



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE RINOVIRUS ASOCIADOS A
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS EN
MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LIC. EN C. EUTIMIO FERNANDO APONTE SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ

Instituto de Biotecnología UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. José Luis Puente García. IBt UNAM

Dra. Hilda María Lomeli Buyoli. IBt UNAM

Dr. Ramón Gonzáles García Conde. F.C UAEM

Dra. Rosa Gutiérrez Ríos. IBt UNAM

Dr. Takuya Nishigaki Shimizu. IBt UNAM

MÉXICO, D. F. Septiembre, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Morelos, bajo la dirección del Dr. Carlos Federico Arias Ortiz, en el laboratorio de los doctores Carlos F. Arias y Susana López.

Durante la realización del mismo el alumno contó con el apoyo económico de CONACyT.

Comité Tutoral:

Dr. Carlos Federico Arias Ortiz

Dr. Alejandro Garciarubio Granados

Dra. Liliana Pardo López

TABLA DE CONTENIDO

Abreviaturas	iv
1 Resumen	1
2 Introducción	3
2.1 Rinovirus (RV).....	6
3 Hipótesis.....	11
4 Objetivos.....	12
5 Metodología	12
5.1 Poblaciones de estudio.....	12
5.2 Extracción de material genético y detección viral.....	13
5.3 Clasificación de RV	13
5.4 Purificación y secuenciación	14
5.5 Designación de genotipo y filogenias	14
5.6 Análisis estadístico.....	14
5.7 Colaboradores.....	15
6 Resultados.....	16
6.1 Detección de RV	16
6.2 Coinfección de RV con otros virus respiratorios.....	20
6.3 Características clínicas de los niños positivos a RV.....	21
6.4 Diversidad genética de los RV encontrados.....	24
7 Discusión	27
8 Referencias.....	30
9 Anexos.....	38
9.1 Anexo 1	38
9.2 Anexo 2.....	39
9.3 Anexo 3.....	40
9.4 Anexo 4.....	41

Abreviaturas

AdV	Adenovirus
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Flu-A	Influenza virus
Frec.	Frecuencia
HBoV	Bocavirus de humano
HCoV	Coronavirus humano
HEV	Enterovirus humano
HiB	Haemophilus influenzae
IBt	Instituto de Biotecnología
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IRA	Infección respiratoria aguda
IRES	Sitio interno de unión al ribosoma
IRTI	Infección respiratoria del tracto inferior
IRTS	Infección respiratoria del tracto superior
KDa	Kilo Dalton
LDLR	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
MPV	Metapneumovirus
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	Nucleótidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PASW	Predictive Analytics SoftWare (PASW)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIV	Parainfluenza virus
RNA	Ácido ribonucleico
RSV	Virus respiratorio sincicial
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
RV	Rinovirus
SARS	Síndrome Respiratorio agudo severo
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UTR	No traducido
VP	Proteína viral

1 Resumen

Las infecciones respiratorias agudas, IRA, son causa de miles de muertes anualmente alrededor del mundo, por lo que estudiar a los patógenos responsables de ellas es de gran importancia. Los rinovirus (RV) son patógenos que recientemente se han encontrado en enfermedades más severas a las que se tenía reportado. Existen datos limitados sobre la etiología viral de las infecciones del tracto respiratorio en los países en desarrollo, y la mayoría de los estudios realizados en otras partes del mundo, que han estudiado específicamente la incidencia de RV, se han llevado a cabo en niños hospitalizados. En algunos de esos estudios, la especie C de RV se ha asociado con infecciones de las vías respiratorias más graves que las especies A y B.

Este estudio se realizó con el objetivo de buscar si existe una relación especie-severidad y determinar la frecuencia y diversidad de cepas de RV asociados con infecciones del tracto respiratorio superior e inferior (IRTS, IRTI) en niños mexicanos, así como describir las características clínicas de la enfermedad asociada con diferentes especies de RV.

El estudio fue de vigilancia de niños con IRTS en 5 ciudades del estado de Veracruz y niños con IRTI de 6 hospitales en diversas regiones de México. Las muestras fueron procesadas por un PCR múltiplex que detecta 15 virus respiratorios. En las muestras positivas para RV se amplificó una parte de la región 5' no traducida (5'-UTR) del genoma y se secuenció por el método de Sanger.

Se analizaron 776 muestras de niños con infecciones de las vías respiratorias: 526 niños con IRTS y 250 niños con IRTI. Se detectaron uno o varios virus respiratorios en 71% IRTS y 77% en IRTI. En las IRTS, 17,5% fueron positivas para RV, mientras que este virus se encontró en 24,8% de IRTI. En 73 niños con IRTS con RV asociado se determinó la especie del virus: 61,6% RV-A, 37% RV-C sólo uno RV-B (1,4%). De los 43 niños con IRTI y RV asociado encontramos 51,2% RV-A, 41,8% RV-C, y 7% RV-B. No se encontraron diferencias significativas en las características clínicas de los pacientes con infección por RV-

A o RV-C. Se encontró una alta diversidad genética de cepas de RV tanto en las IRTS como en IRTI.

Concluimos que la severidad de la enfermedad puede estar dada a nivel serotipo/genotipo de RV más que por la especie en sí (A o C), los RV son un patógeno respiratorio frecuente en niños mexicanos con IRTS y IRTI. Las especies RV-A y RV-C se encontraron con mucha frecuencia, tanto en los niños hospitalizados como ambulatorios. Se destaca la alta prevalencia de RV y de la diversidad genética de las cepas circulantes en México.

2 Introducción

Todos los seres vivos sirven como hospederos de innumerables microbios y parásitos; coexistimos pacíficamente con algunos, combatimos a muerte contra otros y compartimos todo ya sea bueno o malo con todos los que conocemos. Muchas veces la coexistencia e interacción con ciertos agentes tiene resultados fatales. Esto provoca que las diferentes disciplinas que estudian la salud muevan su frontera rápidamente [1]. Las enfermedades infecciosas han sido causa de millones de muertes a nivel mundial desde tiempos antiguos; en la antigua Grecia y Egipto se reportaron epidemias de viruela, lepra, tuberculosis, infecciones en las meninges y difteria [2]. En tiempos más recientes algunas de las pandemias más famosas han sido la plaga de Justiniano, entre los años 541-750 que causó la muerte del 50 al 60% de la población europea [1]; la peste negra de 1347-1352 que causó la muerte a millones de personas en Europa a lo largo de 5 años [3]; otra fue la primera epidemia de gripe europea que se produjo entre 1556 y 1560 con una tasa estimada de mortalidad de 20% de la población [4]. La gran peste de Marsella en 1720 que mató a 100,000 personas en la ciudad y las provincias circundantes [5]. La llegada de los exploradores europeos al centro y sur de América trajo consigo nuevos patógenos como la viruela, el sarampión y el tifo. Estos nuevos patógenos y las enfermedades asociadas causaron pandemias entre los nativos durante los siglos XV y XVI [4].

La viruela mató a aproximadamente 60 millones de europeos durante el siglo XVIII (aprox. 400,000 personas por año) [6]. El 30% de los infectados, incluyendo el 80% de los niños menores a 5 años de edad, murió de la enfermedad, y un tercio de los supervivientes quedó ciego [7]. En el siglo XVIII en Europa Occidental, la tuberculosis alcanzó una incidencia de hasta 900 muertes por cada 100,000 [8] en 1918 una de cada seis muertes en Francia todavía fueron causadas por la tuberculosis. La pandemia de influenza de 1918 provocó de 25 a 50 millones de muertes [9]. Hoy en día la influenza, cada año, provoca la muerte de alrededor de 250,000 a 500,000 en todo el mundo [10].

Con esto queda claro que las enfermedades infecciosas han sido de gran importancia desde la antigüedad y representan actualmente una gran preocupación para los sistemas de salud a nivel mundial.

Las infecciones respiratorias agudas (IRA), han sido y continúan siendo particularmente importantes. Estas se clasifican como infecciones respiratorias del tracto superior (IRTS) o inferior (IRTI). El tracto respiratorio superior comprende la nariz, la cavidad nasal, la boca, la garganta (faringe) y la laringe. Por otra parte el tracto respiratorio inferior incluye la tráquea y, dentro de los pulmones, los bronquios, los bronquiolos y los alvéolos.

La proporción de las IRAs, moderadas o severas, varía entre países dependiendo de su economía, lo que afecta directamente a la infraestructura de los sistemas de salud. Las IRTI en niños menores de cinco años son más graves en los países en desarrollo debido a las diferencias en las etiologías específicas y factores de riesgo, lo que resulta en una mayor tasa de mortalidad. Aunque, en cierta medida, la atención médica puede disminuir la severidad y más aun la fatalidad, muchos de los pacientes con IRTI graves no responden a la terapia, en parte por la escasez o ausencia de medicamentos efectivos para combatirlas. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 10 millones de niños menores de 5 años mueren cada año [11]; en el 2012 se reportaron 6.6 millones de muertes de niños menores a 5 años, de las cuales 15% fueron a causa de neumonía [12].

Las IRTS son las enfermedades infecciosas más comunes, dentro de ellas están incluidas la rinitis (catarro común), sinusitis, infecciones del oído, faringitis aguda o faringoamigdalitis, epiglotitis y laringitis. De éstas, las infecciones de oído y faringitis tienen las complicaciones más graves (sordera y fiebre reumática aguda, respectivamente). La gran mayoría de las IRTS tiene una etiología viral, donde los rinovirus (RV) representan del 25 a 30% de los casos; los virus sincicial respiratorio (RSV), parainfluenza (PIV), influenza, metapneumovirus humano (hMPV), adenovirus (AdV) del 25 al 30% de los casos y coronavirus (hCoV) causan el 10% [13]. Los otros casos pueden ser a causa de bacterias o posiblemente por virus no frecuentemente asociados a problemas respiratorios, como herpes simple, varicella-zoster, Hantavirus, Parechovirus, virus de Epstein-Bar, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus*

pneumoniae, *Hemophilus influenzae*. Ya que la mayoría de las IRTS son auto-limitadas, las complicaciones pueden ser más importantes que las mismas infecciones, ya que éstas predisponen a los pacientes a IRTI [14].

La neumonía es la IRTI mas común y continúa siendo la principal causa de muerte entre los niños menores a 5 años en los países en desarrollo y de las personas mayores en los países desarrollados. La neumonía puede ser causada tanto por bacterias como por virus. Los virus son responsables del 40 al 50% de las infecciones en los lactantes y niños hospitalizados por neumonía en los países en desarrollo [15, 16, 17]. En estos países, la tasa de mortalidad en niños con neumonía viral varía de 1 a 7.3% [16, 18], con neumonía bacteriana del 10 al 14% y con infecciones virales y bacterianas mixtas del 16 al 18% [19, 20]. Las bacterias mas comúnmente asociadas a cuadros clínicos de neumonía son *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), *Haemophilus influenzae*, en su mayoría de tipo b (Hib), y con menor frecuencia *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, y ocasionalmente por *Staphylococcus aureus* o por otros estreptococos.

Los virus más frecuentemente asociados a casos de neumonía son: RSV, RV, influenza A, B y C, hMPV y PIV tipos 1, 2, 3, y 4. En menor frecuencia HCoV tipos 229E, OC43, NL63, HKU1, SARS, AdV, Enterovirus (HEV). Aunque también se encuentran bocavirus de humano (HBoV), varicella-zoster, Hantavirus, parechovirus, virus de Epstein-Bar, herpesvirus humano 6 y 7, virus de herpes simplex, mimivirus, citomegalovirus y el virus de sarampión [21]. Los virus respiratorios suelen presentarse en ciertas estaciones durante el año y en estas temporadas son mas propensos a causar neumonía. Las epidemias de RSV se presentan cada uno o dos años normalmente a finales de otoño, los brotes epidémicos de RV surgen en otoño y primavera, mientras que influenza presenta picos a finales de otoño y principios del invierno. Se ha observado que varios virus pueden co-circular en diferentes meses del año.

El presente trabajo se centra en el papel que tienen los rinovirus en las infecciones respiratorias agudas de los tractos superior e inferior. A continuación se describirá de manera detallada a estos virus.

