

**“TIPIFICACION DE ENTEROVIRUS NO-POLIO COMUNITARIOS
CAUSANTES DE NEUROVIROSIS EN NIÑOS URUGUAYOS”**

Esteban Hernández Méndez
Tesina de Grado
Licenciatura en Bioquímica

Orientadora: Dra. PhD. Laura García

Laboratorio de Biología Molecular
Departamento de Patología Clínica
Centro Hospitalario Pereira Rossell

Laboratorio de Virología Molecular
CIN. Facultad de Ciencias
UdelaR

Diciembre de 2014

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN	5
I. INTRODUCCIÓN.....	6
I.1 EL VIRUS.....	7
I.1.1 Familia Picornaviridae	7
I.1.2 Taxonomía	7
I.1.3 Enterovirus.....	10
I.1.4 Enterovirus no-polio	11
I.2 ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y ESTRUCTURA.....	11
I.2.1 Genoma.....	11
I.2.2 Estructura	12
I.3 CICLO DE REPLICACIÓN	14
I.4 EPIDEMIOLOGÍA.....	15
I.5 DIAGNÓSTICO.....	17
I.6 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN.....	18
II. OBJETIVOS	20
II.1 OBJETIVO GENERAL	21
II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
III.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	23
III.2 AISLAMIENTO.....	23
III.3 EXTRACCIÓN DE ARN	24
III.4 AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA VIRAL	26
III.4.1 Cebadores	26
III.4.2 RT-PCR.....	27
III.4.3 RT- SeminestedPCR	29
III.4.4 Visualización del amplicón	29
III.5 SECUENCIACIÓN	30
III.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	30
IV. RESULTADOS	31
IV.1 AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 5'	32
IV.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN VP1	33
IV.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	36
V. DISCUSIÓN	40
VI. CONCLUSIONES	44

VII. AGRADECIMIENTOS	46
VIII. BIBLIOGRAFÍA	47

ABREVIATURAS

µl:	Microlitros
aa:	aminoácidos
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN copia
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
CV:	Coxsackievirus
CAP:	Nucleótido modificado de guanina (7 metil-guanosina)
CHPR:	Centro Hospitalario Pereira Rossell
E:	Echovirus
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EV:	Enterovirus
FDA:	Food and Drug Administration
HEV:	Enterovirus Humanos
HRV:	Rhinovirus Humanos
ICAM:	Molécula de adhesión intracelular I
IRES:	Sitio interno de entrada del ribosoma
LBM:	Laboratorio de Biología Molecular
LCR:	Líquido cefalorraquídeo
MC:	Medio de crecimiento
MEM:	Medio esencial mínimo
min:	Minutos
ml:	Mililitros
nm:	Nanómetros
ORF:	Marco abierto de lectura
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RNAsa:	Ribonucleasa
rpm:	Revoluciones por minuto
RT-PCR:	Retrotranscripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-snPCR:	RT-semi-nestedPCR
SNC:	Sistema Nervioso Central
seg:	Segundos
ssARN:	Ácido ribonucleico simple hebra
TAE:	Buffer Tris-Acetato-EDTA
TA:	Temperatura ambiente
Tris:	Tris(Hidroximetil)aminometano
UTR:	Región no codificante
UV:	Ultravioleta
VP:	Partícula viral
VPg:	Proteína unida al genoma

RESUMEN

Los Enterovirus no-polio son miembros de la familia *Picornaviridae*, virus ARN de pequeño tamaño de polaridad positiva. Los virus componentes de este género infectan una gran variedad de organismos como bovinos, ovinos, simios y humanos, en los cuales pueden provocar una gran cantidad de enfermedades. Si bien la mayoría de las infecciones por Enterovirus son tolerables y de corta duración, los Enterovirus no-polio son desde la prácticamente erradicación del virus del polio, la principal causa de meningitis aséptica. Si bien todas las personas son susceptibles a la infección por Enterovirus, los recién nacidos, niños y adolescentes son más propensos a infectarse y contraer la enfermedad.

En este trabajo se propuso la tipificación de los Enterovirus no-polio que circulan en comunidad desde el año 2010 al presente año 2014, y que pueden ser causantes de neurovirosis en niños uruguayos que se atendieron en el Centro Hospitalario Pereira Rossell (CHPR).

A partir de líquido cefalorraquídeo (LCR) con pasaje por cultivo celular, se logró a través de técnicas de Biología Molecular, la amplificación parcial del gen codificante para la proteína estructural VP1 de Enterovirus. Mediante la secuenciación y análisis de las secuencias se logró la identificación de las cepas circulantes en los últimos cinco años.

La tipificación de los Enterovirus que es reportada por el laboratorio al Programa Nacional de Vigilancia de Encefalitis y Meningitis Virales del Ministerio de Salud Pública, determinó la circulación en los últimos cinco años de al menos, los genotipos CV-B1, CV-B3, CV-B5, E3, E5, E6, E11, E13 y E18.

Análisis filogenéticos con las secuencias parciales, permitió determinar que todas las cepas identificadas son pertenecientes a la especie de Enterovirus Humanos del grupo B (HEV-B), y se agruparon en un clado diferente a las cepas que han aumentado su actividad a nivel mundial con graves consecuencias, tales como Enterovirus 71 (EV71) y Enterovirus 68 (EV-D68).

I. INTRODUCCIÓN

I.1 EL VIRUS

I.1.1 Familia *Picornaviridae*

Los Enterovirus conforman un género comprendido en la familia *Picornaviridae* que constituye una de las familias virales más importantes y de mayor tamaño. Como su nombre lo define, está conformada por virus ARN de pequeño tamaño (Pico: pequeño; RNA: ácido ribonucleico; virus) (White & Fenner, 1994). Los picornavirus, como se les dice comúnmente, son virus que causan un amplio espectro de enfermedades en humanos, animales y plantas, tales como la gripe común causada por Rhinovirus (Stock, 2014a), la enfermedad mano-pie-boca causada por varios Enterovirus (Stock, 2014b; Teng et al., 2013), hepatitis A, y enfermedades muy graves como la poliomielitis.

La familia *Picornaviridae* es una de las más importantes históricamente en cuanto a las investigaciones en virología. El virus de la enfermedad mano-pie-boca (FMDV), un picornavirus, fue el primer virus animal descubierto en 1898 por F. Loeffler y P. Frosch (Gromeier et al, 1999). En 1908 fue identificado el virus (poliovirus) causante de una de las enfermedades más raras y epidémicas a comienzos del siglo XX, la poliomielitis. Intensas investigaciones han permitido elaborar dos vacunas efectivas contra el virus que al día de hoy, han permitido la casi completa erradicación del virus a nivel mundial (Racaniello, 2006). El descubrimiento de una ARN polimerasa- ARN dependiente se produjo en Mengovirus, un picornavirus (Baltimore & Franklin, 1963), así como otra cantidad de avances en virología se produjeron en miembros de la familia *Picornaviridae*.

Todos los miembros de esta familia son virus ARN de cadena positiva, no envueltos y de cápside con simetría icosaédrica de 30 nm. Estos virus poseen una gran variabilidad genética debido tanto a las mutaciones como recombinaciones (Tapparel et al, 2013).

La estabilidad al pH y la temperatura varía según el género. Todos los picornavirus son resistentes al éter, al cloroformo y a detergentes no-iónicos (los Enterovirus son una excepción), sin embargo, se inactivan rápidamente por radiaciones ionizantes, fenol y formaldehído. Estas propiedades fisicoquímicas son importantes a la hora de actuar frente a estos agentes en momentos de desinfección o esterilización (IUMS, 2012).

I.1.2 Taxonomía

La clasificación de los virus presenta un constante cambio debido al alto grado de mutación y recombinación que poseen, y por los descubrimientos y avances tecnológicos en la actualidad. La clasificación (taxonomía) y publicación del ordenamiento de los virus es llevada adelante por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). En las últimas cinco décadas la familia *Picornaviridae* pasó de estar constituida por dos géneros, en 1971 (ICTV, 2014a), a estar formada por 26 géneros en 2013, en la cual, además de haberse creado nuevos géneros, otros han sido eliminados, como el caso

de Rhinovirus, donde las especies que conformaban dicho género fueron reasignados al género Enterovirus (Blomqvist et al, 2002; Laine et al, 2005; ICTV, 2014b).

Las especies de picornavirus son una clase de serotipos relacionados filogenéticamente que comparten ciertas características (Figura 1). Algunos de los criterios utilizados para la inclusión de especies en la familia son: mapas genómicos esencialmente idénticos, un limitado rango de huéspedes y receptores celulares, una gran compatibilidad en el procesamiento proteolítico, replicación, recombinación genómica y encapsidación (IUMS, 2012).

Los Enterovirus son un ejemplo claro de la heterogeneidad de la familia a la cual pertenecen, tanto genéticamente como a nivel de fenotipo. Los virus que conforman este género se dividen en 12 especies distintas con un total de 308 serotipos (Tabla 1). Siete son las especies que infectan a humanos, donde cuatro son los Enterovirus Humanos (Human Enterovirus, HEV), Enterovirus A, Enterovirus B, Enterovirus C y Enterovirus D; los otros tres se componen por los Rhinovirus Humanos (Human rhinovirus, HRV), Rhinovirus A, Rhinovirus B y Rhinovirus C. Las restantes especies infectan simios, porcinos y bovinos (Tapparel et al, 2013). Los Enterovirus se componen de Poliovirus, Coxsackievirus, Echovirus y por los nuevos Enterovirus o virus numerados.

El Poliovirus es el agente causante de la poliomielitis, enfermedad infecto-contagiosa (principalmente en niños menores a cinco años), que en la mayoría de los casos es asintomática y auto limitada al tracto gastrointestinal, pero que en caso de diseminarse al SNC puede afectar las motoneuronas provocando parálisis y eventualmente la muerte (Fernández y Rodríguez, 2013).

Los Coxsackievirus se organizan en dos grupos: A y B; en la mayoría de los casos, ocasionan síntomas leves similares a la gripe que se eliminan sin tratamiento, sin embargo, en algunos casos pueden provocar infecciones mas graves. Los del grupo A ocasionan herpangina, enfermedad mano-pie-boca y conjuntivitis hemorrágica aguda, los del grupo B, pleurodinia, miocarditis/pericarditis y meningoencefalitis. Algunos serotipos de A y B producen meningitis, hepatitis y enfermedades respiratorias (Romero, 2007).

Los Echovirus, todos pertenecientes a la especie HEV-B, son muy infecciosos y su principal objetivo son los niños provocando un amplio rango de presentaciones clínicas, y son la causa más frecuente de meningitis aséptica. Se caracteriza por un importante efecto citopático (Trallero y Avellón, 2003; Romero, 2007).

Entre los Enterovirus numerados (EV), se encuentra el EV-D68 que produce neumonía y ha ocasionado epidemias en otros países en el corriente año (Piralla et al, 2014), el EV-70 que ocasiona conjuntivitis hemorrágica aguda, y el EV-71 que en los últimos años ha adquirido una gran trascendencia debido a las enfermedades graves que conduce y que son similares a las provocadas por poliovirus, como meningitis aséptica, disfunción cardiopulmonar aguda y parálisis flácida aguda (Pérez et al, 2007).

Entre los Enterovirus A, CV-16 y EV-71 son los mayores agentes etiológicos de la enfermedad mano-pie-boca, y en el caso del último, puede provocar varias enfermedades neurológicas (Nishimura & Shimizu, 2012).

La especie Enterovirus C es la especie tipo, y comprende las cepas de poliovirus (Brown et al, 2003).

En el caso de los HRV, se ha propuesto una reevaluación de estos virus con el descubrimiento de la especie C de Rhinovirus (McIntyre et al, 2013).

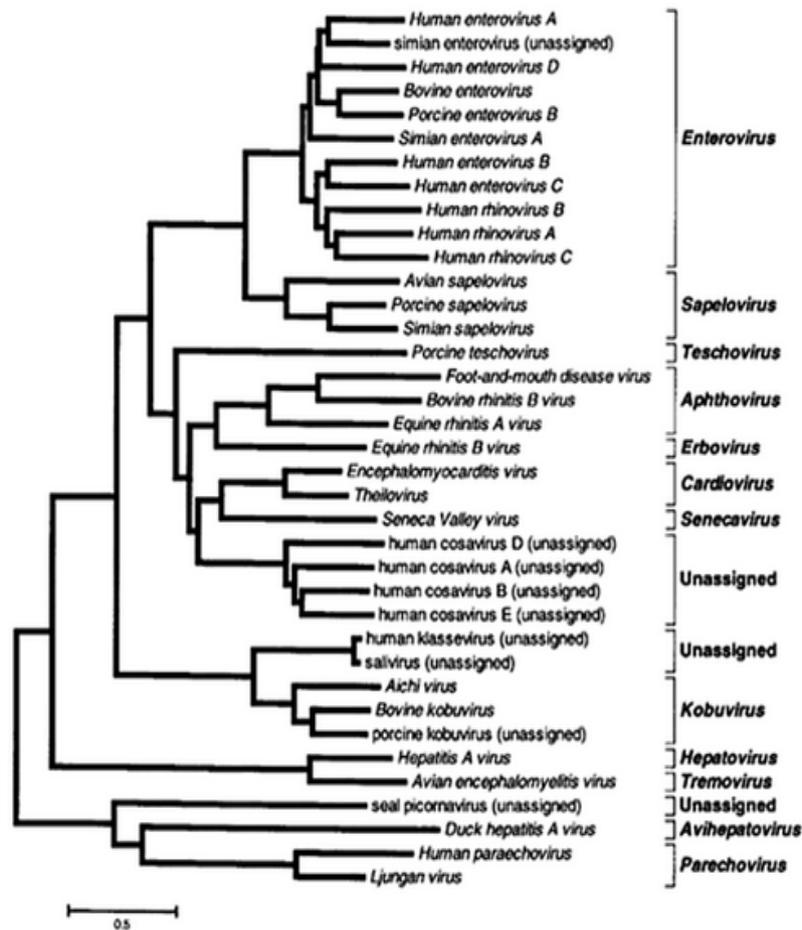


Figura 1. Árbol filogenético obtenido por el método neighbor-joining mostrando las relaciones entre algunas especies y géneros de picornavirus a partir de VP1 y 3Dpolimerasa. Figura tomada y adaptada de Knowles et al (2010).

