta attgaagcct ccagtttgaa tgattctgtt aacatgagaa tgaaactagg
6361 caacctttac aaagcattcc atcaaaatcc cgggtgttctg actggatcag cagtgggttg
6421 tgatcctgat gtgttttggg ctgtcatccc ttgcttaatg gatgggcacc tgatggcatt
6481 tgattactct aattttgatg cctctttgtc accagtttgg tttgtctgtc tagagaaggt
6541 tttgaccaag ttaggctttg caggctcttc attaattcaa tcaatttgta ataccatca
6601 tatcttttagg gatgaaatat atgtggttga aggtggcatg ccctcagggg gttcaggaac
6661 cagcatattc aattccatga tcaacaacat aatcattagg actttgatat tagatgcata
6721 taaaggaata gatttagaca aacttaaaat cttagcttac ggtgatgatt tgattgtttc
6781 ttatccttat gaactggatc cacaagtgtt ggcaactctt ggtaaaaatt atggactaac
6841 catcacaccc ccagacaaat ctgaaacttt tcaaaaaatg acatgggaaa acttgacatt
6901 tttaaagaga tacttcaagc ctgatcaaca atttcccttt ttggttcacc cagttagtcc
6961 catgaaagat atacatgagt caatcagatg gacaaaggat ctaaaaaaca cacaggatca

```
7021 cgtccgatca ttatgcatgt tagcatggca ctcaggagaa aaagagtaca atgaattcat
7081 tcagaagatc agaactactg acattggaaa atgtctaatt ctcccagaat acagcgtact
7141 taggaggcgc tggttggacc tcttttaggt taacaatata gacacttaat ttgagtagaa
7201 gtaggagttt ataaaaaaaa aaaaaaa
```

Notas

- ✓ Las bases resaltadas en color azul conforman la NCR 5' del genoma del rinovirus.
- ✓ Las bases resaltadas en color verde constituyen los sitios de apareo de los primers RV1 y RV2 (fragmento de 106 pb).
- ✓ Las bases subrayadas en color rojo constituyen los sitios de apareo de los primers RV3 y RV4 (fragmento de 93 pb).
- ✓ Las bases resaltadas en color naranja conforman la cola poliadenilada del genoma del rinovirus.

ANEXO 2

GIBCO™ DNA TYPING® GRADE 50X TAE BUFFER

Composición:

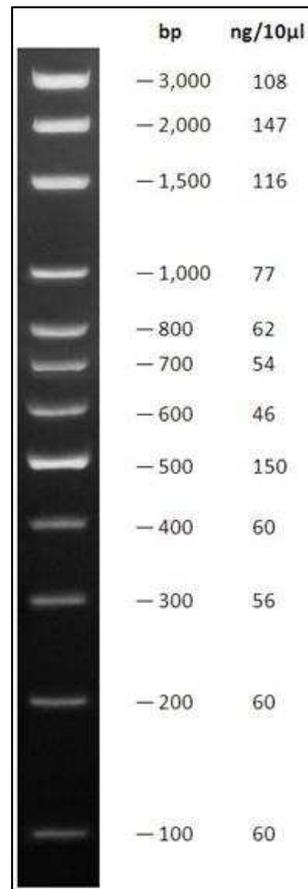
Tris-Acetato 2 M
 EDTA 50 mM

Preparación del Buffer TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM):

Mezclar 1 volumen de Buffer TAE 50X con 49 volúmenes de agua destilada.

SOLIS BIODYNE 100 bp DNA LADDER

Concentración: 0,1 ug/ul
Rango de tamaño: 100 – 3000 bp
Número de bandas: 12



ANEXO 3

Administración Nacional de Laboratorio e Institutos de Salud
 "Dr. Carlos G. Malbrán"
 Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
 "Dr. Emilio Coni"
 Blas Parera 8260 (3000) Santa Fe
 T. 0342 4892830 Fax. 0342 4892827
 e-mail labconi@infovia.com.ar

FICHA CLINICO-EPIDEMIOLÓGICA DE RINOVIRUS

Nº de Orden:
Hospital:.....
Nº de Historia Clínica:.....
Apellido y Nombre del Paciente:.....
Edad:.....
Sexo:.....
Fecha de Nacimiento:.....
Edad Gestacional al nacer:.....
Peso natal:.....
Peso actual:.....
Fecha de internación:.....
Fecha de toma de muestra del ANF:.....

ANTECEDENTES CLINICOS (Marcar lo que corresponda)

| | |
|--|--|
| <p>Cardiopatía Congénita Desnutrición Síndrome de Down</p> | <p>Inmunodeficiencia Asma Otros:</p> |
|--|--|

INTERNACIONES PREVIAS POR ENFERMEDAD RESPIRATORIA

SI **NO** **Cantidad:**.....

Diagnóstico:.....

Sibilancias recurrentes: **SI** **NO**

EPISODIO ACTUAL

Diagnóstico de Admisión:

Fecha de comienzo de la enfermedad respiratoria:.....

HALLAZGOS RADIOLÓGICOS DE TÓRAX

Atrapamiento aéreo:

Infiltrado Intersticial:

Infiltrado Alveolar: **Múltiple:** **Unilobar:**

Adenomegalias: **Derrame pleural:** **Atelectasia:**

Otros:.....

HALLAZGOS DE LABORATORIO

Leucocitosis: **SI** **NO** **Fórmula:** **Eritro:.....**

Proteína C Reactiva: **Positiva** **Negativa**

MEDICACIONES EMPLEADAS: **SI** **NO**

(Proporcionar dosis, duración y razón de empleo)

.....

Oxígeno: **SI** **NO**

Duración:.....

Fiebre: **SI** **NO**

Si fue internado en UTI, duración de la estadía:.....

Asistencia Respiratoria, duración del empleo:.....

Fecha de alta hospitalario:.....

Dado de alta: **Vivo** **Muerto**

Diagnóstico al alta hospitalario:

Neumonía

Bronquiolitis

Bronquitis

Infección de Vías Altas

Crisis Asmática

Episodio de sibilancias

Otros:.....

Duración de la estadía hospitalaria:.....

SEGUIMIENTO DEL PACIENTE (posterior a la internación)

Fue internado por síntomas similares: SI NO

Fecha:.....

Diagnóstico de admisión:

.....
.....
.....
.....

Si fue internado en UTI, duración de la estadía:.....

Tratamiento: (Nombrar solamente)

.....
.....
.....
.....

Duración de la estadía hospitalaria:.....

Diagnóstico al alta:

.....
.....
.....