2.1 Rinovirus (RV)

Los RV pertenecen al género enterovirus dentro la familia *Picornaviridae*. Son virus que no contienen una cubierta lipídica y poseen un genoma de RNA de polaridad positiva con una longitud aproximada de 7.2kb. Una vez que el virus entra a la célula a través de endocitosis mediada por receptor (ICAM-1 o LDLR), el genoma es traducido de una manera independiente de CAP con ayuda de la secuencia interna de unión a ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) localizada en la región 5' no traducida (UTR por sus siglas en inglés) del genoma viral. Como resultado de la traducción se obtienen cuatro proteínas estructurales (VP1-4), las cuales forman la cápside, y siete no estructurales (2A-C y 3A-D; Fig. 1) [65].

Estudios serológicos revelaron que existen más de 100 serotipos de RV determinados por ensayos de neutralización. La neutralización de un virus se define como la pérdida de la infectividad a través de la reacción del virus con un anticuerpo específico. La dificultad de realizar estos ensayos con más de 100 virus, y los avances logrados en los métodos de secuenciación y bioinformática, han llevado a basar la clasificación de estos virus en la secuencia parcial y/o completa del genoma viral. El análisis de la secuencia completa del genoma de virus pertenecientes a 99 serotipos permitió clasificarlos en dos especies, la especie A representada por 74 de los serotipos y la especie B, compuesta por virus pertenecientes a 25 serotipos [22]. Estas especies se determinaron con base en el grado de identidad de la secuencia del genoma (ver adelante).

La diversidad genética de los serotipos de RV se debe principalmente a su alta frecuencia de mutación, resultado de la falta de actividad 3'→5' exonucleasa de la RNA polimerasa viral y a eventos de recombinación que pueden ocurrir entre dos genomas de cepas distintas cuando infectan y se replican en la misma célula [23].

Figura 1.

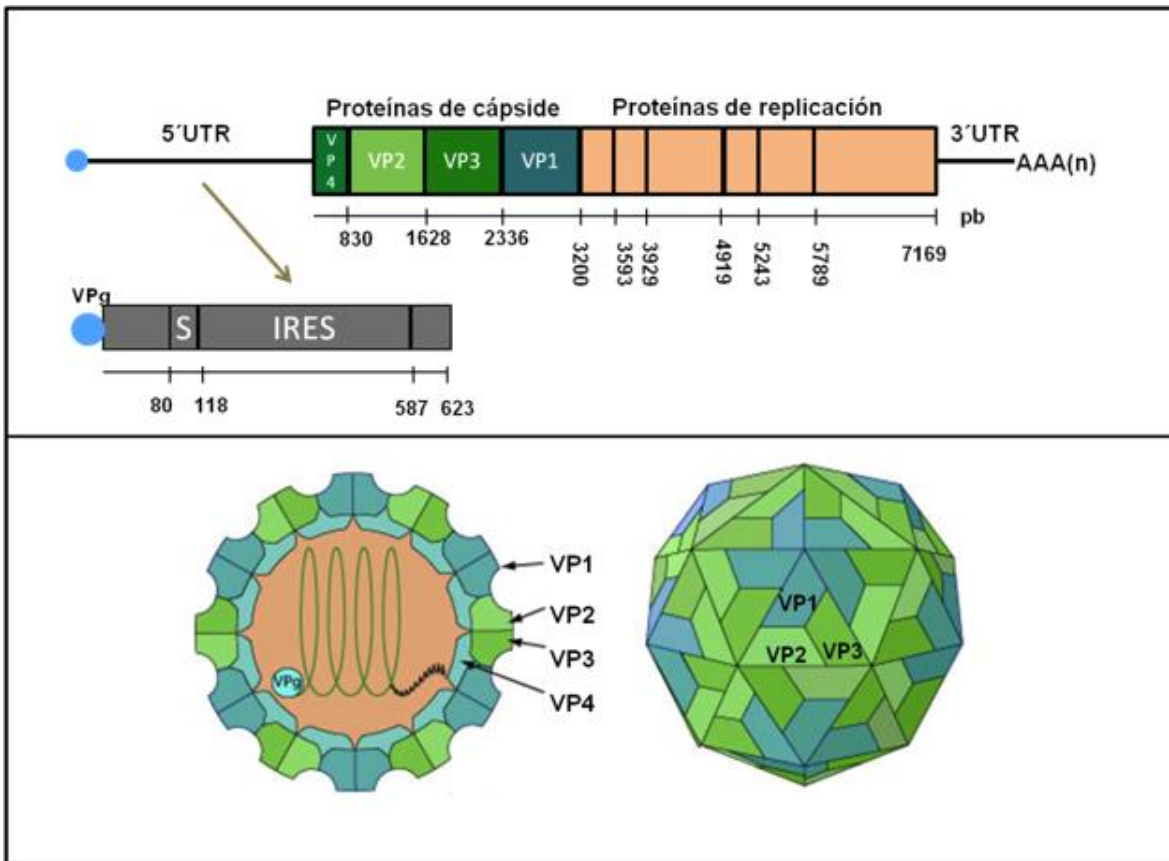


Figura 1. Esquema que muestra los componentes del genoma de los rinovirus y la organización estructural de las proteínas VP1-4. Modificado de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html.

La clasificación taxonómica actual de los picornavirus está basada en las proteínas de la cápside, en especial de la región del genoma que codifica para la proteína VP1. Los porcentajes de identidad de aminoácidos mas bajos, dentro de la misma especie en VP1 son: 57.7% y 68.3% en RV-A y RV-B, respectivamente. Entre especies los porcentajes de identidad de aminoácidos de VP1 están entre 35.1-43.6% [24]. El análisis de la secuencia que codifica para VP1 es poco práctico de realizar debido a que múltiples oligonucleótidos son requeridos para realizar la PCR debido a la alta variabilidad de esta región entre diferentes virus. Debido a lo anterior se han desarrollado análisis filogenéticos basados en la secuencia que codifica para las proteínas virales VP4/VP2, para la cual el 10% de divergencia asigna la especie [19] (Fig. 2A) y en la secuencia de un fragmento de 400 nucleótidos ubicado en la región hipervariable 5'UTR del genoma viral (Fig. 2B). Estas secuencias han mostrado ser útiles para la clasificación e identificación de estos virus [25].

Figura 2.

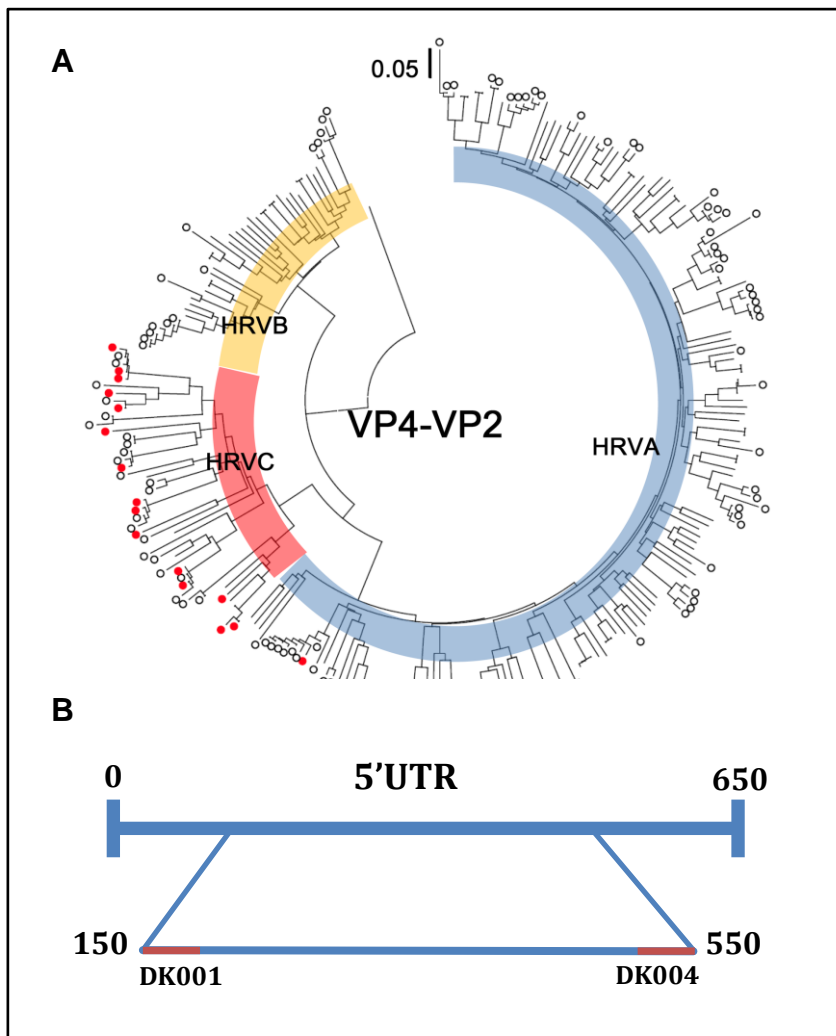


Fig.2 A) Árbol filogenético basado en la secuencia VP4/VP2 de RV. Realizado bajo el algoritmo de Neighbor Joining, en el cual se observa que los genotipos A y C comparten un ancestro común, el cual es hermano del ancestro de la especie B. [Tomado de Fuji N et al. 2011] B) Región 5'UTR (650nt), en la cual se puede observar la región de 400pb amplificada por los oligonucleótidos DK001 y DK004.

Los RV han sido asociados generalmente a enfermedades respiratorias leves, sin embargo, han sido detectados en pacientes con infecciones más severas, como neumonía y bronquiolitis [26]. Estudios epidemiológicos han revelado que las infecciones por RV se producen durante todo el año alrededor del mundo, con brotes más fuertes a principios de otoño y finales de primavera en las regiones templadas [27]. En 2006 se reportaron algunas cepas de RV que presentaron en la región VP4/VP2 una divergencia mayor al 13% con respecto a la especie A, la cual es la más cercana. Estas cepas fueron incluidas en una nueva especie denominada RV-C [22]. Los porcentajes de identidad nucleotídica a nivel genómico reportados para las tres especies se muestran en la tabla 1 (izquierda).

Se puede observar que las especies A y C presentan mayor similitud de secuencia (48-51%), mientras que los más distantes son la especie B y C (36-43%) [28]. Los porcentajes de identidad a nivel secuencia de la región 5'UTR se muestran en la tabla 1 (derecha).

Con base en estos métodos de clasificación se han realizado estudios en los cuales se reporta la incidencia de las diferentes especies de RV en pacientes con enfermedad respiratoria, siendo el de mayor frecuencia la especie A, seguida por la especie C y por último la B [29, 30, 31, 32]. La mayoría de los estudios realizados reportan que de las muestras positivas a RV, la especie C se presenta con una incidencia del 1.4 al 30.9%, dependiendo del grupo estudiado y los métodos de detección empleados [25]. Con base en estos datos, se ha concluido que la especie RV-C contribuye con una proporción significativa de las IRAs. Como se mencionó anteriormente RV ha sido asociado a enfermedades respiratorias leves, sin embargo la especie C se ha encontrado en pacientes con viremia, otitis, bronquiolitis, exacerbaciones de asma y neumonía [29, 30, 33, 34]. En estos estudios se ha sugerido que puede existir una relación entre la severidad de la enfermedad y la especie de RV que infecta, aunque la literatura es contradictoria en este aspecto ya que se reporta a esta especie tanto en pacientes con síntomas graves como leves [35].

Tabla 1.

Genoma completo				Región 5'UTR			
Especie	A	B	C	Especie	A	B	C
A	64%			A	70.2%		
B	45-50%	75%		B	65%	67.70%	
C	48-51%	36-43%	68%	C	63.10%	64.10%	66%

Tabla 1. Porcentajes de identidad de secuencia nucleotídica del genoma completo (izquierda) y región 5'UTR (derecha) para los genotipos A, B y C de rinovirus.

La mayoría de los estudios han descrito la frecuencia de las especies de RV en pacientes hospitalizados con enfermedad respiratoria grave, y pocos estudios han descrito la prevalencia de las especies del virus en IRTS por lo que la posible asociación de alguna especie o serotipo a la severidad de la enfermedad puede verse sesgada.

En México se ha realizado solamente un estudio sobre la abundancia de las diferentes especies de RV, las cuales se determinaron mediante un análisis filogenético basado en su mayoría en la secuencia 5'UTR. En este trabajo se detectó RV en 17% de la población. Se analizaron 124 muestras nasales de pacientes menores a 6 años, con enfermedad respiratoria leve o moderada [36]. El análisis mostró que las tres especies de RV circulan en la población infantil estudiada, coincidiendo con la incidencia reportada en otros estudios.