Tabla 1. Detalle de los tipos de virus por especie de Enterovirus y rango de huéspedes a los que infectan. CV: Coxsackievirus; EV: Enterovirus (numerados); E: Echovirus; PV: Poliovirus; SV/SA: Simian Enterovirus; BA: Baboon Enterovirus; HRV: Rhinovirus.

Especies	Serotipos	Huéspedes
Enterovirus A	25 serotipos: 11 CV, 10 EV, SV19, SV43, SV46, BA13.	Humanos, monos.
Enterovirus B	61 serotipos: 7 CV, 28 E, 25 EV, SA5.	Humanos, monos, cerdos.
Enterovirus C	23 serotipos: 3 PV, 9 CV, 11 EV.	Humanos.
Enterovirus D	5 serotipos: todos EV.	Humanos, monos.
Enterovirus E	4 serotipos: todos EV.	Bovinos.
Enterovirus F	6 serotipos: todos EV.	Bovinos
Enterovirus G	11 serotipos: todos EV.	Cerdos.
Enterovirus H	1 serotipo: EV.	Monos.
Enterovirus J	6 serotipos: 5 EV, SV6.	Monos.
Rhinovirus A	80 serotipos: todos HRV-A	Humanos.
Rhinovirus B	32 serotipos: todos HRV-B	Humanos.
Rhinovirus C	54 serotipos: todos HRV-C	Humanos.

I.1.3 Enterovirus

Si bien los Rhinovirus están restringidos al tracto respiratorio y la gran mayoría de los Enterovirus infecta el tracto gastrointestinal, éstos pueden expandirse hacia otros órganos. La transmisión es fecal-oral y respiratoria. Con la invasión sistémica, pueden producirse tanto enfermedades febriles no-específicas como otras con síntomas específicos (erupciones, enfermedad mano-pie-boca, conjuntivitis, síndrome de Guillain-Barré, miocarditis, pericarditis, parálisis flácida aguda). En los casos donde haya replicación sistémica, una alta viremia puede llegar a producir la infección de otras células aparte del sistema digestivo, tal como las células del Sistema Nervioso Central (SNC) (Jubelt & Lipton, 2014).

En la actualidad, se suele hacer la diferencia entre los poliovirus, las tres cepas (PV1-3) pertenecen a la especie Enterovirus C, y los Enterovirus no-polio. Aunque históricamente los poliovirus son los Enterovirus más importantes, los Enterovirus no-polio han adquirido una gran trascendencia debido a su alta prevalencia. Además de las enfermedades descritas previamente, se ha descubierto que algunas cepas de Enterovirus no-polio pueden inducir y acelerar enfermedades crónicas como la diabetes tipo 1 (Nair et al, 2010; Coppieters et al, 2012), incluso pueden llegar a provocar la muerte. También pueden ocurrir infecciones crónicas por Enterovirus en

individuos con disfunciones en los linfocitos B, incluyendo aquellos con agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, inmunodeficiencia combinada severa o inmunodeficiencia variable común (Sutcliffe & Moss, 2013).

Estudios estiman que en los Estados Unidos por ejemplo, los Enterovirus producen de 5 a 10 millones de infecciones sintomáticas, de las cuales, 30.000 a 50.000 terminan en internaciones anuales (Shors, 2009).

I.1.4 Enterovirus no-polio

Los Enterovirus no-polio incluyen cepas de Coxsackievirus del grupo A, del grupo B, Echovirus y enterovirus numerados.

Todas las personas son susceptibles a ser infectados por Enterovirus no-polio, sin embargo, los recién nacidos, niños y adolescentes son más propensos a infectarse y contraer la enfermedad. Esto se debe a que todavía no poseen la protección inmune debido a exposiciones previas con el virus. A partir de una infección intestinal, se producen viremias cada vez más complejas hasta llegar a infectar otros tejidos (miocardio, meninges, etc.). Si bien la mayoría de las infecciones enterovirales son benignas y de corta duración, los Enterovirus no-polio son la causa más común de meningitis aséptica viral (Belazarian et al, 2009).

Los neonatos sin anticuerpos maternos que adquieren la infección tienen un riesgo de enfermar con una alta tasa de mortalidad. Dichas enfermedades en niños incluye de tipo respiratorias (resfrío común, herpangina, neumonía, pleurodinia), gastrointestinales (vómitos, diarrea, hepatitis), oculares (conjuntivitis hemorrágica aguda), neurológicas (encefalitis, meningitis, parálisis), y cardíacas (miopericarditis) (American Academy of Pediatrics, 2009). Existe un alto porcentaje de correlación entre infantes que presentan infecciones entéricas y meningitis (Dagan et al, 1988), aunque la mayoría de los pacientes son menores de un año y en este grupo etario las infecciones por Enterovirus poseen una alta morbilidad y mortalidad, en especial cuando la infección se produce previo al parto (Marier et al, 1975; Tebruegge & Curtis, 2009).

I.2 ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y ESTRUCTURA

I.2.1 Genoma

El genoma de Enterovirus se compone de una sola cadena de ARN de polaridad positiva (ssRNA+) de unos 7500 nucleótidos, de manera que son virus infecciosos, ya que actúan directamente como ARNm replicándose en el citoplasma de la célula infectada de forma lítica (Fortuny & Pumarola, 2006).

El ARN de estos virus es monocistrónico con un solo ORF (marco abierto de lectura), de modo que codifica para una sola poliproteína grande. La traducción de este ORF es dirigido por un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES), localizado en el extremo 5' UTR (Schmid & Wimmer,

por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales (VP1 a VP4) (Fortuny & Pumarola, 2006). En la parte externa se encuentran VP1 a VP3, mientras que VP4 se localiza del lado interno (Figura 3).

La ausencia de la envoltura, le confiere a los Enterovirus resistencia al éter, cloroformo y alcoholes, incluso una cierta estabilidad ambiental. La inactivación de los Enterovirus se produce por calor, con temperaturas superiores a 50°C, también mediante cloro y formaldehído (Romero, 2014).

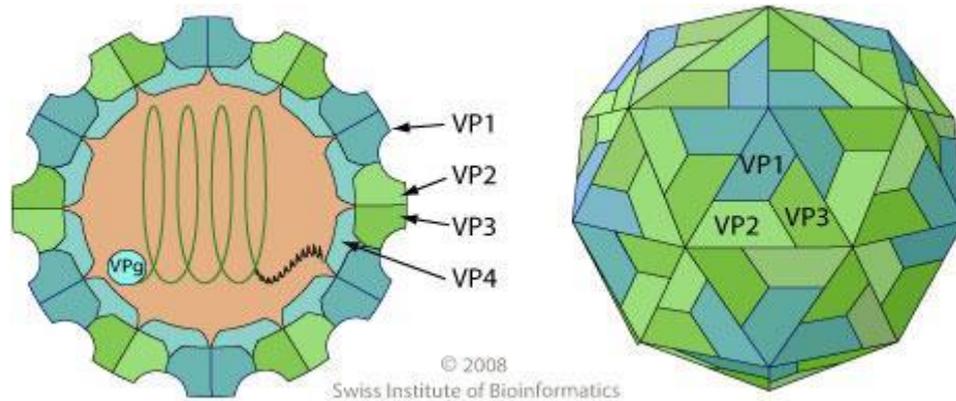


Figura 3. Ilustración de la estructura de la cápside de Enterovirus. Las proteínas estructurales VP1-3 se encuentran en la cara externa de la cápside, mientras que VP4 se halla en la cara interna de la misma. En el interior se encuentra un ARN⁺ monocatenario unido a una proteína viral (VPg). Figura tomada de Swiss Institute of Bioinformatics (2008).

El rearrreglo de las cuatro proteínas estructurales es tal, que le da al virión la simetría icosaédrica. Las proteínas externas de la cápside tienen una estructura en común, donde cada una se pliega en un barril- β de ocho hebras antiparalelas. Estas están conectadas mediante loops que le confieren estabilidad a la cápside y además determinan entre otras cosas la especificidad del receptor (Fry & Stuart, 2010).

El protómero, estructura básica de la cápside, en principio está formado por el precursor VP0, VP1 y VP3. Cinco protómeros se auto ensamblan formando el pentámero. Luego 12 pentámeros se ensamblan alrededor de una sola hebra de ARN⁺ formando el virión inmaduro. Para completar la maduración, VP0 debe ser cortado dando lugar a VP2 y VP4.

Las proteínas externas, sobre todo VP1, exponen en su superficie determinantes antigénicos que le dan a los Enterovirus su diversidad y la especificidad de los receptores (Rossmann, 1989; Plevka et al, 2012).

Una red en el interior de la cápside contribuye a la estabilidad del virión. Debajo del eje de simetría 5, las regiones N-terminales de VP1-VP3 interactúan con un grupo miristilo unido a VP4 uniendo ambas estructuras y proporcionándole la estabilidad (Chow et al, 1987). La proteína VP4 está en estrecha asociación con el genoma viral y está implicada en la liberación del mismo luego de que el virus se une al huésped (Tuthill et al, 2006).

I.3 CICLO DE REPLICACIÓN

La replicación de Enterovirus se conoce en su mayoría por estudios sobre modelos de poliovirus, aunque la mayoría de los mecanismos de replicación son comunes con todos los Enterovirus y picornavirus. La replicación es lítica y ocurre completamente en el citoplasma de la célula huésped, incluso en células sin núcleo (Voevodin & Marx, 2009).

El primer paso es la adhesión del virus a un receptor celular, los cuales varían entre los diferentes virus; en el caso de HEV, CD-155 es el receptor para poliovirus, mientras que ICAM-1 es en el caso de Coxsackievirus A. Una vez lograda la unión, la cápside viral sufre un cambio conformacional que resulta en la liberación del ARN genómico en el citoplasma a través de un poro previamente formado (Hogle, 2002; Bostina et al, 2011).

Una vez dentro del citoplasma, el ARN es traducido para obtener las proteínas virales necesarias para la replicación del genoma y la producción de nuevas partículas virales. La traducción del genoma es independiente del CAP y está dirigido por IRES, que interactúan con ribosomas celulares para obtener como producto primario de la traducción, la poliproteína (Balvay et al, 2009). La poliproteína formada es procesada por proteasas virales, formando proteínas virales maduras (Figura 4).

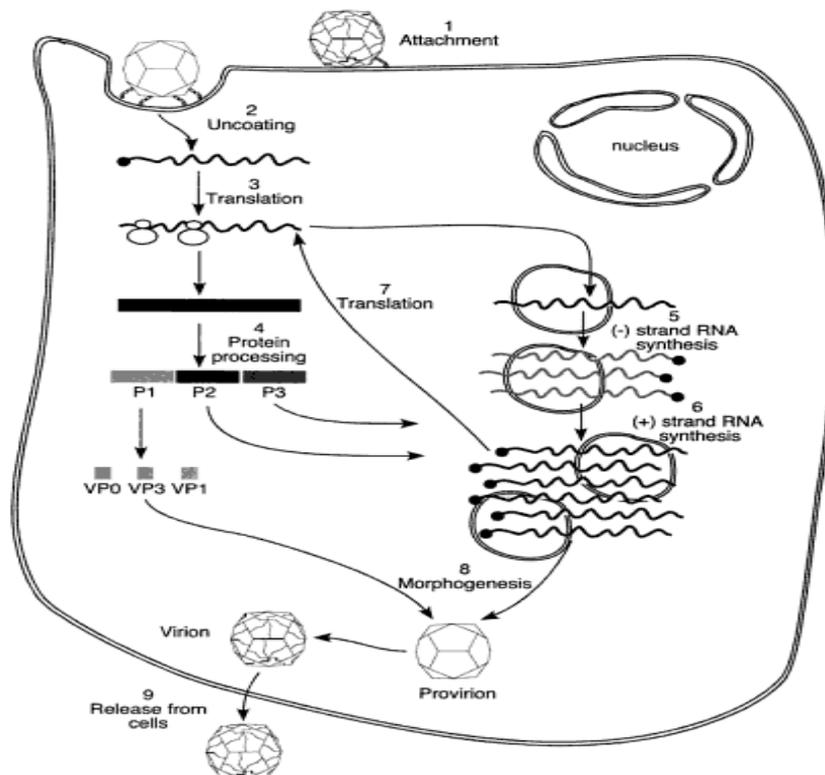


Figura 4. Ilustración del ciclo de replicación picornavirus. 1- el virus se une al receptor celular; 2- el genoma penetra el huésped; 3- traducción del ARN viral; 4- la poliproteína es clivada generando las proteínas virales; 5- síntesis de ARN- en vesículas; 6- síntesis de ARN+; 7- ARN+ recién sintetizado es utilizado para sintetizar más proteínas virales; 8- Se produce la morfogénesis (encapsidación); 9- viriones recién sintetizados se liberan por lisis. Figura tomada de (Racaniello, 2007).

Una característica de la replicación de Enterovirus, es la interrupción de la traducción de proteínas de la célula huésped, permitiendo que toda la maquinaria celular se dedique a la síntesis de las partículas virales. Se cree que la proteasa viral 2A^{Pro} es la responsable de esta interrupción (Voevodin & Marx, 2009). Luego de que se han acumulado suficientes proteínas virales, se produce un énfasis en la replicación del ARN, catalizada por una ARN polimerasa viral- ARN dependiente en pequeñas vesículas (Belov et al, 2012). El primer paso de la replicación genómica es copiar la hebra positiva de ARN (ARN+) en un intermediario de ARN de sentido negativo (ARN-), seguido de la producción de ARN+. Una vez que la síntesis de proteínas virales es bastante grande, comienza el proceso de encapsidación (Racaniello, 2007).