En el presente trabajo de tesis, se realizó un estudio de dos poblaciones pediátricas en México, la primera conformada por niños con IRTS en 5 ciudades del estado de Veracruz, México, y una segunda población compuesta de niños con un diagnóstico clínico sugerente de neumonía (IRTI) de 6 hospitales en diversas regiones del país.

3 Hipótesis

La especie C de rinovirus causa enfermedades más severas que las especies A y B, por lo que la frecuencia de RV-C será mayor en los pacientes con infecciones del tracto respiratorio inferior, mientras las especies A y B serán más frecuentes en los niños con infecciones del tracto respiratorio superior.

4 Objetivos

- Determinar la frecuencia y diversidad de las cepas de RV asociadas con IRTS e IRTI que circulan en las poblaciones de niños mexicanos estudiadas.
- Describir las características clínicas de la enfermedad asociada a la presencia de diferentes especies de RV.

5 Metodología

5.1 Poblaciones de estudio.

En este estudio se incluyeron dos poblaciones de pacientes pediátricos. La primera se compone de pacientes que acudieron a consulta privada en cinco ciudades del estado de Veracruz (Córdoba, Minatitlán, Poza Rica, Tierra Blanca y Veracruz). Se obtuvieron hisopados nasofaríngeos (rayon-tipped, BD BBL) de 526 niños con IRTS de septiembre de 2011 a abril de 2012. Las muestras nasofaríngeas se colocaron en frascos con medio de transporte viral (Microtest M4- RT, Remel) y se trasladaron al Instituto de Biotecnología en Cuernavaca, en donde se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

La segunda población se compone de niños que fueron ingresados al hospital con diagnóstico sugerente de neumonía. Las muestras fueron tomadas en seis hospitales situados en cuatro ciudades en diferentes estados de la república (Guadalajara, Ciudad de México, San Luis Potosí y Durango). Se obtuvieron lavados nasales de 250 niños hospitalizados entre marzo de 2010 y abril de 2011. Los lavados se colocaron en medio de transporte viral y se enviaron a la Facultad de Medicina de la UNAM en la Ciudad de México y posteriormente fueron trasladadas al IBt Cuernavaca, en donde se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Se colectó información demográfica y clínica para cada muestra de ambas poblaciones. El estudio fue aprobado por los comités de revisión institucional de la Facultad de Medicina y el Instituto de Biotecnología de la UNAM y por la junta de revisión institucional y el comité ético de cada hospital participante. Se obtuvo el consentimiento firmado del padre o tutor antes de la inscripción.

5.2 Extracción de material genético y detección viral

El material genético fue extraído con el kit comercial PureLink Viral RNA/DNA mini kit (Invitrogen) basado en un método de adsorción-desorción bajo las condiciones del fabricante. Para detectar la presencia de virus, las muestras se analizaron mediante PCR multiplex (RV15 Seegene). El ensayo RV15 es capaz de detectar, mediante tres reacciones de PCR, 15 virus causantes de enfermedades respiratorias. En la primer reacción (A) puede ser detectada la presencia de los virus AdV, HCoV 229E/NL63, y PIV 1-3. La segunda reacción (B) es de especial interés para nuestros fines, ya que en ésta se detecta la presencia de RV sin discriminar entre las especies A, B y C. Además, detecta la presencia de HCoV OC43, RSV-A, Flu-A y RSV-B. La reacción C detecta la presencia de HBoV, Flu-B, MPV, PIV-4 y HEV.

5.3 Clasificación de RV

Una vez que la muestra resultó positiva a RV, se sintetizó cDNA con la enzima SuperScript® III (Invitrogen) transcriptasa reversa a partir de los ácidos nucleicos totales extraídos, utilizando el oligonucleótido DK004 (5´CACGGACACCCAAAGTAGT3´) específico para la secuencia 5´UTR o usando hexámeros al azar bajo las siguientes condiciones: 5 minutos 25°C, una hora 50°C y 20 minutos 80°C. El cDNA obtenido se amplificó con la enzima KlenTaq (Sigma) o Taq polimerasa (New England BioLabs), por PCR con los oligonucleótidos DK004 y DK001 (5´CAAGCACTTCTGTTTCCC3´), bajo las condiciones que se muestran en la tabla 2 [37]. El amplicón esperado es de 400 pb.

Tabla 2.

Ciclos	(°C)	tiempo
1	95°	5'
40	95°	15''
	55°	15''
	72°	60''
1	72°	5'
1	4°	∞

Tabla 2. Condiciones de RT-PCR para la región 5´UTR.

5.4 Purificación y secuenciación

La purificación de productos de PCR se llevó a cabo mediante el uso del kit comercial High Pure PCR Product Purification kit (Roche), el cual se basa en un método de adsorción-desorción. Una vez purificados, los productos de PCR se secuenciaron en un secuenciador automático de DNA (Applied Biosystems, modelo 3130xl) en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de Macromoléculas del IBt.

5.5 Designación de genotipo y filogenias

Las secuencias obtenidas se alinearon mediante BLAST contra la base de datos existente del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando los parámetros por defecto. Se tomaron los cinco mejores hits para catalogar a un RV dentro de una especie. Los alineamientos múltiples se realizaron con el algoritmo MUSCLE [38] incluido en la paquetería MEGA. Los árboles filogenéticos se realizaron con el algoritmo de máxima verosimilitud con 1000 repeticiones (bootstrap) utilizando el programa MEGA 5.2.2. La agrupación para determinar los genotipos-5' se realizó utilizando la prueba cd-hit al 87% de identidad.

5.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico PASW versión 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las diferencias significativas entre los grupos se evaluaron, cuando fue posible, mediante pruebas de chi-cuadrado, o cuando los valores fueron menores a 25 con la prueba exacta de Fisher. Las asociaciones de características demográficas y clínicas de los niños con: a) Detección de RV frente a otros virus respiratorios y b) RV-A frente a RV-C se examinaron mediante regresión logística. La probabilidad de seleccionar aleatoriamente diferentes cepas virales en cada genotipo-5' se calculó por un enfoque combinatorio, con el objetivo de determinar los genotipos-5' que fueron enriquecidos significativamente para RV-A o RV-C. En todos los análisis estadísticos se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$. Este análisis fue realizado por la Dra. Blanca I. Taboada.

5.7 Colaboradores

Los doctores: Rosa María Wong-Chew y José I. Santos-Preciado de la Facultad de Medicina, UNAM, fueron el contacto directo con los médicos de los hospitales participantes, además de facilitar materiales para el análisis.

Los siguientes médicos colaboraron en este estudio:

Colegio de Pediatría del Estado de Veracruz:

María A. Arias-Ortiz, Jesús Monge-Martínez, Rubén Rodríguez-Vázquez, Fidel Díaz-Hernández, Fernando Zárate-Vidal.

Hospital General de México.

Verónica Firo-Reyes.

Hospital Pediátrico de Coyoacán:

Carlos N. del Río-Almendárez.

Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan I. Menchaca":

Jesús Gaitán-Meza del Nuevo.

Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS Guadalajara:

Alberto Villaseñor-Sierra.

Hospital General de Durango:

Gerardo Martínez-Aguilar y Maricela García-Borjas.

Universidad Autónoma de San Luis Potosí:

Daniel E. Noyola.

Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto", San Luis Potosí:

Luis F. Pérez-González.

El M.C. Marco Antonio Espinoza, del IBt realizó parte del análisis experimental.

Las bases de datos fueron capturadas por la Lic. Arely García Botello.

6 Resultados

6.1 Detección de RV

Se analizaron 726 muestras de pacientes pediátricos con IRTS y IRTI. La población de niños con IRTS se integró por 526 pacientes (proporción mujer/hombre de 1.27; mediana de edad 19 meses y; edad promedio de 39 meses; rango de 0 a 191 meses). De éstas, 376 muestras resultaron positivas a virus (datos no mostrados) y 92 (17.5%) de ellas fueron positivas a RV. De los niños positivos a RV 47 fueron varones y 45 mujeres, en un rango de edad de 0 a 175 meses. Se observó que existe una mayor frecuencia de RV en niños menores de 24 meses y mayores a 72 meses de edad ($p = 0.035$) (Fig. 3A).

De las 92 muestras positivas a RV, se pudo obtener la especie de 73 (80.2%) por secuenciación de la región 5'-UTR del genoma viral. De éstas, 45 (61.6%) pertenecen a la especie RV-A, 27 (37%) de la especie RV-C, y solamente 1 (1.4%) a la RV-B (Fig. 3A). La frecuencia de RV-A fue significativamente mayor que RV-C en niños menores de 24 meses de edad y en el grupo mayor a 120 meses (Fig. 3A). La diferencia en la incidencia de RV-A y RV-C en la población entre 24 y 120 meses no presentó diferencias estadísticamente significativas. El análisis de las muestras por ciudad mostró que la población positiva a RV proveniente de Tierra Blanca fue significativamente menor en comparación con las otras ciudades incluidas en el estudio. No se encontraron diferencias significativas de género en los diferentes grupos de edad o entre los niños infectados con RV u otro virus respiratorio, o entre las especies A y C. La incidencia de infección por RV se presentó con mayor frecuencia durante los meses de septiembre y noviembre de 2011, así como en abril de 2012, con el 24.4%, 27.1% y 30.3% del total de las muestras obtenidas, respectivamente. En contraste, sólo representó el 3.1% y el 6.7% en febrero y marzo de 2012, respectivamente (Fig. 3B). Solo durante abril la especie A se encontró con mayor frecuencia que RV-C ($p=0.041$).

Figura 3

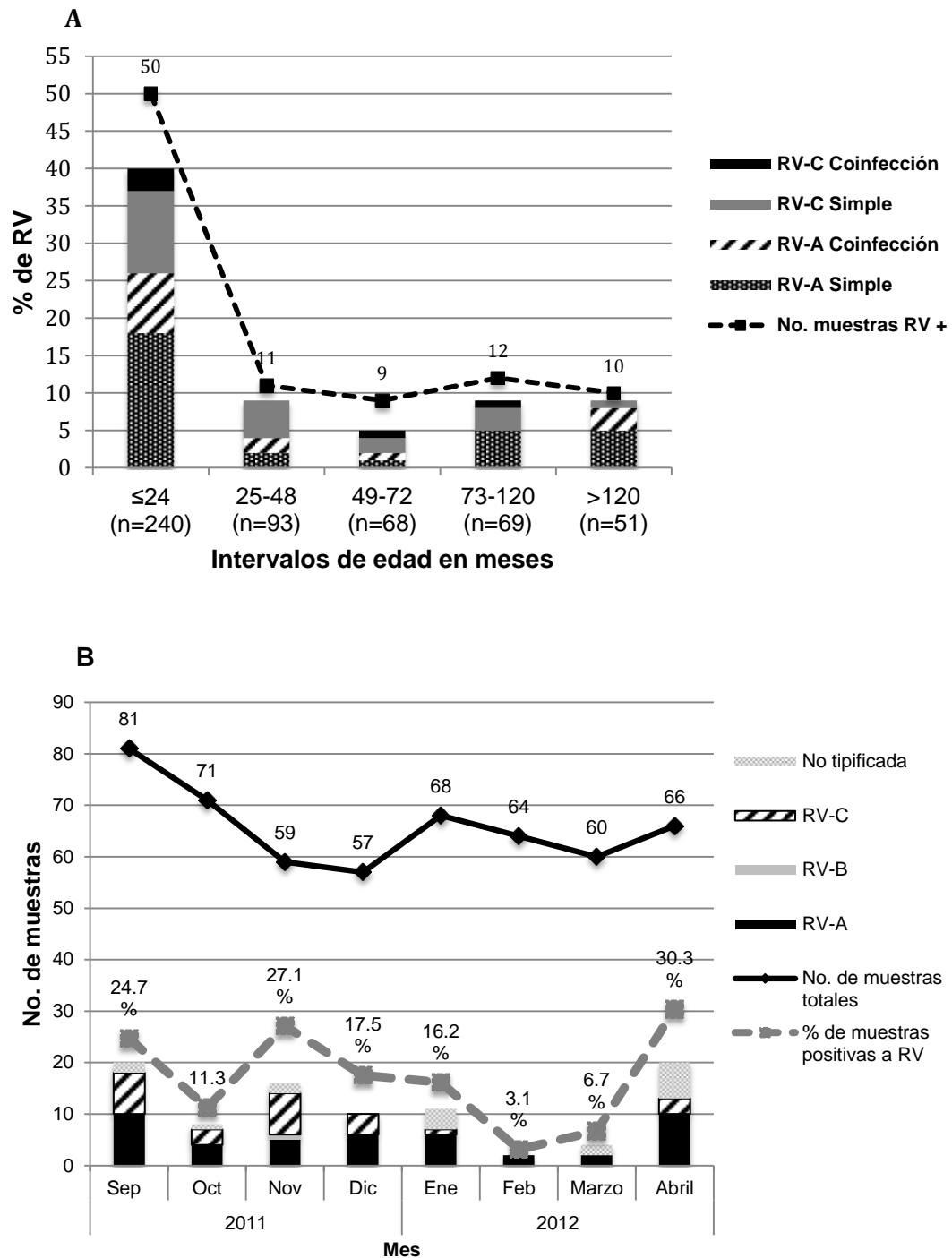


Figura 3. Gráfica que muestra la frecuencia de infección de RV en IRTS. En A se muestra la frecuencia encontrada de RV-A y RV-C por intervalos de edad, en infección simple y coinfección con otros virus respiratorios. En B se muestra la distribución de muestras totales y RV- ABC positivas por mes. Datos en ANEXO 1.

De las 250 muestras de pacientes hospitalizados con IRTI, se tuvo una proporción mujer/hombre de 1.43, con una mediana de edad de 10 meses y una edad promedio de 16 meses en un rango de edad de 1 a 76 meses. De las 191 muestras positivas a los virus buscados, 62 fueron positivos a RV (24.8%); de los cuales 41 fueron varones y 21 mujeres.

Se determinó la especie de 43 (69.4%) de estos RV por el método antes descrito, obteniéndose 22 (51.2%) RV de la especie A, 18 (41.8%) RV-C y 3 (7%) RV-B. La diferencia en la incidencia de RV-A y RV-C no fue estadísticamente significativa. El análisis de los diferentes grupos de edades mostró que RV se presentó con mayor frecuencia en niños de entre 24 y 36 meses ($p < 0.0001$), sólo uno niño mayor de 36 meses se encontró positivo para RV-C (Fig. 4A). Al igual que la población de pacientes con IRTS, en los pacientes con IRTI no hubo diferencia significativa en el género de los diferentes grupos de edad o entre los niños infectados con RV u otro virus respiratorio. No se encontró diferencia significativa entre la frecuencia de RV-A y RV-C. La hospitalización por RV fue significativamente mayor ($p < 0.0001$) durante los meses de primavera, en comparación con otras estaciones (Fig. 4B).

Figura 4

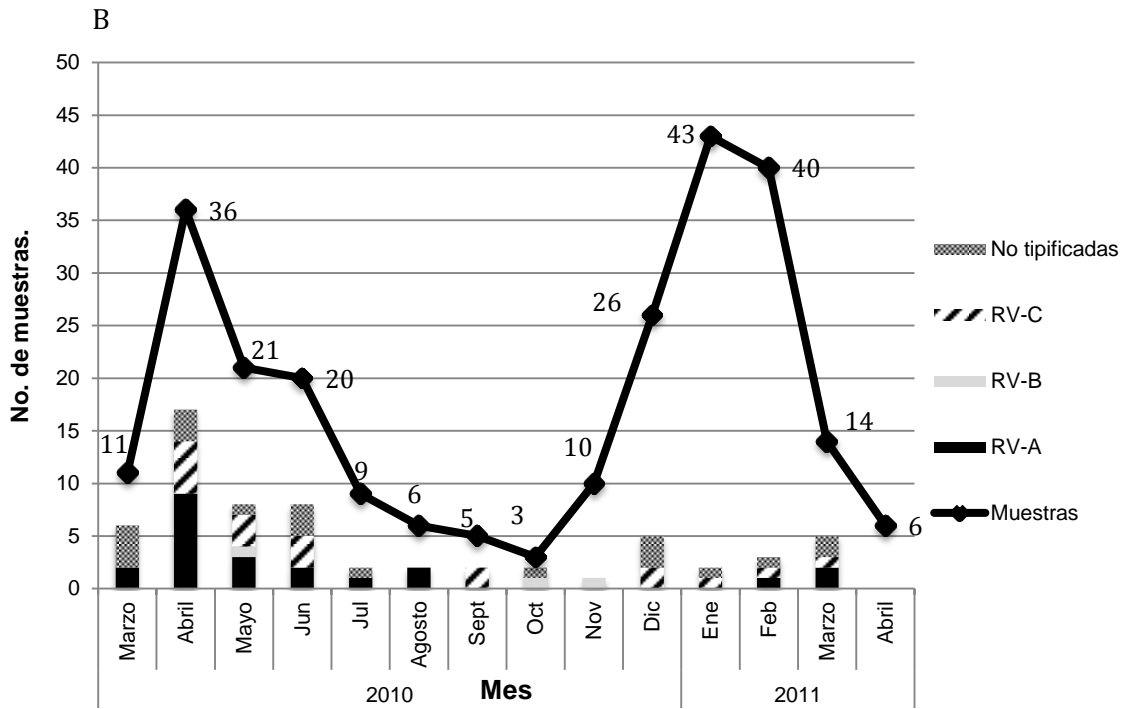
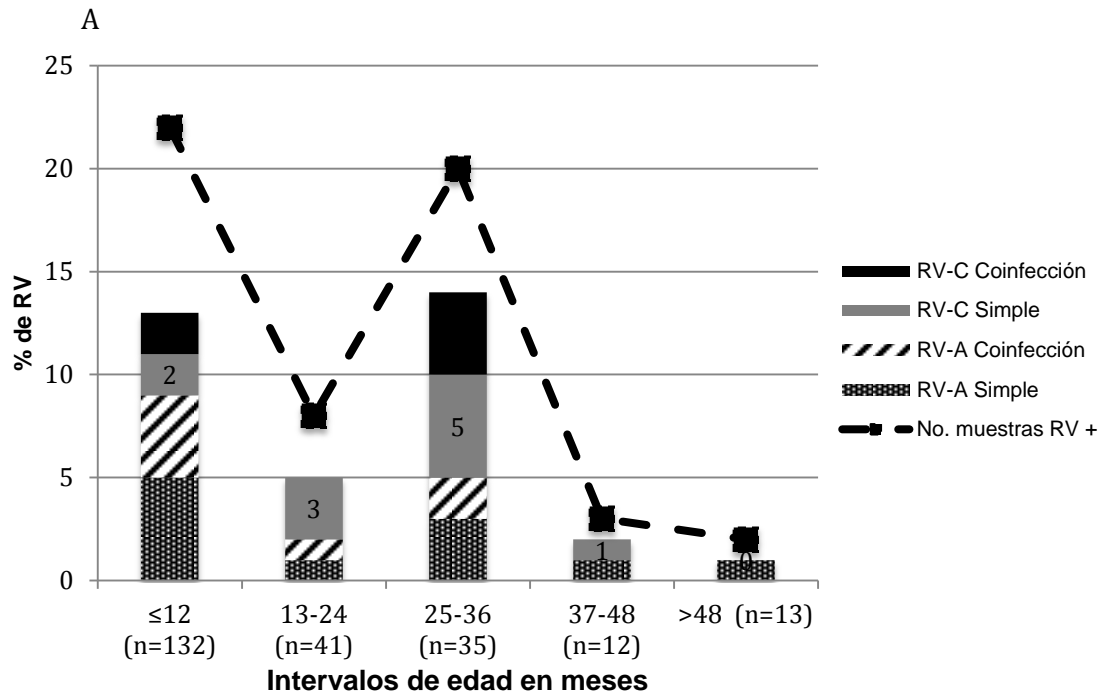


Figura 4. Gráfica que muestra la frecuencia de infección por RV en IRTI. En A se muestra la frecuencia encontrada de RV-A y RV-C por intervalos de edad, en infección simple y coinfección con otros virus respiratorios. En B se observa la distribución de muestras totales y RV positivas por mes. Datos en ANEXO 2.

6.2 Coinfección de RV con otros virus respiratorios

Se encontró al menos un virus respiratorio adicional en el 30% (28/92) de las IRTS y en el 37% de las IRTI (23/62) de los pacientes positivos a RV. De los 28 RV en coinfección en IRTS, se determinó la especie en 19 (14 RV-A y 5 RV-C). En las infecciones múltiples de los casos con IRTI se asignó la especie a 14 de 23 RV, de éstas 7 se asignaron a la especie RV-A, 1 a RV-B y 6 a RV-C [Fig. 5].

Figura 5.

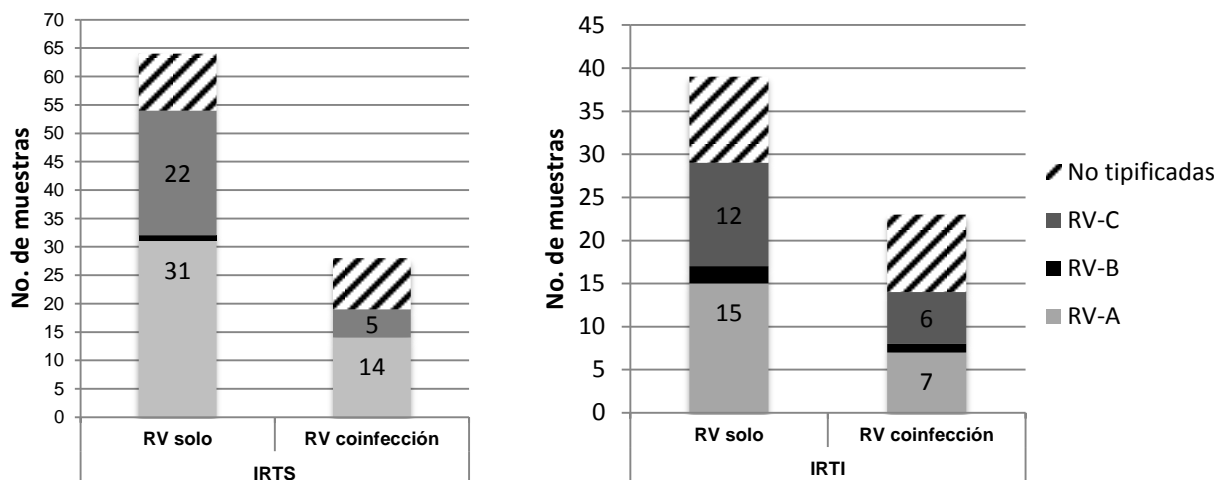


Figura 5. Se muestra la frecuencia de infecciones simples y coinfecciones de RV con al menos otro virus respiratorio. En los pacientes con IRTS las coinfecciones de RV-A con otros virus respiratorios fueron mas frecuentes que las de RV-C ($p=0.025$). Datos en ANEXOS 1 y 2.

Se buscó la asociación de alguna de las especies de RV con algún o algunos otros virus respiratorios ya sea en IRTS o IRTI, pero en la población estudiada no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas. Sin embargo, sí se observó que en la población de pacientes con IRTS hubo mayor frecuencia de RV-A en infecciones múltiples que RV-C ($p=0.025$) [Fig. 5]. Se observó también que en las muestras positivas a RV con infección mixta, es más frecuente la coinfección con un solo virus: 20/28 en las IRTS y 21/23 en las IRTI, que con otros 2 virus: 8/28 en IRTS y 2/23 en IRTI (IRTS $p=0.014$, IRTI $p<0.0001$).

El virus más frecuentemente asociado en coinfección con RV en IRTS fue adenovirus (8/92), seguido por: RSV-A (5), HCoV 229E/NL63/OC43 (5), PIV-1 (4), PIV-4 (4), PIV-3 (3), HEV (3), influenza A (2), MPV (2), RSV-B (1), y PIV-2 (1).

En el caso de IRTI, el virus más frecuentemente asociado con RV fue PIV-3 (8/62), seguido por RSV-A (6), MPV (3), AdV (2), HBoV (2), HEV(1), el HCoV OC43 (1),

PIV-1 (1) y PIV-4 (1) [Fig. 6]. No se encontró diferencia estadística de infecciones mixtas entre los diferentes grupos de edad en IRTS ni en IRTI.