El ensamblaje de la cápside es un proceso de varios pasos, que empieza con la formación de los protómeros a partir del corte proteolítico de P1. Cinco protómeros asociados forman los pentámeros, los cuales se asocian con el ARN+ recién sintetizado y se auto ensamblan completando la formación de la cápside. Este mecanismo, también llamado morfogénesis, es el paso menos entendido del ciclo viral ya que está muy acoplado con la traducción y la replicación del genoma (Jiang et al, 2014).

El tiempo que requiere un solo ciclo de replicación, es decir, desde el inicio de la infección hasta el ensamblaje del virus, varía desde 5 a 10 hs dependiendo de varios factores, tales como la célula huésped, el virus particular, pH, temperatura y el número de partículas virales a la cual la célula está expuesta. Si bien el número de partículas obtenidas en la replicación puede llegar a valores muy altos (100.000 partículas por célula), tan solo 0.1-1% de estas pueden ser infecciosas (Oberste & Gerber, 2014).

I.4 EPIDEMIOLOGÍA

Las infecciones por Enterovirus ocurren en todo el mundo. Las infecciones causadas por estos virus pueden ocurrir durante todo el año, sin embargo, la frecuencia de los mismos aumenta en los meses de verano y otoño en regiones templadas (CDC, 2010).

La transmisión es principalmente fecal-oral y respiratoria, debido a esto la prevalencia de las infecciones por Enterovirus se produce en niveles socioeconómicos bajos, de sobrepoblación y baja higiene personal, aunque también puede ser transmitida por fómites y de madre a hijo en el período perinatal (Sánchez & Martí, 1998). La excreción viral por la materia fecal puede persistir por varias semanas, permitiendo así que los niños continúen potencialmente infectados por largos períodos debido a infección propia; la excreción por las vías respiratorias suele eliminarse en pocas semanas (American Academy of Pediatrics, 2009).

Las infecciones pueden presentarse de dos formas epidemiológicas: endémica o en brotes epidémicos. La circulación endémica se caracteriza por actividades esporádicas anuales, dado que la inmunidad adquirida no permite la producción de brotes. En el caso de brotes epidémicos, donde los períodos de tiempo entre brote y brote son largos, permite que el número de

individuos susceptibles en la población sea mayor generándose esta presentación (Oberste & Gerber, 2014).

El género Enterovirus posee una gran cantidad de serotipos, pero cada serotipo individual tiene un patrón de circulación diferente y a menudo se relacionan las manifestaciones clínicas de un brote con el serotipo circulante, como en Estados Unidos en 2007 (CDC, 2010), o más recientemente en India, en 2012, donde casos de encefalitis se relacionaron con Enterovirus (Kumar et al, 2012). Los serotipos individuales suelen circular por un tiempo y luego son reemplazados por nuevos serotipos. Algunos Enterovirus son aislados años tras años mientras que otros reemergen tras años de inactividad. Los patrones de circulación a largo tiempo para los serotipos individuales pueden variar pero pueden ser compatibles con brotes endémicos o epidémicos (Khetsuriani et al, 2006).

En la era previa a la vacunación contra el polio, los poliovirus eran la principal causa de la meningitis aséptica, sin embargo, luego de la vacunación contra el polio, los Enterovirus no-polio han adquirido el primer lugar como agentes causales de esta enfermedad, en particular, los Echovirus de tipo 4, 6, 9, 11, 13, 16 y 30, los Coxsackievirus B2-5, Coxsackievirus A9 y enterovirus 71 (McMinn & Van Tu, 2013).

El Enterovirus 71, aislado por primera vez en EE.UU en 1969, causa frecuente de epidemias de la enfermedad mano-pie-boca, está muy relacionado con poliovirus debido a las severas enfermedades que puede causar como encefalitis, meningitis aséptica y parálisis flácida aguda. La encefalitis causada por el EV71 es característica por ser una encefalitis del tronco encefálico, que en contraste con otros Enterovirus, suele estar acompañada de severos síntomas cardiorespiratorios, parecidos a los causados por los poliovirus (Ooi, 2010). El EV71 ha aumentado su actividad epidémica y es un importante problema de salud pública en toda la región de Asia-Pacífico desde el primer caso en 1997 (McMinn, 2002; Solomon et al, 2010). El virus circula a lo largo del mundo, ya que han habido brotes en Australia (Kennet et al, 1974), Europa (Akhmadishina et al, 2014; Bible et al, 2008), América del Norte (Merovitz et al, 2000), incluso se han observado casos aislados en Argentina y el norte de Brasil (Castro et al, 2005; Cisterna et al, 2007). Al día de hoy, no se encuentran reportes oficiales de casos de infección por EV71 en el Uruguay, de manera que en este estudio se pretende verificar la presencia o ausencia de este serotipo circulando en la comunidad.

En el corriente año 2014, se ha reportado un aumento de los casos de personas con problemas respiratorios infectadas con Enterovirus D-68 (EV-D68) en todo el mundo (Piralla et al, 2014). El EV-D68, es un Enterovirus no-polio que causa desde leves a graves problemas respiratorios. Al igual que los Rhinovirus, se transmiten a través de las secreciones respiratorias como la saliva y las secreciones nasales. Los recién nacidos, niños y adolescentes son los más susceptibles a infectarse debido a que no poseen inmunidad y las personas con asma poseen un mayor riesgo de enfermedades respiratorias severas por infección de EV-D68. En hospitales de Estados Unidos se han activado planes de preparación para emergencias

debido a una posible enfermedad respiratoria emergente causada por el EV-D68 (Shaw et al, 2014).

I.5 DIAGNÓSTICO

Las principales técnicas de laboratorio ampliamente utilizadas para la identificación de Enterovirus y su caracterización comprenden el aislamiento viral en cultivos celulares y la identificación de los serotipos de Enterovirus específicos empleando técnicas inmunológicas (como la inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específica de serotipos o neutralización con antisuero serotipo-específica); o técnicas de biología molecular, en particular, RT-PCR (McMinn & Van Tu, 2013). El método de diagnóstico tradicional empleado ha sido el aislamiento viral en cultivos celulares en los que se observa el efecto citopático y su tipificación por ensayos de neutralización de suero, sin embargo, debido a sus procesos laboriosos, el tiempo que consumen y la necesidad de un pool de antisueros, las técnicas de biología molecular han conseguido ser las técnicas de referencia para la identificación de Enterovirus. El descubrimiento de que la proteína VP1 de picornavirus posee dominios de neutralización, permite que la comparación de sus secuencias se pueda emplear para la tipificación de Enterovirus (Oberste et al, 1999a).

La rapidez del diagnóstico molecular de meningitis por Enterovirus ha sido muy importante para la determinación del tratamiento a ser empleado con el paciente debido a la rápida documentación del ARN viral en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Ninove et al, 2011).

Las muestras que se emplean y que son más fáciles de obtener son el exudado faríngeo y rectal, y muestras de materia fecal. También se pueden obtener Enterovirus de muestras de sangre y orina mientras la enfermedad está en la etapa aguda e incluso de LCR para el diagnóstico en meningitis aséptica (American Academy of Pediatrics, 2009).

Ensayos serotipo-específicos de RT-PCR se han desarrollado en varias partes del mundo, por ejemplo, los ensayos de RT-PCR específicos de EV71 y específicos para CV-A16, debido a que son estos los principales agentes etiológicos de la enfermedad mano-pie-boca en niños. El diagnóstico diferencial entre ambos serotipos, incluso entre EV71 de otros virus Cocksackie A, es importante debido a que el primero está asociado con los casos más severos (Teng et al, 2010). También es muy importante el diagnóstico diferencial entre la meningitis aséptica y la meningitis bacteriana, el cual se puede lograr por punción lumbar y observación del LCR por microscopio y cultivo; sin embargo, las pruebas moleculares pueden reducir los costos y los tratamientos innecesarios (Lee & Davies, 2007).

El método de la secuenciación parcial del gen codificante para la proteína VP1, permite reducir considerablemente el tiempo requerido para tipificar los Enterovirus aislados, incluso para determinar el genotipo de aquellos aislados que son difíciles o casi imposibles de determinar por métodos de serotipificación. El genotipo de una cepa desconocida puede determinarse por comparación de la secuencia parcial de VP1 con aquellas secuencias

documentadas en las bases de datos (Oberste et al, 1999b). Este fue el método empleado para la realización de este estudio, la secuenciación parcial de cepas de Enterovirus mediante RT-PCR y RT-snPCR, y la comparación de estas cepas problemáticas con una base de datos (Nix, Oberste & Pallansch, 2006).

I.6 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

A pesar de la importancia médica y socioeconómica que tienen los Enterovirus en todo el mundo, todavía no hay terapias antivirales licenciadas para el combate contra estos virus. Sin embargo, existe una extensa área de desarrollo de tratamientos para combatir las infecciones y enfermedades provocadas por Enterovirus y picornavirus en general, donde algunos ya se encuentran en la etapa II clínica para su aprobación por la FDA (Thibaut et al, 2012; De Palma et al, 2008).

Si bien los tratamientos desarrollados han sido generados para la inhibición de la replicación viral, se ha visto que algunos componentes poseen una selectividad importante como para ser considerados como candidatos para drogas, tal es el caso del plecoranil (Rotbart et al, 2001). El plecoranil se integra en la cápside de picornavirus, impidiendo que el virus se adhiera a los receptores celulares y se produzca el desnudamiento liberando el ARN en la célula blanco. Ensayos clínicos sobre el fármaco han demostrado beneficios en niños y adultos con meningitis por Enterovirus e infecciones en el tracto respiratorio alto en adultos por Rhinovirus, con una potente actividad anti-enterovirus, con excelente biodisponibilidad oral y es bien tolerado por el paciente (Abzug, 2004). En el caso del EV71 no existe un tratamiento, el plecoranil no es un fármaco muy efectivo contra este virus, sin embargo, se ha determinado que ciertos ginsenosidos poseen una efectiva actividad antiviral contra EV71 así como contra CVB3 y HRV3 (Song et al, 2014).

La poliomielitis, también denominada polio, fue la enfermedad más conocida y de mayor repercusión en el siglo XX junto con el SIDA. No existe la cura contra el polio y el tratamiento consiste solamente en cuidados de sostén. La prácticamente erradicación a nivel mundial de la poliomielitis se debe al tratamiento preventivo contra los tres serotipos de poliovirus por medio de la vacunación. Hay dos tipos de vacunas: la vacuna de poliovirus inactivada (IPV), dada a conocer por Salk en 1955, está formada con virus inactivados en formol, la cual se inyecta de forma intramuscular y genera anticuerpos que bloquean la extensión del virus al SNC; la vacuna de poliovirus oral (OPV), sintetizada por Sabin y autorizada en 1962, es una vacuna de virus atenuados administrada por vía oral, la cual induce la inmunidad humoral (IgM e IgG) e inmunidad a nivel de las mucosas (IgA), proveyendo una respuesta inmune más completa (McMinn & Van Tu, 2013).

Hoy en día, con el virus del polio prácticamente erradicado y las graves epidemias causadas por Enterovirus no-polio, se están tratando de desarrollar vacunas para infecciones causadas por Enterovirus no-polio, y en particular EV71, esperando que se puedan limitar en gran medida e incluso

erradicar dichos virus (Bek & McMinn, 2010). Varias vacunas han sido desarrolladas en particular en el Asia- Pacífico, región más afectada por el EV71, las cuales se encuentran en las distintas fases de las pruebas clínicas (Chong et al, 2014, Zhu et al, 2014).

Debido a su forma de transmisión (vía fecal-oral), el principal mecanismo de prevención es una buena higiene personal, incluyendo el lavado de manos y aquellos materiales contaminados (fómites) principalmente los que puedan estar en contacto con los niños. En los hospitales, las precauciones entéricas son importantes y donde cohortes de pacientes y el personal hospitalario pueden ser muy importantes como controles de transmisión durante un brote (Oberste & Gerber, 2014).

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GENERAL

Tipificación de Enterovirus no-polio circulantes en la comunidad a partir de muestras de LCR de niños que se atienden en el Centro Hospitalario Pereira Rossell, de manera de poder monitorear que genotipos circulan en el Uruguay.

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

II.2.1. Aplicación de técnicas de Biología Molecular y cultivo celular a fin de genotipificar cepas de Enterovirus en muestras de LCR de niños internados en el CHPR.

II.2.2. Amplificación, secuenciación y análisis del gen que codifica para la proteína estructural VP1.

II.2.3 Establecer los genotipos circulantes en el período 2010-2014, a partir del estudio comparativo entre las cepas comunitarias y las cepas de referencia en la base de datos.

II.2.4 Determinar la presencia o ausencia del Enterovirus 71 en Uruguay, ya que no hay reportes oficiales que confirmen su circulación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras se obtuvieron a partir de pacientes con probable neurovirosis que consultaron en el Hospital de Niños del CHPR, en los cuales se les practicó una punción lumbar de modo de obtener el LCR (0.5ml aproximadamente). La muestra inicial se repartió en tres tubos estériles, uno dirigido al Laboratorio de Bacteriología, otro al Laboratorio de Urgencias y otro para el Laboratorio de Biología Molecular (LBM) del Departamento de Patología Clínica del CHPR.

Como procedimiento de rutina en el LBM se determinó la presencia o ausencia de Enterovirus en el LCR (además de otras pruebas) mediante la extracción del genoma viral y amplificación del extremo 5' UTR. De esta forma, las muestras de los pacientes que dieron positivo a la detección de Enterovirus fueron almacenadas a -80°C en el freezer, para luego ser aisladas en el cultivo celular.

III.2 AISLAMIENTO

Para el aislamiento de los Enterovirus se utilizó la línea celular RD (pasaje 235), obtenido de un Humano-Rhabdomiosarcoma de morfología epitelial. El medio de crecimiento (MC) empleado para esta línea celular es MEM base Earle con aminoácidos no esenciales más 10% de suero bovino fetal; en el caso de mantenimiento se empleó el mismo medio con aminoácidos no esenciales más 2% de suero bovino fetal.

El procedimiento de cultivo celular y aislamiento viral fue realizado con extrema cautela, cumpliendo con las condiciones de seguridad (guantes, uso de material estéril y descartable, y trabajar bajo campana de flujo laminar), necesarias para evitar tanto la contaminación del producto, como del ambiente y del personal. La mayoría de las muestras, ya estaban cultivadas de años anteriores por el personal del laboratorio.

El pasaje de las células se realizó cada cinco días aproximadamente, cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días para evitar la confluencia del cultivo por tiempos prolongados. Las condiciones de cultivo fueron mantenidas en la incubadora de CO₂, con una temperatura de 37°C, humedad elevada y una concentración de CO₂ de 5%. Los pasajes se efectuaron mediante tripsinización. El crecimiento celular se produjo en botellas de 25ml con un soporte de 150.000 cél/ml (1ml por tubo), más 6ml de MC; se pasó a placas de 24 pocillos para el aislamiento viral y se incubaron 24 hs para permitir la adhesión a la placa.

Se prepararon placas de 24 pocillos con un soporte de 100.000 cél/ml (1 ml por pocillo). Se contaron las células en cámara de Neubauer, en la cual se realizó la distinción entre células viables de células en sufrimiento. Las células viables se distinguen por su brillo y no poseen inclusiones citoplasmáticas, en cambio las células en sufrimiento se observan más oscuras, con un mayor tamaño y con inclusiones citoplasmáticas.

Luego de la incubación, se retiró el medio de cultivo agregando 200µl de LCR al pocillo, donde cada pocillo corresponde a una muestra diferente. Se incubó durante una hora a 37°C en estufa para permitir la infección viral (aumentando la efectividad de la infección a las células). Luego se agregó 1ml de medio de cultivo a 37°C. Se incubó durante una semana (este se considera el primer pasaje). Se realizaron tres pasajes. Para el siguiente pasaje se prepararon placas de 24 pocillos de la misma manera, en cambio, en este se transfirieron 200µl de sobrenadante del pasaje anterior y se incubó la placa durante una hora a 37°C sobre las células sin medio de cultivo.

Al final del tercer pasaje se retiran 200µl del sobrenadante de cada pocillo para realizar la extracción del ARN viral. La placa se guarda a -80°C.

III.3 EXTRACCIÓN DE ARN

El procedimiento de extracción y purificación de ARN viral y ADN (provenientes del cultivo celular) se realizó en la sala de pre-amplificación del LBM en la campana de flujo laminar Clase II. La extracción de los ácidos nucleicos se realizó utilizando el kit comercial “QIAamp MinElute Virus Spin” de Qiagen siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante (Qiagen, 2010a), el cual comprende cuatro pasos principales de lisis, pegado, lavado y elución. De esta forma fueron procesadas 177 muestras obtenidas y cultivadas en el período de 2010-2014 (Figura 5).

Para el primer paso de lisis, se agregó 25µl de Proteasa (liofilizada, la cual se solubilizó con Buffer AVE), y 200µl de la muestra (virus en cultivo celular), en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml. Seguidamente se agregó 200µl de Buffer AL (conteniendo 28µg/ml de carrier ARN), y se vortexeó por 15 seg. Se incubó a 56°C por 15 min. Se centrifugó 10 seg. para eliminar las gotas de la tapa del tubo.

El carrier ARN posee dos funciones, una es la de favorecer la unión de los ácidos nucleicos a la membrana, y por otra parte, grandes cantidades de carrier ARN reduce la degradación del ARN viral por posibles RNAsas que se encuentren libres y no hayan sido degradadas por el Buffer AL. La Proteasa posee la función de inactivar las RNAsas en conjunto con el Buffer AL.

Para favorecer el pegado de las hebras de ARN y ADN a la membrana de silicagel, se agregó 250µl de etanol 95%, se mezcló y dejó incubar a temperatura ambiente (TA) por 5 min. A continuación, el lisado fue traspasado a la columna MinElute. Se centrifugó a 6000g (8000rpm) por min. Se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección de 2ml limpio proporcionada por el fabricante y se descartó el tubo de colección conteniendo el filtrado.

La etapa de lavado, se realizó en tres pasos distintos para eliminar eficientemente los contaminantes que se habían pegado a la membrana. En primera instancia, se agregó 500µl de Buffer AW1 a la columna, se centrifugó por 1 min. a 8000rpm y se volvió a cambiar la columna a un nuevo tubo de recolección, descartando el viejo con el filtrado, luego se adicionó 500µl de

Buffer AW2, se centrifugó por 1 min. a 8000rpm y se cambió la columna a otro tubo de recolección, descartando el filtrado. Siguiendo el proceso de lavado, se agregó 500µl de etanol 95%, se centrifugó a 8000rpm por 1 min. y se descartó el tubo de recolección. Se cambió la columna a un nuevo tubo de recolección y se procedió a secar la membrana por 3 min. a 8000rpm.

Por último se procedió a la elución, donde se colocó la columna en un tubo de 1.5ml y se agregó 60µl de Buffer AVE en el centro de la membrana. Se incubó a TA por 1 min y se centrifugó a toda velocidad por 1 min. En las muestras más complicadas el incubado a TA se prolongó a 5 min. para favorecer el rendimiento del eluato. Las extracciones fueron almacenadas a -20°C.



Figura 5. Representación gráfica del procedimiento de extracción de ácidos nucleicos usando el kit comercial QIAamp MinElute Virus Spin. Figura tomada y modificada de (Qiagen, 2010a).

III.4 AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA VIRAL

III.4.1 Cebadores

Para este estudio se utilizaron cuatro juegos de primers: tres de los cuales fueron empleados para la amplificación parcial del gen VP1 de Enterovirus y su posible tipificación, mientras que el restante juego de primers se utilizó para amplificar el extremo 5' y determinar así la presencia o ausencia de Enterovirus en los cultivos (Tabla 2). Estos juegos de primers son específicos para todos los Enterovirus, incluidos los poliovirus.

En primer lugar se utilizaron los primers para amplificar el extremo 5'UTR con el propósito de determinar el aislamiento de Enterovirus en el cultivo celular. En los casos que dieron positivo, se procedió a amplificar el gen VP1 para poder estudiar los Enterovirus no-polio circulantes en la comunidad. El gen VP1 inicia en el nucleótido en la posición 2484 y finaliza en la 3389 del genoma completo de Enterovirus. Debido a los primers empleados, la secuenciación de VP1 es parcial pero suficiente para la tipificación.

Tabla 2. Descripción de los primers empleados. Se indican las secuencias de nucleótidos en sentido 5' - 3', el gen al cual se pegaría y la posición de dicha hibridación, y el tamaño del producto de PCR generado con el uso de cada juego de primers. El primer forward es indicado con (+), y el primer reverse con (-). Secuencias tomadas de (Nix, Oberste & Pallansch, 2006).

Primer	Secuencia	Gen	Localización	Tamaño esperado (pb)
350(+)	GGCCCCTGAATGCGGCTAATCC	Ext. 5'	454-475	151
351(-)	GCGATTGTCACCATWAGCAGYCA	Ext. 5'	605-583	
224(+)	GCIATGYTIGGIACICAYRT	VP3	2206-2226	763
222(-)	CICCI GGIGGIAYRWACAT	VP1	2969-2951	
AN89(+)	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	VP1	2602-2627	375
AN88(-)	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	VP1	2977-2951	
AN232(+)	CCAGCACTGACAGCA	VP1	2602-2616	375
AN233(-)	TACTGGACCACCTGG	VP1	2977-2963	

Se utilizaron los códigos de ambigüedad estándar para nucleótidos:

I= inosina

N= G, A, T o C

R= A o G

Y= C o T

W= A o T

III.4.2 RT-PCR

El proceso de transcripción reversa (RT) y PCR se realizó en una reacción de “un solo paso” mediante el uso del kit comercial “QIAGEN OneStep RT-PCR kit”. Este kit contiene componentes optimizados que permiten un alto rendimiento del producto amplificado y de mayor pureza en una amplia gama de temperaturas de annealing (Qiagen, 2010b).

Para la formación del ADN complementario (ADNc) y la amplificación del mismo se utilizaron los juegos de primers específicos (Tabla 2). La concentración y volúmenes de los reactivos se muestran en la Tabla 3. La mezcla de reactivos se preparó en la mesada de mixes de la sala de pre-amplificación, y el agregado final de la muestra fue realizado en la sala de post-amplificación del LBM, previo a poner los tubos en el termociclador (Figura 6). Las condiciones de ciclado se mantuvieron en general (Tabla 4), variando los tiempos del ciclado y las temperaturas dependiendo de la dificultad de las muestras.

Para obtener el ADNc de las 177 muestras y amplificarlo se cumplió con el procedimiento descrito en el protocolo del kit comercial (Qiagen, 2010b). En primer lugar los reactivos se descongelaron, y se preparó el master mix agregando en cada tubo los volúmenes indicados en la Tabla 3. Para evitar errores de manipulación se preparó un 10% mayor al volumen total requerido para las reacciones. Se mezcló en el vortex, y se distribuyó el mix en cada tubo de amplificación en cantidades iguales de 45 μ l. Se agregó 5 μ l de muestra en los distintos tubos (un tubo para cada muestra), y se procedió al ciclado, donde el programa de ciclado se detalla en la Tabla 4. Para el caso del control negativo, se agregaron 5 μ l de agua y, en el caso del control positivo, se adicionaron 5 μ l de ARN de Coxsackievirus B4. La mezcla de enzimas se encuentra constituida por dos transcriptasas reversas, Omniscript y Sensiscript, y una Polimerasa, HotStarTaq ADN Polimerasa. Durante la transcripción reversa la Polimerasa se encuentra inactiva y no interfiere con el proceso, de modo que para su activación, se debe calentar a 95°C por 15 min.,

Tabla 3. Componentes de reacción para OneStep RT-PCR. En la tabla se indican los reactivos con sus respectivos volúmenes y concentración final por cada reacción (tubo).

Componentes	Volumen/reacción	Concentración final
Master mix		
Agua libre de RNAsa	29 μ l	-
5x QIAGEN OneStep RT-PCR buffer	10 μ l	1x
Mezcla de dNTPs	2 μ l	400 μ M de cada dNTP
Primer forward	1 μ l	0.6 μ M
Primer reverse	1 μ l	0.6 μ M
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme mix	2 μ l	-
Molde de ARN		
Muestra de ARN	5 μ l	1pg- 2pg/reacción
Volumen Total	50 μ l	-

al mismo tiempo que las transcriptasas reversas son inactivadas. Es importante que la activación inicial se realice una vez que la RT haya terminado. El buffer es fundamental ya que permite la transcripción reversa de manera eficiente y la amplificación específica.

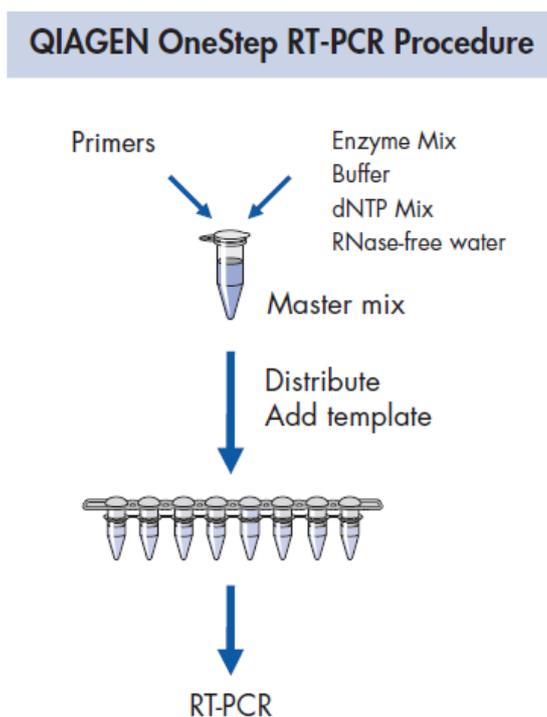


Figura 6. Esquema del procedimiento de preparación de la mezcla para la OneStep RT-PCR. Figura tomada de (Qiagen, 2010b).

Tabla 4. Condiciones de ciclado para las reacciones de PCR.

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	
Transcripción reversa	50°C	40 min.	
Paso inicial de activación de PCR	95°C	15 min.	
Desnaturalización	94°C	25 seg.	41 ciclos
Annealing	47-58°C	45 seg.	
Extensión	72°C	45 seg.	
Extensión final	72°C	10 min.	

III.4.3 RT- SeminestedPCR

En determinados casos, fue necesario realizar una “RT-seminested PCR” (RT-snPCR) debido a que los primers internos del segundo round poseen un extremo idéntico a los primers del primer round (Figura 7). De este modo, según la complejidad de las muestras, se hizo el RT-PCR y a continuación un segundo PCR con el producto de la primer amplificación, usando primers internos ha dicho producto.

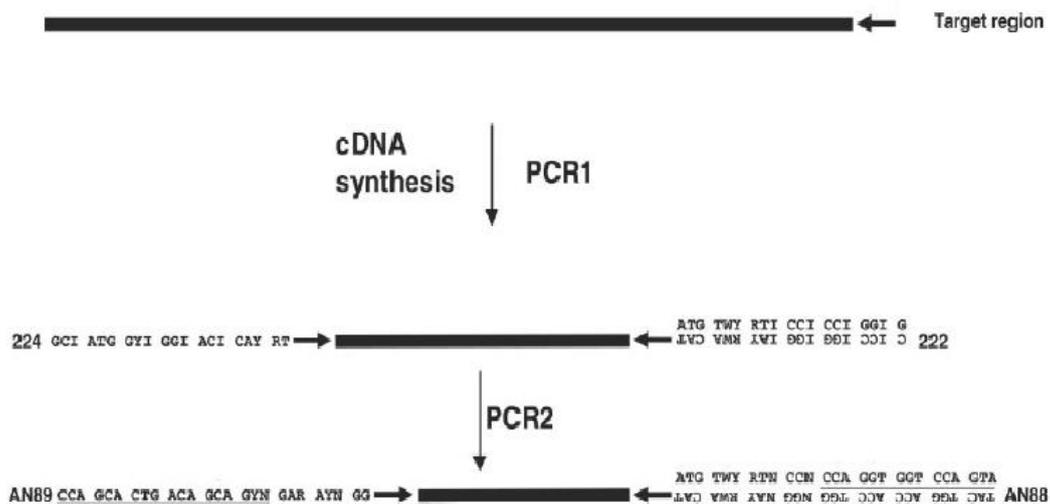


Figura 7. Representación de la secuencia de pasos en la RT-snPCR. Figura tomada y adaptada de (Nix, Oberste & Pallansch, 2006).