Figura 6

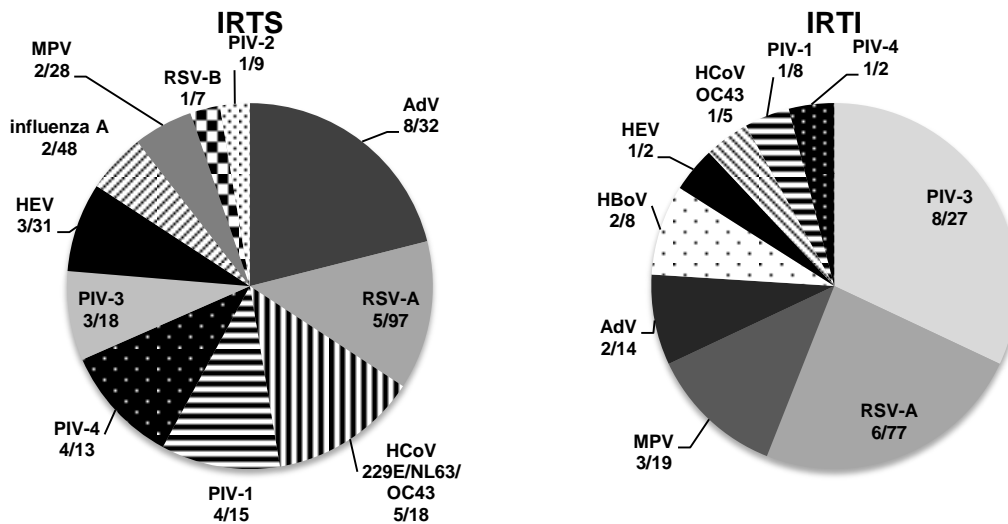


Figura 6. Número de muestras que presentan coinfección de RV mas el virus mostrado (muestras en coinfección con RV mas virus respiratorio especificado / total de muestras positivas a ese virus). Datos en ANEXOS 1 y 2.

6.3 Características clínicas de los niños positivos a RV

Los principales síntomas y signos observados en niños con IRTS y con RV asociado a infecciones simples o mixtas fueron: tos y rinorrea. Sin embargo, la rinorrea fue el único síntoma significativamente mayor en los niños positivos a RV en comparación con pacientes que presentaron infecciones causadas por otros virus respiratorios ($p=0.05$). De hecho, en los niños positivos a RV la disfagia, vómitos, dolor de cabeza, mialgias/artralgias y fiebre $>38^{\circ}\text{C}$ fueron significativamente menos frecuentes en comparación con los niños que presentaron infección por otros virus (Fig. 7). El aumento en la frecuencia respiratoria se encontró en más de una tercera parte de los pacientes con una infección simple o en coinfección con RV. Los niños que presentaron infección simple o múltiple por RV no presentaron diferencia significativa en las características clínicas. Además no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes infectados con las especies RV-A o C. La especie B no fue tomada en cuenta para el análisis debido a que solo se encontró un niño con este virus.

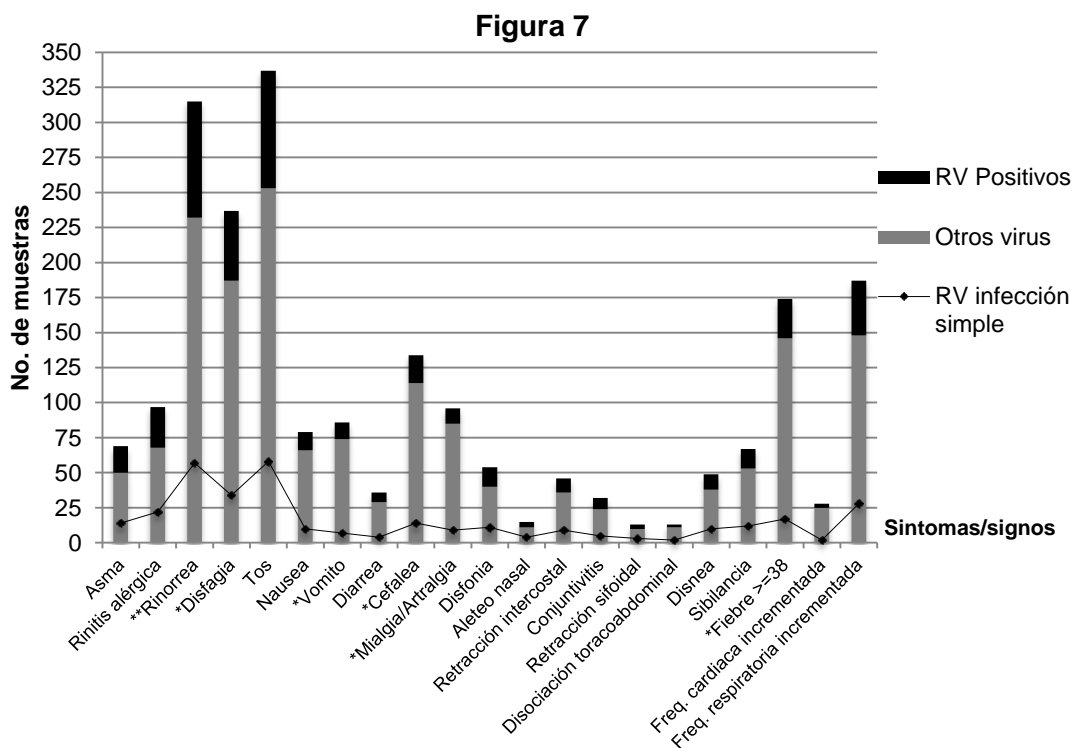


Figura 7. Signos y síntomas contra número de muestras de pacientes con IRTS. El * indica diferentes significativamente siendo menores en muestras RV positivas. Los ** indican mayor en pacientes RV positivos. Datos en ANEXO 3

La mayoría de los niños hospitalizados con IRTI tuvieron un diagnóstico clínico sugestivo de neumonía. Este diagnóstico se confirmó en el 92.7% de los pacientes positivos a RV; asimismo se confirmó en el 94.5% de los niños positivos para otros virus respiratorios.

Los niños con infecciones simples y mixtas por RV presentaron fiebre $>38^{\circ}\text{C}$ y aumento de la frecuencia respiratoria con mayor frecuencia que los niños con cualquier otro virus respiratorio. Otros signos importantes detectados en el examen de los pacientes positivos a RV fueron disociación toracoabdominal y retracción intercostal [Fig. 8], los cuales son evaluados medicamente para dar la puntuación de Silverman-Anderson para la cual no se encontraron diferencias entre los niños con RV o con cualquier otro virus, esta escala clasifica los puntajes de la siguiente manera: de 1-3 puntos dificultad respiratoria leve, de 4 a 6 puntos moderada y de 7 a 10 puntos severa. El 76.4% de los pacientes con coinfecciones de RV y 82.3% de las infecciones simples de RV tuvieron una puntuación Silverman-Anderson entre 1 y 3. En el examen de rayos X de tórax, el 54.5% de los pacientes positivos a RV tenían signos de neumonía intersticial, mientras que el 23.6% mostró un patrón radiológico micro y/o macro nodular. No se encontraron

diferencias entre los signos clínicos observados en niños infectados con RV-A o RV-C.

Figura 8

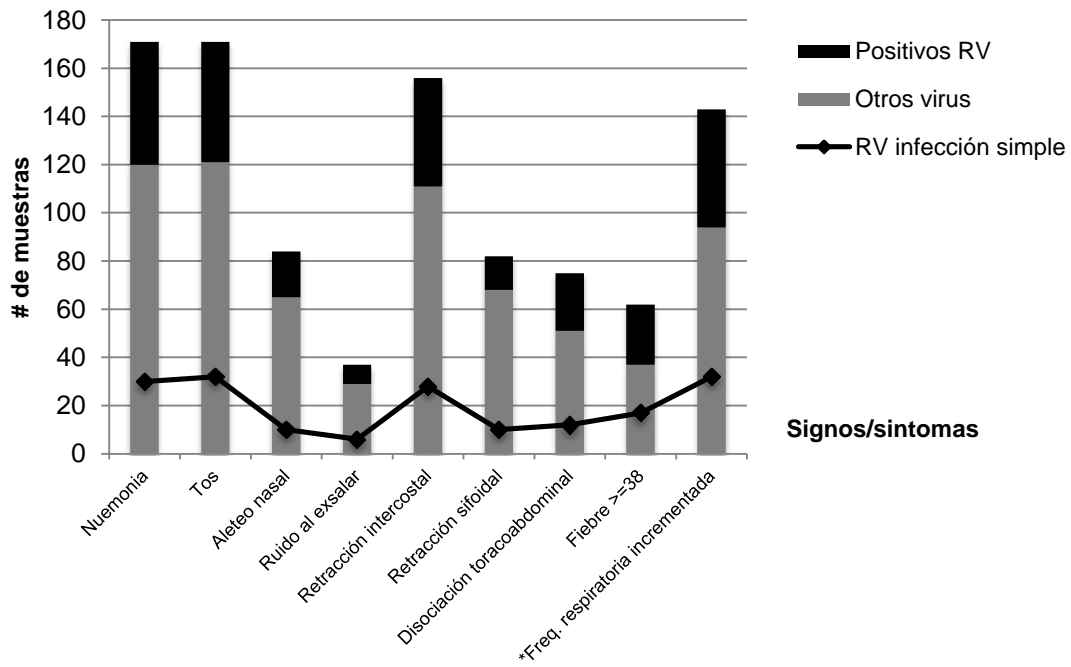


Figura 8. Signos y síntomas contra número de muestras de pacientes con IRTI. El * indica diferencia estadísticamente significativa. Datos en ANEXO 4

6.4 Diversidad genética de los RV encontrados

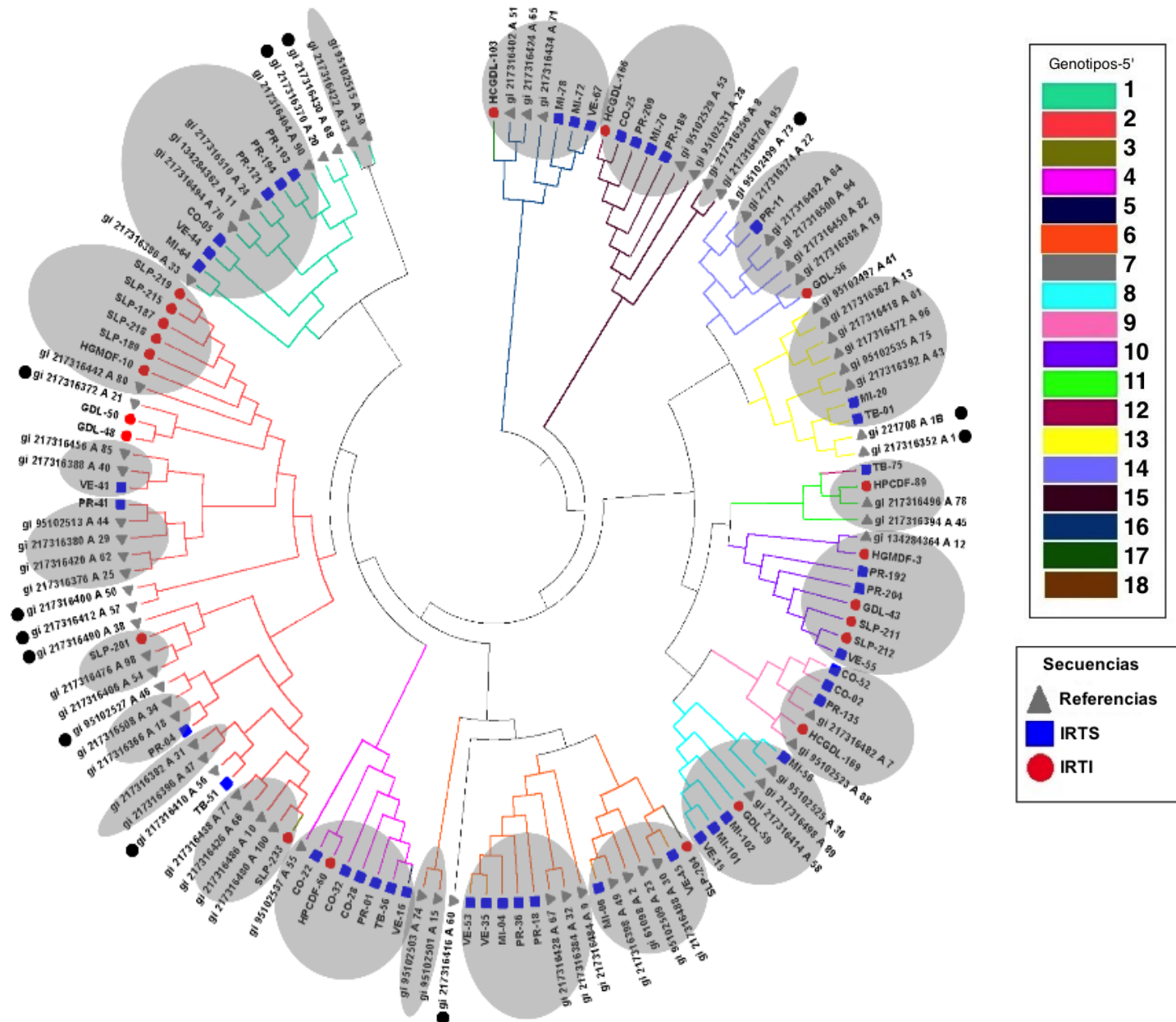
Como podemos observar en los árboles filogenéticos de la figura 9, las especies de RV-A y C, de pacientes con IRTS e IRTI están representadas por una amplia variabilidad de secuencias 5'-UTR. Las 112 cepas caracterizadas en este estudio como RV-A o RV-C se clasificaron en 35 genotipos diferentes basados en las secuencias del 5'-UTR a los cuales llamamos genotipos-5'. Dos genotipos-5' se consideraron como diferentes cuando la identidad de la secuencia 5'UTR era igual o menor al 87% de manera similar al umbral empleado para definir a los genotipos basados en la secuencia de nucleótidos de VP1 por McIntyre [39]. Al comparar los genotipos-5' de RV-A obtenidos en este estudio con los grupos obtenidos por Palmenberg [40], se observó que más del 80% de las secuencias de referencia, utilizando solo 400nt, son agrupadas en los mismos clados finales formados con las secuencias de genomas completos (ver figura 9).