III.4.4 Visualización del amplicón

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (buffer de corrida). Los tamaños de banda esperados de los amplicones dependen del juego de primers utilizados y se encuentran descritos en la Tabla 2.

En cada pocillo del gel se sembraron 10µl del producto de PCR mezclado previamente con el buffer de carga 6X (azul de bromo fenol, glicerol, EDTA 0.5 M, pH 8, agua y buffer del PCR). Además de las muestras, fueron sembrados un control negativo y un control positivo de la misma forma, y un marcador de peso molecular en el primer pocillo de cada gel. La corrida fue realizada a 150 voltios durante 50 minutos aproximadamente, hasta alcanzar las tres cuartas partes del gel.

Por último, la visualización de las bandas se logró por la tinción del ARN con GelRed (agente que se une al ácido nucleico y se activa bajo luz UV), en el transiluminador y documentador de geles con luz UV.

III.5 SECUENCIACIÓN

Los productos amplificados fueron enviados a secuenciar al laboratorio Macrogen Corea en Corea del Sur. El secuenciador de dicha institución, utiliza el método de Sanger, y como primers fueron utilizados los mismos que para la obtención de los amplicones (Tabla 2).

III.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Los dendogramas obtenidos de la secuenciación fueron analizados y corregidos manualmente mediante el uso del programa Chromas lite, versión 2.1 (Technelysium Pty Ltd).

Como primer paso de la tipificación viral, se realizó una búsqueda de homología entre las secuencias obtenidas previamente con la base de datos del programa informático BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), específicamente, BLASTn (nucleotide). Se alinearon las secuencias problema con secuencias de cepas patrón y se sometieron al programa FindModel (En: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>) para identificar el modelo evolutivo óptimo para las secuencias de Enterovirus. El modelo GTR+G fue el seleccionado. Se estudiaron las diferencias nucleotídicas y aminoacídicas entre las secuencias.

Árboles filogenéticos de Máxima-Verosimilitud fueron construidos usando el programa Mega6. El soporte estadístico de los datos se estableció mediante bootstrap con 500 réplicas.

IV. RESULTADOS

IV.1 AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 5'

Se cultivaron 177 muestras de LCR que habían sido positivas para Enterovirus en un ensayo de amplificación de la región 5'UTR viral. Dado el escaso volumen de muestra se utilizó un solo tipo celular para el aislamiento viral (células RD). Se extrajeron los ácidos nucleicos del sobrenadante del cultivo y se realizó una RT-PCR utilizando los primers 350-351 (Figura 8). 49 muestras dieron positivas a 5', lo cual indica un porcentaje de recuperación viral del 27.6%.

Para la electroforesis en gel de agarosa, se colocaron en cada carril 10µl del producto de PCR (muestra con buffer de carga), un control positivo (CV-B4), un control negativo, y un marcador de peso molecular de 100pb. En este caso, el tamaño de banda esperado para el producto amplificado era de 151 pb, tal como está especificado en la Tabla 2.

De estas 49 muestras positivas, 29 presentaron una intensidad de banda fuerte, en cambio, las restantes 20 mostraron una intensidad de banda más tenue. A consecuencia de esto, las mismas fueron tratadas de distintas maneras posteriormente.

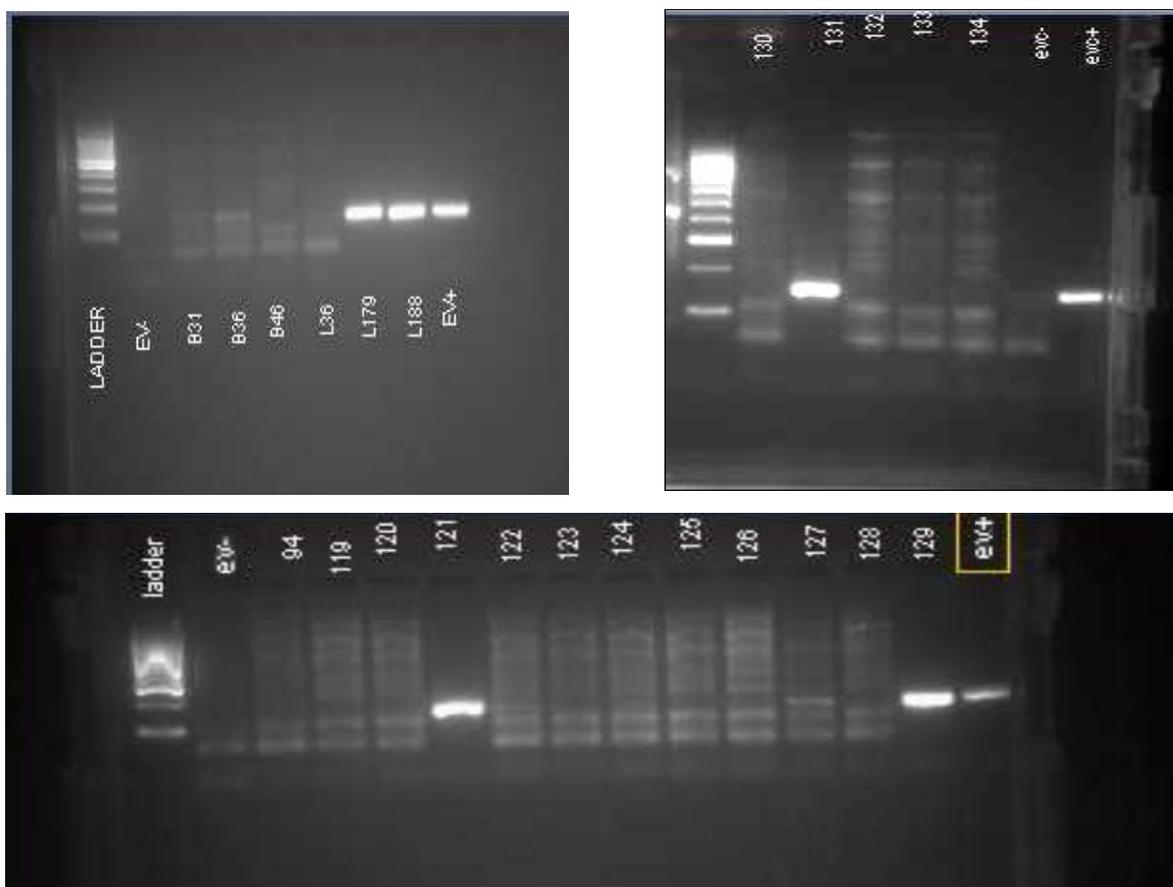


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la amplificación del extremo 5' de Enterovirus. En todos los casos, el primer carril corresponde al marcador del peso molecular de 100pb, los números corresponden a distintas muestras, los controles positivos están indicados con el signo ev+, mientras que los controles negativos con el signo ev-.

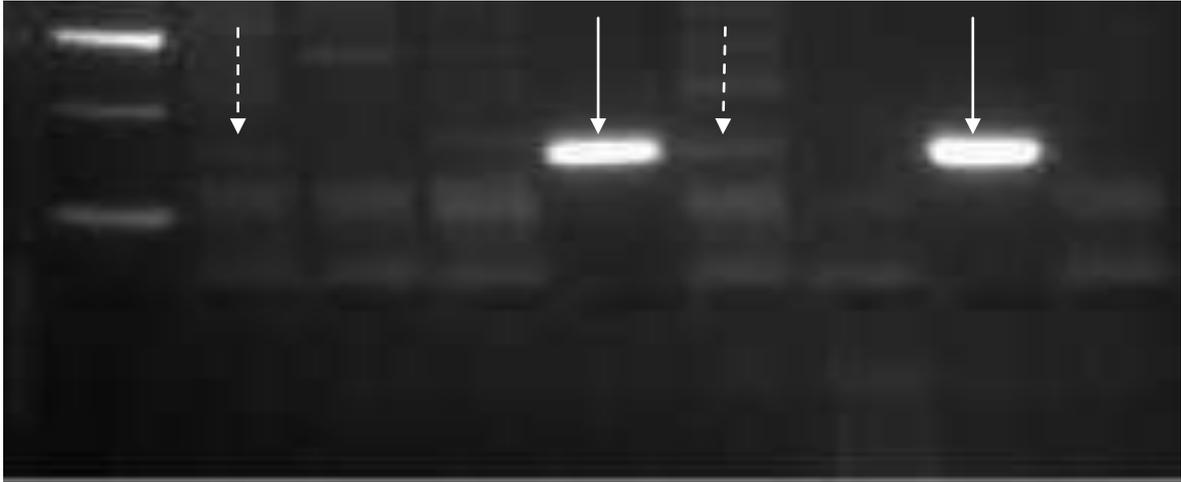


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR del extremo 5'. Con las flechas continuas (→), se indican las bandas positivas fuertes, mientras que con las flechas discontinuas (---▶), se indican las bandas positivas tenues.

IV.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN VP1

Una vez determinadas las muestras positivas a Enterovirus, se procedió a la amplificación del gen VP1. En el caso de las muestras que dieron bandas fuertes en la amplificación del ext-5', solo fue necesario el uso de dos pares de primers, el par 88-89 ó el 222-224. En cambio, para las muestras que dieron bandas tenues, fue necesaria la práctica de una RT-snPCR (Figura 7), en la cual además de utilizar los pares de primers 88-89 y 222-224, se manejó el par 232-233.

Primeramente, se trataron las bandas fuertes del ext-5', empleando los dos juegos de primers en un gradiente de temperaturas de annealing ($T_{\text{annealing}}$), de 48°C a 58°C, con el fin de optimizar el pegado.

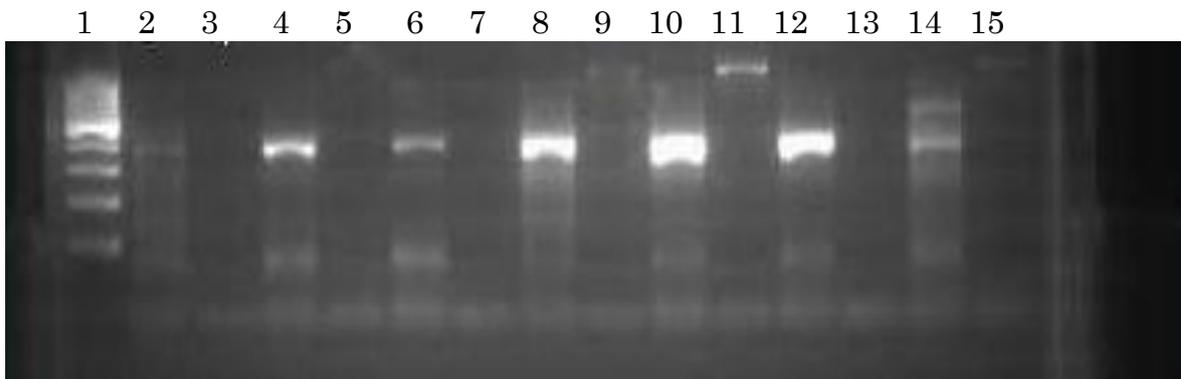


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR del gen VP1. Carriles: 1- Marcador de peso molecular de 100pb; 2, 4, 6- muestra 104 con primers 88-89 a 48°, 51.8°, 55.1°, respectivamente; 3, 5, 7- muestra 104 con primers 222-224 a 49.9°, 53.4°, 57°, respectivamente; 8,10,12- muestra 112 con primers 88-89 a 48°, 51.8°, 55.1°, respectivamente; 9,11,13- muestra 112 con primers 222-224 a 49.9°, 53.4°, 57°, respectivamente; 14- control positivo con primers 88-89 a 52.6°; 15- control positivo con primers 222-224 a 52.6°.



Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR del gen VP1. Carriles: 1- Marcador de peso molecular de 100pb; 2, 4, 6- muestra 176 con primer 88-89 a 49°, 52.6°, 56.1°, respectivamente; 3, 5, 7- muestra 176 con primers 222-224 a 50.9°, 54.3°, 58°, respectivamente; 8,10,12- muestra 177 con primers 88-89 a 49°, 52.6°, 56.1°, respectivamente; 9,11,13- muestra 177 con primers 222-224 a 50.9°, 54.3°, 58°, respectivamente; 14- control positivo con primers 88-89 a 52.6°; 15- control positivo con primers 222-224 a 52.6°.

Una vez determinado el rango de temperaturas óptimas para la amplificación del gen VP1 con los juegos de primers 88-89 y 222-224, 49°-56.1°C y 50.9°-54.3°C, respectivamente, los productos de PCR fueron secuenciados. En ciertas muestras, la amplificación se logró concretar con tan solo un juego de primers, y en otras, con dos; en el último caso, los amplicones generados a partir de ambos juegos de primers, fueron secuenciados. Todas las muestras que dieron positivas con bandas fuertes en el ext-5', también se lograron amplificar para el gen VP1, obteniéndose un mejor rendimiento con los primers 88-89.

Luego se procedió a amplificar el gen VP1 de aquellas muestras que dieron positivas con bandas tenues en el ext-5'. En este caso, se recurrió a los tres juegos de primers que amplifican dicho gen. Debido a la complejidad de las muestras, fue necesario realizar una RT-snPCR. Si bien las temperaturas óptimas para el annealing de los primers fue determinado previamente, se realizaron gradientes de temperaturas también en este paso con el fin de asegurar el correcto pegado entre primers y molde, y la temperatura óptima a la cual se pegarían.

En paralelo, se realizaron dos RT-snPCR en la cual variaban los primers utilizados en el primer y segundo round, y las $T^{\circ}_{\text{annealing}}$.

Tabla 5. Condiciones de las RT-snPCR, en las que se detallan los primers y las temperaturas de annealing utilizadas en el 1° y 2° round. Los tiempos de ciclado son los mismos descritos en la Tabla 4.

	1° round		2° round	
	Primers	T° annealing	Primers	T° annealing
1° RT-snPCR	222-224	50°	88-89	53°
2° RT-snPCR	88-89	47°- 58°	232-233	53°

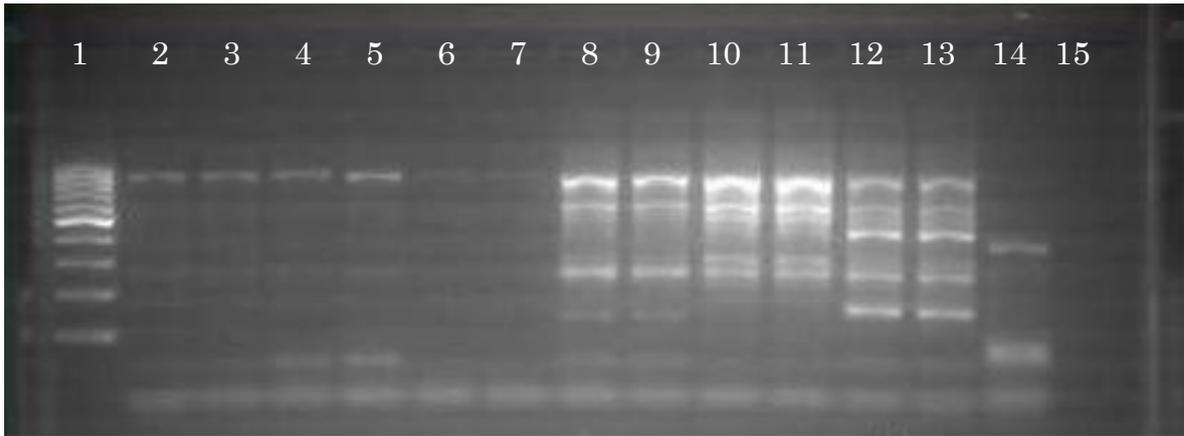


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos del 1^{er} RT-snPCR del gen VP1 utilizando los primers 222-224 (1^o round). Carriles: 1- marcador de peso molecular; 2- control positivo; 3 al 14- muestras; 15- control negativo.

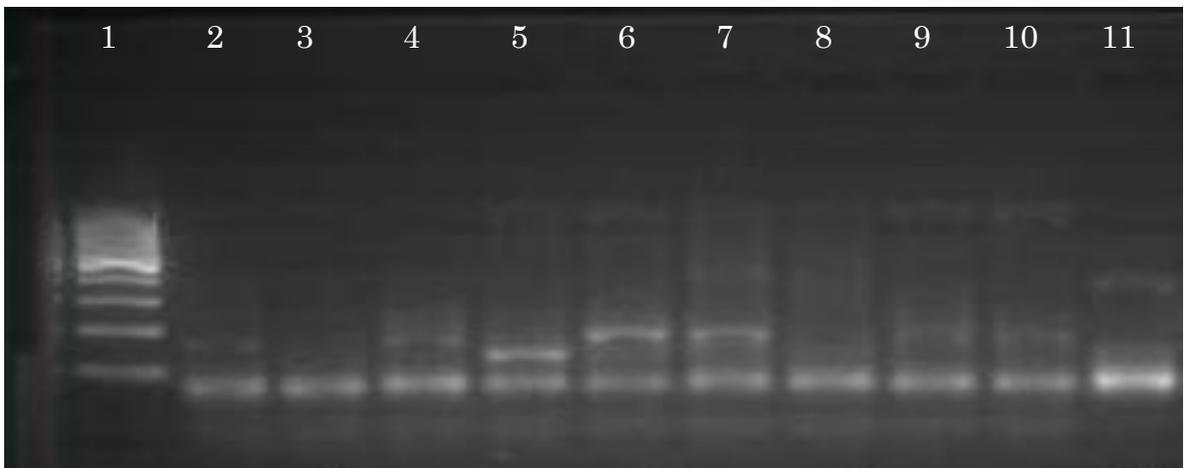


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos del 1^{er} RT-snPCR del gen VP1 utilizando los primers 88-89 (2^o round). Carriles: 1- marcador de peso molecular; 2 al 10- muestras; 11- control positivo.

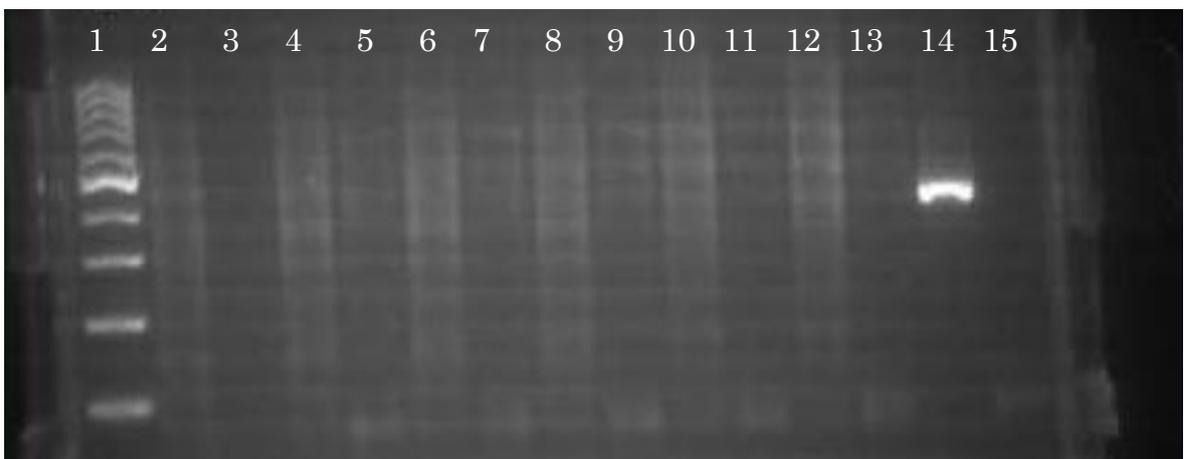


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de 2^o RT-snPCR del gen VP1 utilizando los primers 88-89 (1^o round). Carriles: 1- marcador de peso molecular; 2 al 9- muestras 127, 135, 137, 139 a 47.8° y 53.5°, respectivamente; 10 y 11- muestra 160 a 48.5° y 55°; 12 y 13- muestra B31 a 48.5° y 55°; 14- control positivo a 55°; 15- control negativo a 55°.

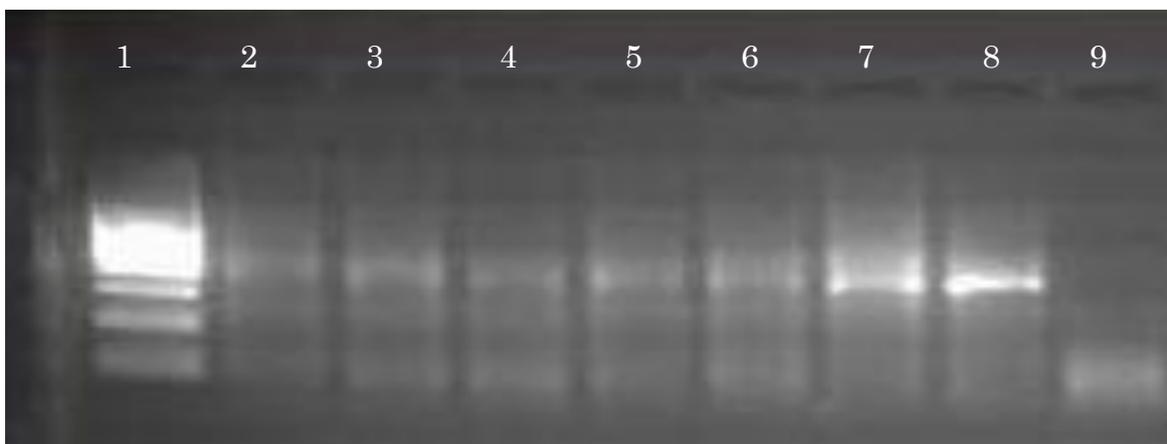


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de 2° RT-snPCR del gen VP1 utilizando los primers 232-233 (2° round). Carriles: 1- marcador de peso molecular; 2 al 4- muestras a 53.5°; 5 a 7- muestras a 54°; 8- control positivo a 54°; 9- control negativo 54°.

A diferencia de las bandas fuertes en el ext-5' que también dieron positivas en VP1, en el caso de las bandas tenues, no todas las muestras se pudieron amplificar. De las 20 muestras que se partieron en esta etapa, fueron amplificadas 13 pero todas con bandas muy tenues, de modo que tan solo tres (las más fuertes) fueron secuenciadas. Todas las muestras fueron secuenciadas en ambos sentidos con los primers utilizados en las RT-PCR.

IV.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Al momento de analizar los cromatogramas obtenidos, se observó demasiado ruido en algunos casos en los que se empleó el juego de primers 222-224, al punto de ser descartados. Finalmente, se realizó el análisis filogenético con 18 muestras problema.

Se efectuó la búsqueda de homología en la base de datos del GenBank mediante el programa BLASTn. De esta indagación, todas las muestras presentaron mayor porcentaje de identidad con 9 serotipos distintos, todos pertenecientes a la especie Enterovirus B. En la Tabla 6 se especifican las muestras y las fechas de obtención de las mismas, junto con los genotipos correspondientes.

De manera de conocer las relaciones filogenéticas de los Enterovirus no-polio que circulan en la comunidad, las secuencias problema fueron alineadas con las secuencias patrón correspondientes (The Picornavirus Pages, 2014). Las secuencias fueron alineadas empleando el programa MEGA 6, mediante el método clustalW. Debido al alto grado de variaciones que presentan los enterovirus en la región VP1, la alineación se realizó a través de la secuencia de aminoácidos en lugar de la secuencia nucleotídica.

Finalmente, fueron creados los árboles filogenéticos de Máxima Verosimilitud bajo el modelo GTR+G, cuyo soporte estadístico se estableció mediante bootstrap con 500 réplicas (Figura 16).

Las secuencias parciales del gen codificante para VP1 obtenidas por RT-PCR (previamente aisladas en cultivo celular), a partir de muestras de LCR de niños, se agrupan con un fuerte soporte estadístico con distintas cepas patrón de la especie Enterovirus B.

Tabla 6. Especie y serotipos identificados, y detalle de la fecha de obtención de las muestras correspondiente a cada serotipo.

Muestras	Fecha de aislación	Serotipo	Especie
URU63	06/01/2012	CV-B1	Enterovirus B
URU68	29/06/2013	CV-B1	Enterovirus B
URU188	31/01/2012	CV-B3	Enterovirus B
URU7	17/11/2012	CV-B5	Enterovirus B
URU29	03/11/2012	CV-B5	Enterovirus B
URU45	27/12/2012	CV-B5	Enterovirus B
URU115	26/03/2012	E-3	Enterovirus B
URU112	16/04/2012	E-5	Enterovirus B
URU62	06/01/2012	E-6	Enterovirus B
URU67	29/02/2012	E-6	Enterovirus B
URU131	26/01/2012	E-6	Enterovirus B
URU59	25/04/2013	E-11	Enterovirus B
URU104	17/05/2013	E-11	Enterovirus B
URU121	28/05/2014	E-11	Enterovirus B
URU147	26/04/2013	E-11	Enterovirus B
URU179	22/07/2013	E-11	Enterovirus B
URU16	09/11/2012	E-13	Enterovirus B
URU27	15/11/1012	E-18	Enterovirus B

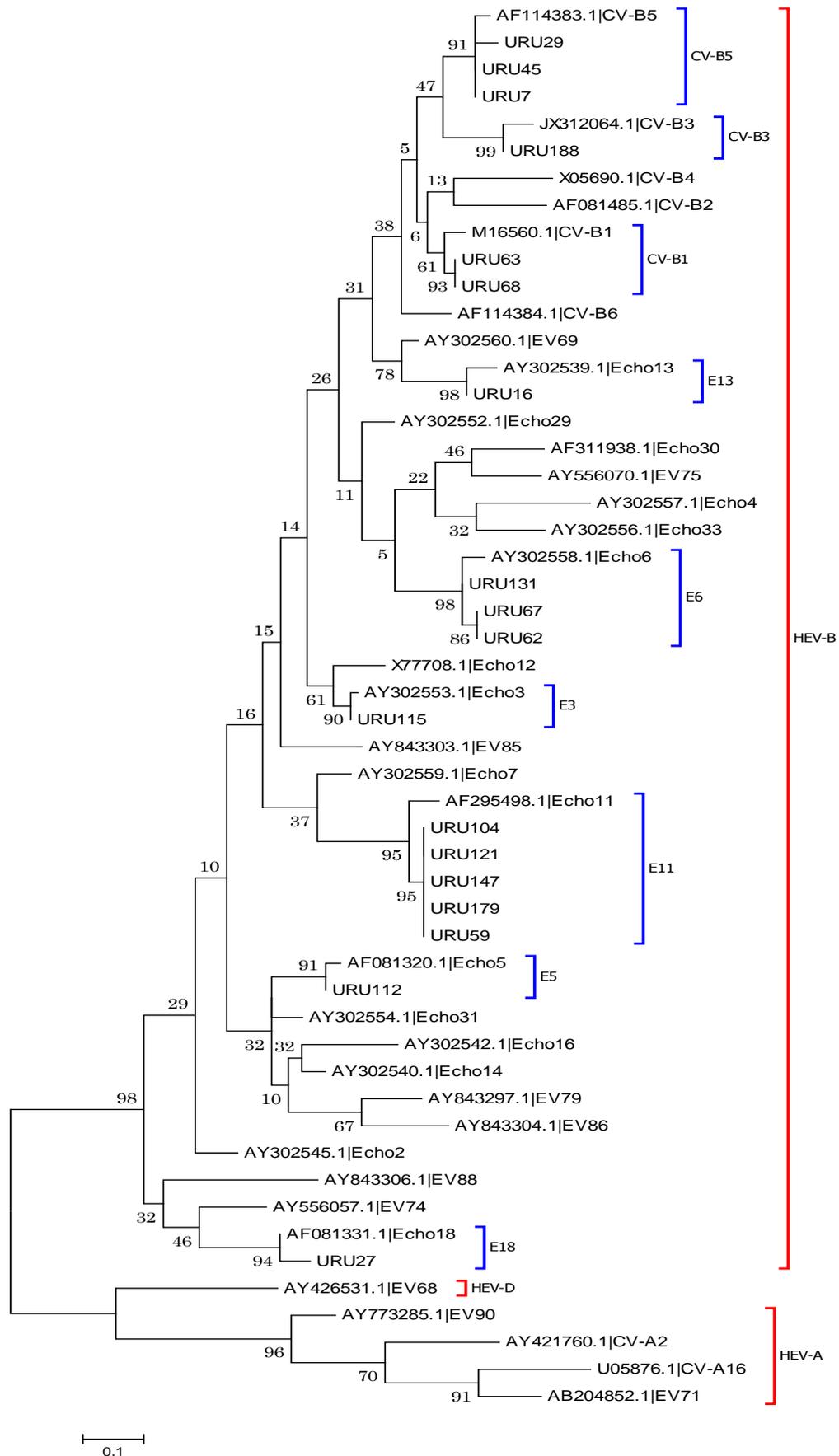


Figura 16. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud, utilizando las secuencias de aa del gen VP1 de los Enterovirus detectados en muestras de LCR en niños y aquellas disponibles en la NCBI. En las cepas patrón se indica el n° de acceso y el serotipo correspondiente; en las muestras se indica el país de procedencia y un n° arbitrario. La barra en la parte inferior denota la distancia filogenética.