De la especie RV-A se formaron 17 genotipos-5' y de la especie RV-C 18, estos genotipos-5' incluyen desde 1 hasta 14 secuencias diferentes. Es de interés que existen genotipos-5' de la especie RV-A que están compuestos en su mayoría por secuencias pertenecientes a pacientes con IRTI y en menor número de IRTS, como el genotipo-5' 2 ($p < 0.001$). Algunos de estos genotipos-5' están compuestos preferentemente por secuencias pertenecientes a IRTS, como el genotipo-5' 6 ($p < 0.001$).

Para la especie C podemos observar que algunos genotipos-5' están formados por secuencias pertenecientes ya sea sólo a IRTS o a IRTI como el genotipo-5' 18 ($p = 0.03$) y el genotipo-5' 6 ($p < 0.01$), y otros como el genotipo-5' 2 que se compone preferentemente de secuencias de IRTS ($p < 0.001$). Estudios posteriores son necesarios con el objetivo de determinar si la asociación entre las IRTS o IRTI y los genotipos-5' de RV observada en este trabajo es representativa y se mantiene, o si es debido a que tipos genómicos determinados de RV circularon con mayor frecuencia en los años y lugares en que se colectaron las muestras.

Figura 9

A



9 B

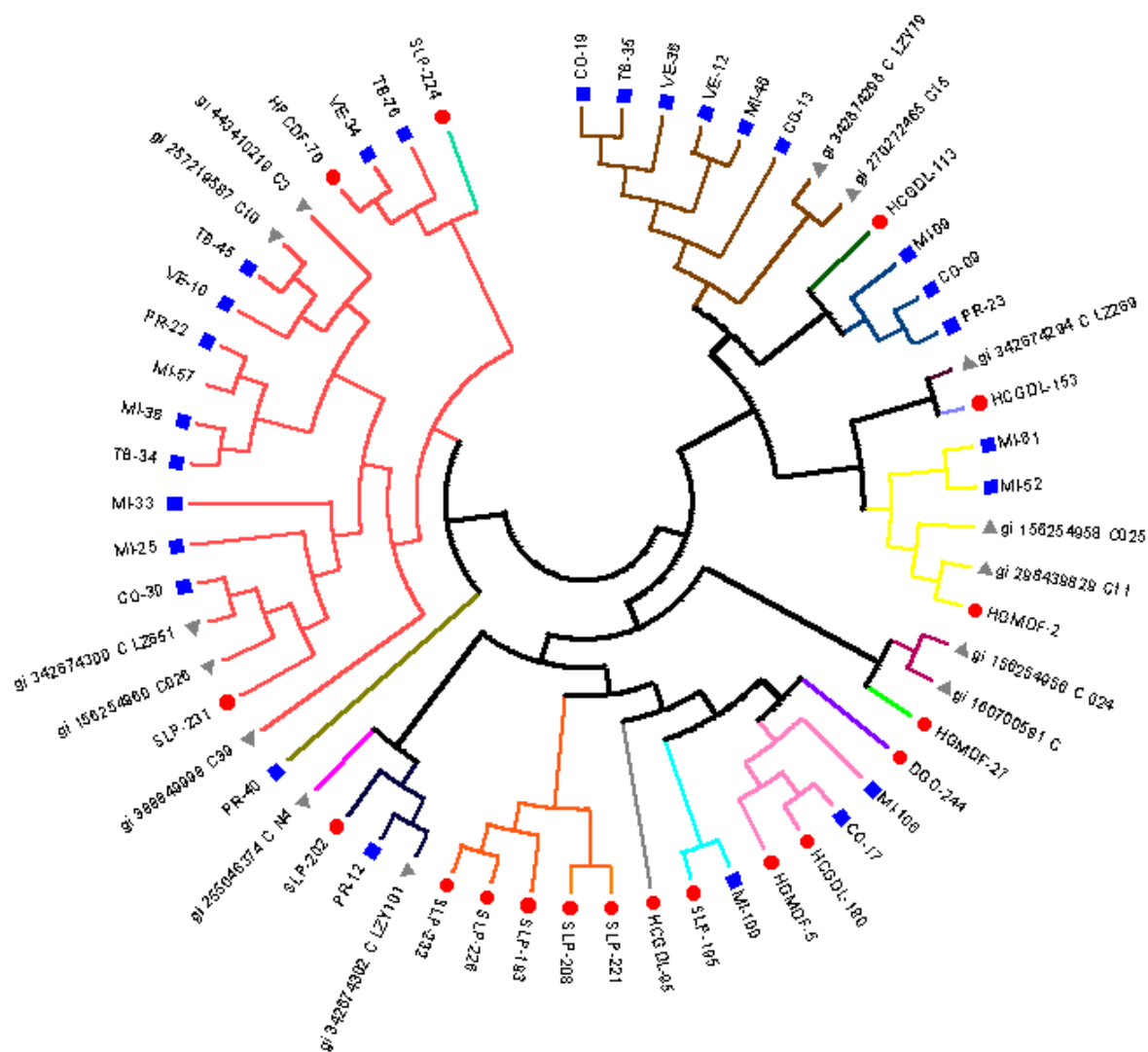


Figura 9: Árboles filogenéticos realizados por máxima verosimilitud basados en la región 5'UTR. El color de la rama indica genotipos-5' de RV-A y RV-C diferentes (véase guía). La numeración del genotipo-5' comienza a la derecha del círculo y avanza en sentido de las manecillas del reloj. Los "gi" corresponden a cepas de referencia y se representan con triángulos de color gris. Los cuadros azules representan IRTS (CO, Córdoba; MI, Minatitlán; PR, Poza Rica; TB, Tierra Blanca; VE, Veracruz). Los círculos rojos indican IRTI (DGO, Hospital General de Durango; HCGDL, Hospital Civil de Guadalajara; HGMDf, Hospital General de México, D.F.; HpCDF, Hospital Pediátrico de Coyoacán, del Distrito Federal; GDL, Hospital de Pediatría, del IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social); SLP, Hospital Central de San Luis Potosí). La base de datos usada consta solo de secuencias pertenecientes a genomas completos. En **A** podemos ver las secuencias pertenecientes a la especie RV-A las elipses grises indican los clados finales que coinciden con los formados por genomas completos (véase texto), los óvalos grises representan los clados finales que agruparon igual realizando el árbol con 400nt o con el genoma completo. En **B** se muestran secuencias pertenecientes a la especie RV-C.

7 Discusión

En este trabajo se determinó la frecuencia de RV, en pacientes pediátricos con IRTS y IRTI en diferentes regiones de México. Las frecuencias observadas en este trabajo están de acuerdo con las reportadas en otros estudios, en los cuales se han encontrado incidencias de RV del 16% al 37% en niños, ya sea con IRTS o con IRTI. El análisis demográfico indicó que RV se encuentra con mayor frecuencia en niños ambulatorios menores de 24 o mayores de 72 meses, esto puede atribuirse a la mayor incidencia de RV-A en estos grupos de edad, ya que esta fue la especie más frecuente en el estudio. En contraste, RV se observó con mayor frecuencia en niños hospitalizados en el rango de 24 a 36 meses de edad. En general, estas observaciones están de acuerdo con reportes anteriores que indican que las infecciones por RV son más frecuentes en los recién nacidos y durante la infancia temprana [41]. Las infecciones por RV se asociaron con mayor frecuencia a IRTS en el otoño y la primavera, como ya ha sido reportado [42], mientras que se observó un claro aumento de la prevalencia del virus en IRTI sólo durante la primavera.

En más del 30% de los pacientes positivos a RV, ya sea con IRTS o IRTI, se encontró al menos un virus respiratorio adicional. La detección de múltiples virus en un alto porcentaje de los casos es común en los estudios de infecciones respiratorias en los que se utiliza un método de diagnóstico basado en la PCR. En particular, RV se ha encontrado en infecciones mixtas con otro virus respiratorio en un rango del 26% al 63% de los casos [43, 44, 45]. Sin embargo, no se ha definido que las infecciones múltiples influyan en la severidad de la enfermedad [46, 47, 48, 49].

Como ya se mencionó, la neumonía puede ser multifactorial, y a pesar de los avances en los métodos diagnósticos, sigue siendo un reto establecer su etiología [50]. La detección de un virus en el tracto respiratorio superior podría representar una infección coincidente, la presencia asintomática del virus, o un patógeno que realmente sea causante de neumonía. Esto representa una de las limitaciones de este estudio, ya que el diagnóstico de la neumonía viral basado en muestras nasofaríngeas podría llevar a un diagnóstico erróneo. El estudio de la frecuencia

de infecciones virales en muestras de pacientes sanos o con infecciones asintomáticas, en comparación con la frecuencia en pacientes con enfermedad de leve a grave, puede ayudar a hacer más clara la relevancia de este problema en el diagnóstico de virus asociados a IRTI [49]. Varios estudios han comparado la frecuencia de detección de RV en pacientes hospitalizados [51, 52; 53,54, 55] o en pacientes ambulatorios con enfermedad de vías respiratorias inferiores [56, 57,58, 59], con la detección de RV en controles sin síntomas respiratorios. En la mayoría, pero no en todos los estudios, se observó una mayor detección de RV entre los participantes que presentan la enfermedad.

La identificación de RV en este trabajo fue similar, pero estadísticamente diferente, entre los dos grupos de pacientes estudiados. Los niños con IRTS tuvieron una tasa de RV de 17.5% en comparación con 24.5% en pacientes con IRTI ($p<0.017$). Es intrigante la observación de que la frecuencia de asociación de RV con enfermedad respiratoria grave es similar a la observada en la enfermedad de leve a moderada, o incluso en casos asintomáticos observada tanto en este como en otros estudios [31, 35, 59]. En este contexto, se podría pensar que si la enfermedad respiratoria causada por RV fuera más severa que la causada por otros patógenos, el porcentaje de niños hospitalizados positivos para RV debería ser significativamente mayor que el encontrado en pacientes ambulatorios o en niños sanos, como se observa por ejemplo, en infecciones por rotavirus [60]. Por el contrario, la incidencia de RV tendría que ser significativamente menor en IRTI en comparación con IRTS si la infección por el virus causara una enfermedad leve, como se planteo en la hipótesis de este trabajo. ¿Por qué entonces en muchos estudios de infecciones respiratorias con diferentes grados de gravedad se encuentran incidencias muy similares de RV? Es tentador hipotetizar que los serotipos/genotipos específicos del virus y no la especie, se asocian preferentemente con síntomas clínicos graves o leves, los que pueden estar presentes con mayor frecuencia en los niños hospitalizados o ambulatorios, respectivamente. Esta potencial asociación podría ser enmascarada por una amplia diversidad de serotipos/genotipos circulantes de RV, que potencialmente, podrían tener diferentes niveles de virulencia intrínseca, de tal manera que en una

población determinada de niños (asintomáticos, con IRTS o IRTI) podría haber una frecuencia similar de infecciones por RV, pero con resultados clínicos muy diferentes, dependiendo del genotipo/serotipo viral infectante. Para probar esta hipótesis sería importante, determinar la diversidad de los genotipos de RV que circulan en diferentes partes del mundo con el objetivo de determinar si los virus más frecuentes varían entre las regiones y el tiempo y si se asocian con diferentes niveles de gravedad de la enfermedad. No puede descartarse, sin embargo, que las infecciones mixtas con bacterias (que no se buscaron en este trabajo) o bien diferentes factores del huésped pueden influir en la gravedad clínica de infecciones de RV, como ya ha sido reportado [61]. En este trabajo, la incidencia de las especies RV-A y RV-C, ya sea en niños hospitalizados o ambulatorios no fue estadísticamente diferente invalidando la hipótesis planteada. Estos resultados indican que ambas especies de RV pueden asociarse a una enfermedad grave, y por lo tanto no se debe descartar a RV-A como una causa potencial de IRTI.