En este estudio, que comprende el tratado de 177 muestras, se pudo determinar la circulación en la comunidad de al menos 9 cepas distintas de enterovirus no-polio en un rango de 5 años. Las muestras de LCR se tomaron a partir de niños que se atendieron en el CHPR, en los cuales se desconocía las causas de sus síntomas y en los cuales se podía presumir la presencia de enterovirus como agente etiológico.

En las Figuras 17 y 18, se puede observar el análisis de datos en cuanto al año en el cual fue recibida la muestra, el serotipo correspondiente al virus identificado y edad del paciente.

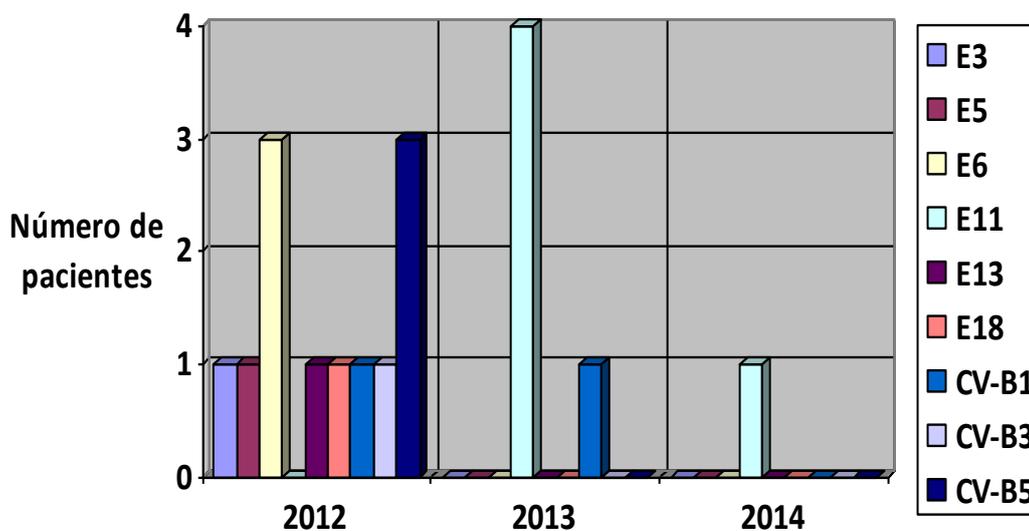


Figura 17. Representación de la cantidad de cepas aisladas por año. Los años 2010 y 2011 no se representan ya que no se logró la amplificación de ninguna muestra.

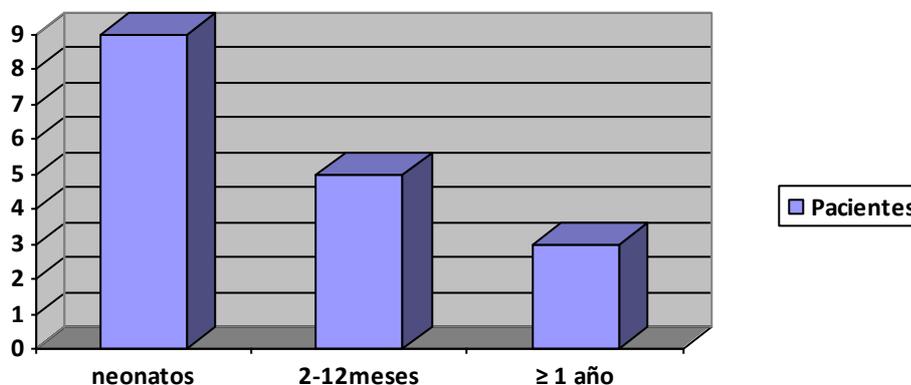


Figura 18. Representación gráfica de la proporción de pacientes infectados por enterovirus no-polio según el rango etario.

V. DISCUSIÓN

Los Enterovirus se encuentran entre los agentes más comunes de las infecciones humanas y afectan a millones de personas en todo el mundo cada año. Si bien la mayoría de sus infecciones son asintomáticas, estos virus son causantes de un amplio espectro de enfermedades, desde simples sarpullidos y gripe común, pleurodinia, pericarditis y miocarditis, hasta meningoencefalitis, poliomielitis, conjuntivitis hemorrágica aguda, infecciones severas a neonatos e infecciones crónicas en personas inmunocomprometidas (McMinn & Van Tu, 2013).

Los primeros síntomas de la meningitis aséptica pueden ser fiebre y dolor de cabeza y por lo tanto se buscan Enterovirus en pacientes con estos síntomas (Lee & Davies, 2007).

Los síntomas presentados por los niños infectados de este trabajo eran muy variados, desde fiebre sin foco, sobre todo en niños menores a un año de vida, hasta niños con fiebre y cefalea e incluso posible meningitis, donde un paciente (URU131) se encontraba en CTI al momento de extraer la muestra. En todos los casos, las infecciones no llegaron a ser fatales.

La mayoría de los pacientes en los cuales se pudo caracterizar los Enterovirus infectantes tenían menos de 1 mes de vida (Figura 18) y sus síntomas eran tan solo fiebre sin foco. En cambio, aquellos pacientes con mayor edad, eran los que presentaban mayores síntomas (fiebre, cefalea) y complicaciones como meningitis. Conjuntamente, no se observó diferencia en cuanto al sexo de los pacientes, donde el 50% eran de sexo masculino y el restante 50% eran de sexo femenino.

La razón de este estudio fue determinar las cepas que circulan en la región y determinar la ausencia o presencia del Enterovirus 71, que se ha ido propagando por todo el mundo y que hasta el día de hoy no se han confirmado casos de Enterovirus 71 en el Uruguay.

Mediante la amplificación parcial del gen codificante para la proteína estructural VP1, se realizó la tipificación de Enterovirus no-polio circulantes en la comunidad causantes de neurovirosis en niños uruguayos.

La reconstrucción filogenética se realizó con las secuencias obtenidas y un conjunto de secuencias adquiridas de la base de datos para realizar el análisis con un total de 52 secuencias. Entre las secuencias patrón se incluían genotipos de las especies Enterovirus A, Enterovirus B y Enterovirus D. En el árbol filogenético obtenido se pueden apreciar dos clados, con un soporte estadístico de 96% (Figura 16).

El alineamiento y análisis de las 52 secuencias se realizó tanto con la secuencia de aminoácidos como la de nucleótidos, obteniendo resultados similares. Debido a que la tasa de mutaciones y recombinaciones en Enterovirus es muy alta, es que se explica la gran variabilidad dentro de este género.

Al analizar las secuencias problema se observó un patrón conservado en ambos extremos y una región central hipervariable. Si bien las mutaciones eran numerosas a nivel de nucleótidos, donde la frecuencia de transiciones fue mayor a las transversiones, en su gran mayoría se trataron de mutaciones sinónimas. En el caso de las mutaciones no sinónimas, la mayoría de los

cambios se produjo entre aminoácidos intercambiables. Sin embargo, en el caso de E11, donde se identificaron la mayor cantidad de muestras, se observaron en todas las cepas aisladas cambios de aminoácidos respecto a la cepa patrón tales como, L89R y T43V, que sugieren estudios más profundos en cuanto a si estas variaciones en la regiones antigénicas son significativas o no para la virulencia del virus.

En el árbol filogenético (Figura 16), el primer clado (superior), se encuentra formado solamente por genotipos de la especie de Enterovirus B. En esta agrupación se encuentran todas las cepas aisladas en el laboratorio, las cuales se agrupan con un fuerte soporte estadístico con algunas de las cepas patrón de HEV-B. Las muestras se agrupan con los patrones de CV-B5, CV-B3, CV-B1, E13, E6, E3, E11, E5 y E18, permitiendo la genotipificación de los aislados.

Es conveniente subrayar que todos los Coxsackievirus se agrupan de forma monofilética, ya que los virus Coxsackie de la especie B son un grupo monofilético en la región de la cápside, posiblemente por el uso compartido del receptor de coxsackievirus-adenovirus, no empleado por los restantes genotipos de la especie (Oberste, 2008).

En el segundo clado, se encuentran los genotipos de las especies HEV-A y HEV-D. En este agrupamiento se encuentran los genotipos EV-D68, EV71 y CV-A16, donde el EV-D68 ha aumentado su actividad en el 2014 a nivel mundial y ha sido causa de serios problemas respiratorios, en especial, en niños y adolescentes, y ha generado complicaciones severas en personas con asma (Piralla et al, 2014); mientras que el EV71 y CV-A16 son la principal causa de la enfermedad mano-pie-boca, y en el caso del primero, puede generar importantes complicaciones a nivel neurológico (Ooi, 2010).

Cabe destacar que el árbol filogenético obtenido, es congruente con la distribución obtenida por el grupo de estudio de Picornavirus, en el EUROPIE 2014 por los investigadores Knowles et al (2014), donde HEV-B se encuentra en un clado y HEV-A y HEV-D en el otro dentro del género de Enterovirus.

A partir del análisis de las secuencias del gen de VP1, se estableció que al menos 9 fueron los genotipos que circularon en la comunidad y que además fueron causantes o presuntos causantes (al momento de tomar la muestra) de problemas a nivel del SN en niños que se atendieron en el CHPR. Los Enterovirus no-polio identificados en el período de 2010-2014 fueron: CVB1, CVB3, CVB5, E3, E5, E6, E11, E13 y E18.

Teniendo en cuenta las fechas de obtención de las muestras (Tabla 6), la mayoría de las mismas fueron tomadas en la época del año esperada (verano-otoño), exceptuando dos obtenidas en los meses de junio y julio. En la Figura 17 se observa que diferentes genotipos circularon en diferentes años, donde CV-B1 (2012-2013) y E11 (2013-2014) fueron los únicos que se aislaron en años consecutivos. El 2012 fue el año en el que se detectaron una mayor diversidad de genotipos de Enterovirus, donde se detectaron 8 de los 9 totales.

Entre las cepas tipificadas, se encuentran algunas de las identificadas con mayor frecuencia como E6, E11, E13, CV-B3 y CV-B5, entre las cuales E13 y CV-B5 suelen presentar patrones epidémicos (Khetsuriani et al, 2006).

El E13 ha tomado cierta relevancia a partir del 2001, ya que previo a esa fecha era una cepa raramente detectada, sin embargo, en junio de 2001 se produjo en EE.UU un importante aumento de la actividad de este virus, a tal punto que fue la cepa predominante asociada a meningitis aséptica (Kirschke et al, 2002). Los aislados en Asia, Europa, EE.UU y Oceanía detectados en el período 2000-2002, eran muy similares en la secuencia de VP1 (95%), sin embargo, diferían con aquellos documentados antes del año 2000, sugiriendo importantes cambios en la tendencia de las enfermedades causadas e incitando a una vigilancia continua (Mullins et al, 2004). Incluso en el 2003 se produjo el primer brote de meningitis aséptica en Brasil cuyo agente etiológico fue el E13 (Kmetzsch et al, 2006). A pesar de esto, URU16 identificado como E13 no produjo complicaciones en el único paciente afectado por este virus.

Por otra parte, CV-B5 que se asocia con epidemias de meningitis, enfermedades neurológicas, y causa de cardiomiopatías y diabetes (Rezig et al, 2011), se aisló en pacientes con menos de un mes de vida (URU7 y URU45) con poca sintomatología (común en niños con poca edad de vida), pero también se aisló de un niño de 4 años (URU29), que al momento de extraer la muestra se presumía que tenía meningitis.

El genotipo que se aisló en una mayor cantidad de veces fue el E11. Este virus se asocia a cuadros febriles inespecíficos, infecciones entéricas, respiratorias y neurológicas, sobre todo meningitis aséptica y encefalitis, donde los niños menores a un año son los más afectados y en neonatos puede producir su muerte súbita y sepsis. Todos los casos en los que se detectó esta cepa, se caracterizaron por presentar un cuadro de fiebre sin foco y todos tenían menos de dos meses de vida. Sin bien en los neonatos, la tasa de mortalidad causada por Enterovirus es relevante (Tebruegge & Curtis, 2009), en estos casos no hubo muerte de los pacientes.

Si bien en los países limítrofes a Uruguay como Argentina y Brasil se han reportado casos de EV71, el hecho de que ninguna muestra se agrupe con los genotipos EV71, o CV-A16 o EV-D68, es un consuelo en la salud en Uruguay debido a las serias complicaciones que acarrearán estos virus en la salud de la comunidad.