Encontramos una considerable diversidad de genotipos de RV en la población, como se ha reportado en otros trabajos [34, 39, 62]. Es interesante observar que algunos de los genotipos-5' definidos en este trabajo se constituyeron por RV detectados sólo en niños hospitalizados o solo en ambulatorios. En este contexto se ha sugerido ya, desde los primeros estudios epidemiológicos de RV la posible variación de la virulencia entre los diferentes serotipos de RV [63,64]. Estas observaciones refuerzan la idea de que se necesitan más estudios que correlacionen los resultados clínicos de los pacientes pediátricos con los genotipos de RV. La identificación potencial de las asociaciones entre los genotipos de virus específicos y características clínicas particulares tendría un impacto muy importante en el desarrollo de medidas profilácticas para controlar la infección de este patógeno. En conclusión, este estudio resalta la alta exposición y diversidad de las cepas de RV que circulan en México y la posible gravedad de la enfermedad asociada a infecciones tanto por la especie A como por la especie C de rinovirus.

8 Conclusiones

En México las tres especies de rinovirus se presentan en la misma frecuencia que la reportada en otras partes del mundo, siguiendo el mismo patrón de distribución estacional.

Como en otros estudios la especie A se encontró con mayor frecuencia en los pacientes con infecciones respiratorias del tracto superior. En la población de pacientes con infección respiratoria del tracto inferior, RV provocó la mayoría de las hospitalizaciones por neumonía durante la primavera.

La presencia de al menos otro virus respiratorio en las muestras positivas a RV se vio en más del 30% de la población analizada.

La identificación de RV en este trabajo fue similar en ambos tipos de infección (IRTS e IRTI) por lo que el serotipo más que la especie podría estar asociado a la severidad de la enfermedad.

9 Referencias

1. <http://faculty.humanities.uci.edu/bjbecker/PlaguesandPeople>
2. Watts S. **Epidepics and History: Disease, Power and Imperialism.** New Haven, Conn: Yale University Press: 1997.
3. Stephanie Haensch, Raffaella Bianucci, Michel Signoli, Minoarisoa Rajerison, Michael Schultz, Sacha Kacki, Marco Vermunt, Darlene A. Weston, Derek Hurst, Mark Achtman, Elisabeth Carniel, Barbara Bramanti. **Distinct Clones of *Yersinia pestis* Caused the Black Death.** PLoS Pathog. 2010 October; 6(10): e1001134. Published online 2010 October 7. doi: 10.1371/journal.ppat.1001134
4. Dobson, Andrew P. and E. Robin Carter (1996). Bioscience;46 2.
5. Michel Signoli et al. "Paléodémographie et démographie historique en contexte épidémique", *Population* 6/2002 (Vol. 57), p. 829-854.
6. <http://www.learnnc.org/lp/editions/nchist-twoworlds/1696>
7. Barquet N, Domingo P. Smallpox: **The Triumph over the Most Terrible of the Ministers of Death.** Ann Intern Med. 1997;127:635-642.
8. [http://www.news-medical.net/health/History-of-Tuberculosis-\(Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/health/History-of-Tuberculosis-(Spanish).aspx)
9. Jeffery K. Taubenberger and David M. Morens. 1918 Influenza: **The mother of all pandemics.** Rev Biomed 2006; 17:69-79.
10. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
11. The Lancet, Volume 361, Issue 9376, Pages 2226 - 2234, 28 June 2003 doi:10.1016/S0140-6736(03)13779-8
12. http://www.who.int/gho/child_health/mortality/mortality_under_five_text/en/
13. Denny F. W. Jr. **The Clinical Impact of Human Respiratory Virus Infections.** American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1995;152(4, part 2):S4–12.
14. Eric A. F. Simoes, Thomas Cherian, Jeffrey Chow, Sonbol A. Shahid-Salles, Ramanan Laxminarayan, and T. Jacob John. **Chapter 25 of Disease Control Priorities in Developing Countries.** 2nd edition 2006 "Acute Respiratory Infections in Children".

15. Hortal M., Mogdasy C., Russi J. C., Deleon C., Suarez A. **Microbial Agents Associated with Pneumonia in Children from Uruguay.** Reviews of Infectious Diseases. 1990;12(Suppl. 8):S915–22.
16. John T. J., Cherian T., Steinhoff M. C., Simoes E. A., John M. **Etiology of Acute Respiratory Infections in Children in Tropical Southern India.** Reviews of Infectious Diseases. 1991;13(Suppl. 6):S463–69.
17. Tupasi T. E., Lucero M. G., Magdangal D. M., Mangubat N. V., Sunico M. E., Torres C. U. et al. **Etiology of Acute Lower Respiratory Tract Infection in Children from Alabang, Metro Manila.** Reviews of Infectious Diseases. 1990;12(Suppl. 8):S929–39.
18. Stensballe L. G., Devasundaram J. K., Simoes E. A. Respiratory Syncytial Virus Epidemics: **The Ups and Downs of a Seasonal Virus.** Pediatric Infectious Disease Journal. 2003;22(2 Suppl.):S21–32.
19. Hafoor A., Nomani N. K., Ishaq Z., Zaidi S. Z., Anwar F., Burney M. I. et al. **Diagnoses of Acute Lower Respiratory Tract Infections in Children in Rawalpindi and Islamabad, Pakistan.** Reviews of Infectious Diseases. 1990; 12(Suppl. 8):S907–14.
20. Shann F. **Etiology of Severe Pneumonia in Children in Developing Countries.** Pediatric Infectious Disease. 1986;5(2):247–52.
21. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. **Viral pneumonia.** Lancet. 2011;377:1264-75.
22. Peter Simmonds, Chloe McIntyre, Carita Savolainen-Kopra, Caroline Tapparel, Ian M. Mackay and Tapani Hovi. **Proposals for the classification of human rhinovirus species C into genotypically assigned types.** Journal of General Virology (2010), 91, 2409–2419.
23. Ann C. Palmenberg, Jennifer A. Rathe, and Stephen B. Liggett. **Analysis of Complete Genome Sequences of Human Rhinovirus.** J Allergy Clin Immunol. 2010 June ; 125(6): 1190–1201. doi:10.1016/j.jaci.2010.04.010.
24. Chloe L. McIntyre, E. Carol McWilliam Leitch, Carita Savolainen-Kopra, Tapani Hovi, Peter Simmonds. **Analysis of Genetic Diversity and Sites of**

- Recombination in Human Rhinovirus Species C.** *J Virol.* 2010 October; 84(19). doi: 10.1128/JVI.00962-10 PMID: PMC2937769.
25. Lau SK; Yip CC; Woo PCW and Yuen K-Y. **Human Rhinovirus C: a newly discovered human rhinovirus species.** *Emerging Health Threats Journal* 2010, 3:e2. doi: 10.3134/ehjtj.10.002.
 26. Tregoning, J.S.; Schwarze, J. **Respiratory viral infections in infants: Causes, clinical symptoms, virology, and immunology.** *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 74–98.
 27. Lee, W.M.; Kiesner, C.; Pappas, T.; Lee, I.; Grindle, K.; Jartti, T.; Jakiela, B.; Lemanske, R.F., Jr.; Shult, P.A.; Gern, J.E. **A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants.** *PLoS One* **2007**, *2*, doi:10.1371/journal.pone.0000966.
 28. Ann C. Palmenberg, David Spiro, Ryan Kuzmickas, Shiliang Wang, Appolinaire Djikeng, Jennifer A. Rathe, Claire M. Fraser-Liggett, Stephen B. Liggett **Sequencing and Analyses of All Known Human Rhinovirus Genomes Reveals Structure and Evolution** *Science* **324**, 55 (2009).
 29. Fuji N, Suzuki A, Lupisan S, Sombrero L, Galang H, et al. (2011) **Detection of Human Rhinovirus C Viral Genome in Blood among Children with Severe Respiratory Infections in the Philippines.** *PLoS ONE* 6(11): e27247. doi:10.1371/journal.pone.0027247
 30. Lau SKP, Yip CCY, Lin AWC, Lee RA, So LY, Lau YL, et al. **Clinical and molecular epidemiology of a novel rhinovirus species, human rhinovirus C.** *J Infect Dis* 2009;200:1096–103.
 31. Han TH, Chung JY, Hwang ES, Koo JW (2009) **Detection of human rhinovirus C in children with acute lower respiratory tract infections in South Korea.** *ArchVirol* 154: 987–991.
 32. Zichun Xiang, Richard Gonzalez, Zhengde Xie, Yan Xiao, Jun Liu, Lan Chen, Chunyan Liu, Jing Zhang, Lili Ren, Guy Vernet, Gláucia Paranhos-Baccalà, Kunling Shen, Qi Jin. **Human rhinovirus C infections mirror those of human rhinovirus A in children with community-acquired pneumonia.** Jianwei Wang *Journal of Clinical Virology* 49 (2010) 94–99.

33. Eeva Broberg, Jussi Niemelä, Elina Lahti, Timo Hyypiä, Olli Ruuskanen, Matti Waris. **Human rhinovirus C—Associated severe pneumonia in a neonate.** *Journal of Clinical Virology* 51 (2011) 79–82.
34. McErlean P, Shackelton LA, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. **Characterisation of a newly identified human rhinovirus, RVH-PM, discovered in infants with bronchiolitis.** *J Clin Virol* 2007;39:67–75.
35. Hélène Peigue-Lafeuille; Cécile Henquell; Audrey Mirand; Anne-Laure Deusebis. **Prospective genotyping of human rhinoviruses in children and adults during the winter of 2009–2010.** *Journal of Clinical Virology* 53 (2012) 280– 284.
36. Montero Hilda *et al.* **Clinical Characteristics and Genetic Variability of Human Rhinovirus in Mexico.** *Viruses* 2012, 4, 200-210; doi:10.3390/v4020200
37. Kiang, Ishmeet Kalra, Shigeo Yagi, Janice K. Louie, Homer Boushey, John Boothby and David P. Schnurr David. **Assay for 5' Noncoding Region Analysis of All Human Rhinovirus Prototype Strains.** *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46(11):3736.
38. Edgar, R.C. (2004) **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** *Nucleic Acids Res.* 32(5):1792-1797. doi:10.1093/nar/gkh340.
39. McIntyre CL, Knowles NJ, Simmonds P. **Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types J** *Gen Virol.* 2013 Aug;94(Pt 8):1791-806. doi: 10.1099/vir.0.053686-0. Epub 2013 May 15.
40. Palmenberg AC, Spiro D, Kuzmickas R, Wang S, Djikeng A, Rathe JA, et al. **Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution.** *Science.* 2009; 324:55-9.
41. James E. Gern ACP. Rhinoviruses. In: David M. Knipe PMH, editor. **Fields Virology.** Sixth ed. Vol. 1. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins 2013, p. 531-5489.

42. Makela MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimaki M, et al. **Viruses and bacteria in the etiology of the common cold.** J Clin Microbiol. 1998;36:539-42.
43. Han TH, Chung JY, Hwang ES, Koo JW. **Detection of human rhinovirus C in children with acute lower respiratory tract infections in South Korea.** Arch Virol. 2009;154:987-91.
44. Lauinger IL, Bible JM, Halligan EP, Bangalore H, Tosas O, Aarons EJ, et al. **Patient characteristics and severity of human rhinovirus infections in children.** J Clin Virol. 2013;58:216-20.
45. Xiang Z, Gonzalez R, Xie Z, Xiao Y, Liu J, Chen L, et al. **Human rhinovirus C infections mirror those of human rhinovirus A in children with community-acquired pneumonia.** J Clin Virol. 2010;49:94-9.
46. Calvo C, Garcia-Garcia ML, Blanco C, Vazquez MC, Frias ME, Perez-Brena P, et al. **Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain.** J Clin Virol. 2008;42:268-72.
47. Jennings LC, Anderson TP, Werno AM, Beynon KA, Murdoch DR. **Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections.** Pediatr Infect Dis J. 2004;23:1003-7.
48. Midulla F, Scagnolari C, Bonci E, Pierangeli A, Antonelli G, De Angelis D, et al. **Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants.** Arch Dis Child. 2010;95:35-41.
49. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. **Viral pneumonia.** Lancet. 2011;377:1264-75.
50. Murdoch DR, O'Brien KL, Scott JA, Karron RA, Bhat N, Driscoll AJ, et al. **Breathing new life into pneumonia diagnostics.** J Clin Microbiol. 2009;47:3405-8.
51. Calvo C, Casas I, Garcia-Garcia ML, Pozo F, Reyes N, Cruz N, et al. **Role of rhinovirus C respiratory infections in sick and healthy children in Spain.** Pediatr Infect Dis J. 2010;29:717-20.

52. Fry AM, Lu X, Olsen SJ, Chittaganpitch M, Sawatwong P, Chantra S, et al. **Human rhinovirus infections in rural Thailand: epidemiological evidence for rhinovirus as both pathogen and bystander.** PLoS One. 2011;6:e17780.
53. Iwane MK, Prill MM, Lu X, Miller EK, Edwards KM, Hall CB, et al. **Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children.** J Infect Dis. 2011;204:1702-10.
54. Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Koskenvuo M, Ruuskanen O. **Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children.** J Med Virol. 2004;72:695-9.
55. Singleton RJ, Bulkow LR, Miernyk K, DeByle C, Pruitt L, Hummel KB, et al. **Viral respiratory infections in hospitalized and community control children in Alaska.** J Med Virol. 2010;82:1282-90.
56. Khetsuriani N, Lu X, Teague WG, Kazerouni N, Anderson LJ, Erdman DD. **Novel human rhinoviruses and exacerbation of asthma in children.** Emerg Infect Dis. 2008;14:1793-6.
57. Kusel MM, de Klerk NH, Holt PG, Kebabze T, Johnston SL, Sly PD. **Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study.** Pediatr Infect Dis J. 2006;25:680-6.
58. Piotrowska Z, Vazquez M, Shapiro ED, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, et al. **Rhinoviruses are a major cause of wheezing and hospitalization in children less than 2 years of age.** Pediatr Infect Dis J. 2009;28:25-9.
59. Wisdom A, Kutkowska AE, McWilliam Leitch EC, Gaunt E, Templeton K, Harvala H, et al. **Genetics, recombination and clinical features of human rhinovirus species C (HRV-C) infections; interactions of HRV-C with other respiratory viruses.** PLoS One. 2009;4:e8518.
60. Estes MK, Greenberg, H.B. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley, P.M., editor. **Fields Virology.** 6th ed. Vol. 1. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013, p. 1347-401.
61. Miller EK, Williams JV, Gebretsadik T, Carroll KN, Dupont WD, Mohamed YA, et al. **Host and viral factors associated with severity of human rhinovirus-associated infant respiratory tract illness.** J Allergy Clin Immunol.

2011;127:883-91.

62. Mubareka S, Louie L, Wong H, Granados A, Chong S, Luinstra K, et al. **Co-circulation of multiple genotypes of human rhinovirus during a large outbreak of respiratory illness in a veterans' long-term care home.** J Clin Virol. 2013;58:455-60.
63. Hayden FG, Turner RB. **Rhinovirus genetics and virulence: looking for needles in a haystack.** Am J Respir Crit Care Med. 2012;186:818-20.
64. Monto AS, Cavallaro JJ. **The Tecumseh study of respiratory illness. IV. Prevalence of rhinovirus serotypes, 1966-1969.** Am J Epidemiol. 1972;96:352-60.
65. Benjamin P. Steil, David J. Barton. **Cis-Active RNA Elements (CREs) and Picornavirus RNA Replication.** Virus Res. Author manuscript; 2009 February; 139(2): 240–252. doi: 10.1016/j.virusres.2008.07.027 PMID: PMC2692539.

10 Anexos

10.1 Anexo 1

Tabla 1. Frecuencia de infección de RV en niños con IRTS.

	RV-positivo			RV-A ^a			RV-B ^a	RV-C ^a			<i>p-value</i> RV-A vs.RV-C
	Total (%) ^b	Infección simple (%)	Coinfección (%)	Total (%)	Infección simple (%)	Coinfección (%)	Total (%)	Total (%)	Infección simple (%)	Coinfección (%)	
Muestras totales (n=526)	92 (17.5)	64 (12.2)	28 (5.3)	45 (8.6)	31 (5.9)	14 (2.7)	1 (0.2)	27 (5.1)	22 (4.2)	5 (0.9)	0.027^c
Edad (meses)											
≤24 (n=240)	50 (20.8)	33 (13.8)	17 (7.1)	26 (10.8)	18 (7.5)	8 (3.3)	1 (0.4)	14 (5.8)	11 (4.5)	3 (1.2)	0.048
25-48 (n=93)	11 (11.8)	9 (9.7)	2 (2.2)	4 (4.3)	2 (2.2)	2 (2.2)	0	5 (5.4)	5 (5.4)	0	0.733
49-72 (n=68)	9 (13.2)	5 (7.4)	4 (5.9)	2 (2.9)	1 (1.5)	1 (1.5)	0	3 (4.4)	2 (2.9)	1 (1.5)	0.163
73-120 (n=69)	12 (17.4)	10 (14.5)	2 (2.9)	5 (9.8)	5 (9.8)	0	0	4 (7.8)	3 (4.3)	1 (1.4)	0.73
>120 (n=51)	10 (19.6)	7 (13.7)	3 (5.9)	8 (15.7)	5 (9.8)	3 (5.9)	0	1 (2.0)	1 (2.0)	0	0.015

^a La incidencia y porcentaje de genotipos RV A, B, y C en la población son una subestimación, ya que se pudo determinar el genotipo de sólo 73 (80%) de las 92 muestras RV positivas.

^b El porcentaje en todos los casos es en referencia al número total de muestras.

^c En negritas se muestra lo estadísticamente significativo.

10.2 Anexo 2.

Tabla 2. Frecuencia de infección de RV en niños con IRTI.

	RV-positivo			RV-A ^a			RV-B ^a	RV-C ^a			<i>p-value</i> RV-A vs RV-C
	Total (%) ^b	Infección simple (%)	Coinfección (%)	Total (%) ^b	Infección simple (%)	Coinfección (%)	Total (%)	Total (%) ^b	Infección simple (%)	Coinfección (%)	
Muestras totales (n=250)	62 (24.8)	39 (15.6)	23 (9.2)	22 (8.0)	15 (6.1)	7 (2.8)	3 (1.2)	18 (7.2)	12 (4.8)	6 (2.4)	0.509
Edad (meses)											
≤12 (n=132)	22 (16.7)	12 (9.1)	10 (7.6)	9 (6.8)	5 (3.8)	4 (3.0)	2 (1.5)	4 (3.0)	2 (1.5)	2 (1.5)	0.51
13-24 (n=41)	8 (19.5)	6 (14.6)	2 (4.9)	2 (4.9)	1 (2.4)	1 (2.4)	0	3 (7.3)	3 (7.3)	0	0.642
25-36 (n=35)	20 (57.1)	12 (34.3)	8 (22.9)	5 (14.3)	3 (8.6)	2 (5.7)	1 (2.9)	9 (25.7)	5 (14.3)	4 (11.4)	0.101
37-48 (n=12)	3 (25.0)	3 (25.0)	0	1 (8.3)	1 (8.3)	0	0	1 (8.3)	1 (8.3)	0	> 0.999
>48 (n=13)	2 (15.4)	1 (7.7)	1 (7.7)	1 (7.7)	1 (7.7)	0	0	0	0	0	> 0.999

^a La incidencia y porcentaje de genotipos RV A, B, y C en la población son una subestimación, ya que se pudo determinar el genotipo de sólo 73 (80%) de las 92 muestras RV positivas.

^b El porcentaje en todos los casos es en referencia al número total de muestras.

10.3 Anexo 3.

Tabla 3. Observaciones clínicas en niños positivos a RV con IRTS.

Signo/síntoma	Otros virus (%) (n=284)	RV-positivo (%) (n=92)	p-value*	Infección por RV simple (%) (n=64)	p-value*
Asma**	50 (17.6)	19 (20.7)	0.512	14 (21.9)	0.426
Rinitis alérgica**	68 (23.9)	29 (31.5)	0.149	22 (34.4)	0.085
Rinorrea	232 (81.7)	83 (90.2)	0.05	57 (89.1)	0.156
Disfagia	187 (65.8)	50 (55.3)	0.047	34 (53.1)	0.049
Tos	253 (89.1)	84 (91.3)	0.544	58 (90.6)	0.718
Nausea	66 (23.2)	13 (14.1)	0.062	10 (15.6)	0.183
Vomito	74 (26.1)	12 (13.3)	0.01	7 (10.9)	0.01
Diarrea	29 (10.2)	7 (7.6)	0.461	4 (6.3)	0.328
Cefalea	114 (41.5)	20 (21.7)	0.001	14 (21.9)	0.006
Mialgia/Artralgia	85 (29.9)	11 (12.0)	0.001	9 (14.1)	0.01
Disfonía	40 (14.1)	14 (15.2)	0.788	11 (17.2)	0.526
Aleteo nasal	11 (3.9)	4 (4.3)	0.84	4 (6.3)	0.398
Retracción intercostal	36 (12.7)	10 (10.9)	0.646	9 (14.1)	0.765
Conjuntivitis	24 (8.5)	8 (8.7)	0.942	5 (7.8)	0.867
Retracción xifoidea	10 (2.5)	3 (3.3)	0.905	3 (4.7)	0.657
Disociación toracoabdominal	11 (3.9)	2 (2.2)	0.438	2 (3.1)	0.776
Disnea	38 (13.4)	11 (12.0)	0.724	10 (15.6)	0.638
Sibilancia	53 (18.7)	14 (15.2)	0.453	12 (18.8)	0.987
Fiebre >=38	146 (51.4)	28 (29.3)	0.0001	17 (26.6)	0.0001
Frec. cardiaca incrementada***	25 (8.8)	3 (3.7)	0.078	2 (3.1)	0.125
Frec. respiratoria incrementada***	148 (52.1)	39 (42.4)	0.105	28 (43.8)	0.227

*Valores de p se encuentran entre las infecciones generales RV o RV en infección simple y coinfección con otros virus respiratorios. En negrita se muestran diferencias estadísticamente significativas.

**Condición previa.

***Ajustado por rango de edades.

10.4 Anexo 4

Signo/síntoma	Otros virus (%) (n=126)	RV-positivos (%) (n=55)	<i>p-value</i> *	Infección simple por RV (%) (n=34)	<i>p-value</i> ^{a*}
Neumonía	120 (94.5)	51 (92.7)	0.488	30 (88.32)	0.131
Tos	121 (96.0)	50 (90.9)	0.165	32 (94.1)	0.628
Aleteo nasal	65 (51.6)	19 (34.5)	0.034	10 (29.4)	0.047
Ruido al exhalar	29 (23.0)	8 (14.5)	0.194	6 (17.6)	0.502
Retracción intercostal	111 (88.1)	45 (81.8)	0.26	28 (82.4)	0.378
Retracción xifoidea	68 (54.0)	14 (25.5)	0.0001	10 (29.4)	0.011
Disociación toracoabdominal	51 (40.5)	24 (43.6)	0.691	12 (35.3)	0.583
Fiebre ≥ 38	37 (29.4)	25 (45.5)	0.036	17 (50.1)	0.024
Frec. respiratoria incrementada**	94 (75.2)	49 (89.1)	0.037	32 (94.1)	0.0001

*Valores de p se encuentran entre las infecciones generales RV o RV en infección simple y coinfección con otros virus respiratorios. En negrita se muestran diferencias estadísticamente significativas.

**Ajustado por rango de edades.