VI. CONCLUSIONES

- La mayoría de los niños afectados por la infección por Enterovirus son menores de 1 año, con una predominancia de los menores de 2 meses.
- No se pudieron identificar brotes en los años estudiados, sino que la infección por Enterovirus se presentó en forma esporádica, estacional, con un aumento de casos en los meses de verano-otoño.
- Sólo dos genotipos de Enterovirus se repitieron en años consecutivos, brindando información acerca de la variedad de Enterovirus que circulan en nuestro país.
- A partir del análisis filogenético de las secuencias génicas se pudo determinar que todas las cepas aisladas a partir de niños internados en CHPR pertenecen a los Enterovirus Humanos B (HEV-B). Estas cepas aisladas no provocaron casos fatales.
- Los análisis de filogenia permitieron determinar que al día de hoy, no se han detectado cepas de Enterovirus 71 en la comunidad. Si bien se han reportado casos en la capital de Argentina y el norte de Brasil, nuestro país sigue exento de casos de infección por este patógeno.

VII. AGRADECIMIENTOS

A la Dra. PhD. Laura García por darme la oportunidad de realizar la pasantía de grado en el Laboratorio de Biología Molecular del CHPR, por los conocimientos aportados para mi formación profesional y su preocupación a nivel personal.

A las compañeras de laboratorio, Betina, Laura y María Noel, que desde el primer momento me hicieron sentir uno más en el grupo de trabajo, por el apoyo y las sugerencias dadas.

A mis compañeros, amigos y mi novia que durante el transcurso de la carrera me brindaron su apoyo y confianza en los momentos más importantes.

Especialmente a mi familia, que gracias a ellos este sueño se pudo cumplir, por su apoyo incondicional, afecto, contención y confianza, a quienes con mucho cariño les dedico este trabajo.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abzug, M.J. (2004). Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates. *Paediatr Drugs*, *6(1)*: 1-10.

Akhmadishina, L.V., Eremeeva, T.P., Trotsenko, O.E., Ivanova, O.E., Mikhailov, M.I., Lukashev, A.N. (2014). Seroepidemiology and molecular epidemiology of enterovirus 71 in Russia. *PLoS One*, *9(5)*: e97404. doi: 10.1371/journal.pone.0097404.

American Academy of Pediatrics. (2009). Red Book. Atlas of Pediatric Infectious Diseases (pp. 76-77). Bs As, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.

Baltimore, D., Franklin, R.M. (1963). A new ribonucleic acid polymerase appearing after Mengovirus infection of L-cells. *J. Biol. Chem*, *238*: 3395-3400.

Balvay, L., Soto, R., Ricci, E.P., Decimo, D., Ohlmann, T. (2009). Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim. Biophys. Acta*, *1789(9-10)*: 542-57. doi: 10.1016/j.bbagr.2009.07.005.

Bek, E.J., McMinn, P.C. (2010). Recent advances in research on human enterovirus 71. *Future Virology*, *5(4)*: 453-68.

Belazarian, L., Lorenzo, M.E, Pace, N.C., Sweeney, S.M., Wiss, K.M. (2009). Enfermedades virales exantematosas. En Wolff, Goldsmith, Katz, Gilchrest, Paller & Leffell (Ed.), *Fitzpatrick's Dermatología en Medicina General* (pp. 1867-1869). Bs As, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.

Belov, G.A., Nair, V., Hansen, B.T., Hoyt, F.H., Fischer, E.R., Ehrenfeld, E. (2012). Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J. Virol*, *86(1)*: 302-12. doi: 10.1128/JVI.05937-11.

Bible, J.M., Iturriza-Gomara, M., Megson, B., Brown, D., Pantelidis, P., Earl, P., Bendig, J., Tong, C.Y. (2008). Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006. *J. Clin. Microbiol*, *46(10)*: 3192-200. doi: 10.1128/JCM.00628-08.

Blomqvist, S., Savolainen, C., Raman L., Roivainen, M., & Hovi, T. (2002). Human Rhinovirus 87 and Enterovirus 68 represent a unique serotype with Rhinovirus and Enterovirus features. *J. Clin. Microbiol*, *40(11)*: 4218-4223. doi: 10.1128/JCM.40.11.4218-4223.2002.

Bostina, M., Levy, H., Filman, D.J., Hogle, J.M. (2011). Poliovirus RNA is released from the capsid near a twofold symmetry axis. *J. Virol*, *85(2)*: 776-783.

- Brown, B.**, Oberste, M.S., Maher, K., Pallansch, M.A. (2003). Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol*, 77(16): 8973-84.
- Castro, C.M.**, Cruz, A.C., Silva, E.E., Gomez, M.deL. (2005). Molecular and seroepidemiologic studies of Enterovirus 71 infection in the State of Para, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 47(2): 65-71.
- Centers for Disease Control and Preventions (CDC).** (2010). Nonpolio enterovirus and human parechovirus surveillance - United States, 2006-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 59(48):1577-80.
- Chong, P.**, Liu, C.C., Chow, Y.H., Chou, A.H., Klein, M. (2014). Review of enterovirus 71 vaccines. *Clin Infect Dis. Oct* 28.
- Chow, M.**, Newman, J.F., Filman, D., Hogle, J.M., Rowlands, D.J. & Brown, F. (1987). Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 327: 482-486.
- Cisterna, D.M.**, Palacios, G., Rivero, K., Girard, D., Lema, C., Freire, M.C. (2007). Epidemiology of enterovirus associated with neurologic diseases. *Medicina (B Aires)*, 67(2): 113-9.
- Coppieters, K.T.**, Boettler, T., von Herrath, M. (2012). Virus infections in Type 1 Diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(1): a007732.
- Dagan, R.**, Jenista, J.A., Menegus, M.A. (1988). Association of clinical presentation, laboratory findings, and virus serotypes with the presence of meningitis in hospitalized infants with enterovirus infection. *J. Pediatr*, 113 (6): 975-8.
- De Palma, A.M.**, Vliegen, I., De Clercq, E., Neyts, J. (2008). Selective inhibitors of picornavirus replication. *Med. Res. Rev*, 28(6):823-84. doi: 10.1002/med.20125.
- Diaz, O.**, Sarmiento, L., Baj, A., Cabrera, E., & Toniolo, A. (2011). Echovirus Epidemics, Autoimmunity, and Type 1 Diabetes. En Wagner, D. (Ed.), *Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*. Intech. doi: 10.5772/22167.
- Fernández, E.**, Rodríguez, C. (2013). Inmunología de la Poliomiélitis: vacunas, problemas para la prevención/erradicación e intervenciones del futuro. *Rev. Esp. Salud Pública*, 87: 443-454.

Fortuny, C., Pumarola, T. (2006). Infecciones por enterovirus: virus Coxsackie, Echovirus y nuevos enterovirus. En V. Ausina & S. Moreno (Ed), *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciones y Microbiología Clínica* (pp. 893-923). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana S.A.

Fry, E.E., Stuart, D. (2010). Virion structure. En E. Ehrenfeld, E. Domingo & R.P. Roos (Ed.), *The Picornaviruses* (pp. 59-71). Washington D.C, USA: ASM Press.

Gromeier, M., Wimer, E. & Gorbalenya, A.E. (1999). Genetics, pathogenesis and evolution of Picornaviruses. En E. Domingo, R. Webster & J. Holland (Ed.), *Origin and Evolution of Viruses* (pp. 287-331). Londres, UK: Academic Press.

Hogle, J.M. (2002). Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu Rev. Microbiol*, 56: 677-702.

International Committee on Taxonomy of Viruses. (2014a). ICTV Taxonomy History for Picornaviridae. Recuperado de http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20130620&taxa_name=Picornaviridae

International Committee on Taxonomy of Viruses. (2014b). ICTV Taxonomy History for Rhinovirus. Recuperado de http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=19790089&taxa_name=Rhinovirus

International Union of Microbiological Societies (IUMS). (2012) Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (pp. 855-861). USA: Elsevier Inc.

Jiang, P., Liu, Y., Ma, H.C., Paul, A.V. & Wimmer, E. (2014). Picornavirus morphogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 78(3):418-37. doi: 10.1128/MMBR.00012-14.

Jubelt, B., Lipton, H. L. (2014). Enterovirus/Picornavirus infections. *Handbook of Clinical Neurology*, 123: 379- 416. doi: 10.1016/B978-0-444-53488-0.00018-3.

Kennett, M.L., Birch, C.J., Lewis, F.A., Yung, A.P., Locarnini, S.A., Gust, I.D. (1974). Enterovirus type 71 infection in Melbourne. *Bull World Health Organ*, 51(6): 609-15.

Khetsuriani, N., Lamonte-Fowlkes, A., Oberst, S., Pallansch, M.A., Centers for Disease Control and Prevention. (2006). Enterovirus surveillance—United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ*, 55(8): 1-20.

Kirschke, D.L., Jones, T.F., Buckingham, S.C., Craig, A.S., Schaffner, W. (2002). Outbreak of aseptic meningitis associated with echovirus 13. *Pediatr.Infect. Dis. J*, 21(11): 1034-8.

Knowles, N.J., Delwart, E., Gorbalenya, A.E., Hovi, T., Hyypiä, T., King, A.M., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T., Zell, R. (2014). Picornaviridae: 26 Genera, 46 Species and Growing... Recuperado de www.picornastudygroup.com

Kmetzsch, C.I., Balkie, E.M., Monteiro, A., Costa, E.V., dos Santos, G.P., da Silva, E.E. (2006). Echovirus 13 Aseptic Meningitis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 12(8): 1289-91.

Knowles, N.J., Hovi, T., King, A.M., Stanway, G. (2010). Overview of Taxonomy. En E. Ehrenfeld, E. Domingo & R.P. Roos (Ed.), *The Picornaviruses* (pp. 19-25). Washington D.C, USA: ASM Press.

Kumar, A., Shukla, D., Kumar, R., Idris, M.Z., Misra, U.K. & Dhole, T.N. (2012). Molecular Epidemiological Study of Enteroviruses Associated with Encephalitis in Children from India. *J. Clin. Microbiol*, 50(11): 3509-3512. doi: 10.1128/JCM.01483-12.

Laine, P., Savolainen, C., Blomqvist, S., & Hovi, T. (2005). Phylogenetic analysis of human rhinovirus capsid protein VP1 and 2A protease coding sequences confirms shared genus-like relationships with human enteroviruses. *Journal of General Virology*, 86, 697-706. doi: 10.1099/vir.0.80445-0.

Lee, B.E., Davies, H.D. (2007). Aseptic meningitis. *Curr. Opin. Infect Dis*, 20(3): 272-7.

Marier, R., Rodríguez, W., Chloupek, R.J., Brandt, C.D., Kim, H.W., Baltimore, R.S, Parker, C.L., Artenstein, M.S. (1975). Coxsackievirus B5 infection and aseptic meningitis in neonates and children. *Am. J. Dis. Child*, 129 (3): 321-5.

McIntyre, C.L., Knowles, N.J., Simmonds, P. (2013). Proposal for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. *J. Gen. Virol*, 94 (Pt8): 1791-806. doi: 10.1099/vir.0.053686-0.

McMinn, P.C. (2002). An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol. Rev*, 26(1): 91-107.

McMinn, P.C., Van Tu, P. (2013). Enteroviruses infections that cause Central Nervous System disease (including Poliomyelitis). En A.J. Magill, E.T Ryan, D.

Hill & T. Solomon (Ed.), *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (pp. 349-353). Elsevier Inc.

Merovitz, L., Demers, A.M., Newby, D., McDonald, J. (2000). Enterovirus 71 infections at a Canadian center. *Pediatr. Infect. Dis. J*, 19(8): 755-7.

Mullins, J.A., Khetsuriani, N., Nix, W.A., Oberste, M.S., LaMonte, A., Kilpatrick, D.R., Dunn, J., Langer, J., McMinn, P., Huang, Q.S., Grimwood, K., Huang, C., Pallansch, M.A. (2004). Emergence of echovirus type 13 as a prominent enterovirus. *Clin. Infect. Dis*, 38: 70-7.

Nair, S., Leung K.C., Rawlinson W.D., Naing Z., Craig M.E. (2010). Enterovirus infection induces cytokine and chemokine expression in insulin-producing cells. *J. Med. Virol*, 82 (11): 1950-7. doi: 10.1002/jmv.21900.

Ninove, L., Nougairede, A., Gazin, C., Zandotti, C., Drancourt, M., de Lamballerie, X., Charrel, R.N. (2011). Comparative detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid: GeneXpert system vs. real-time RT-PCR assay. *Clin Microbiol Infect*, 17(12):1890-4. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03487.x.

Nishimura, Y., Shimizu, H. (2012). Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol*, 3: 105. Doi: 10.3389/fmicb.2012.00105.

Nix, W. A., Oberste, M. S., & Pallansch, M. A. (2006). Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all Enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J. Clin. Microbiol*, 44(8): 2698-2704. doi: 10.1128/JCM.00542-06.

Oberste, M.S. (2008). Comparative genomics of the Coxsackie B viruses and related viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 323: 33-47.

Oberste, M.S., Gerber, S.I. (2014). Enteroviruses and Parechoviruses: Echoviruses, Coxsackieviruses, and others. En R.A Kaslow, L.R. Stanberry & J.W. LeDuc (Ed.), *Viral infections on humans: epidemiology and control* (pp. 225- 245). New York, USA: Springer.

Oberste, M.S., Maher, K., Kilpatrick, D.R. & Pallansch, M.A. (1999a). Molecular Evolution of the Human Enteroviruses: Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *Journal of Virology*, 73(3): 1941-1948.

Oberste, M.S., Maher, K., Kilpatrick, D.R., Flemister M.R., Brown B.A & Pallansch, M.A. (1999b). Typing of Human Enteroviruses by partial sequencing of VP1. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5): 1288-1293.

Ooi, M.H., Wong, S.C., Lewthwaite, P., Cardoso, M.J., Solomon, T. (2010). Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol*, *9*(11): 1097-105. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70209-X.

Palmenberg, A., Neubauer, D., Skern, T. (2010). Genome organization and encoded proteins. En E. Ehrenfeld, E. Domingo & R.P. Roos (Ed.), *The Picornaviruses* (pp. 3-14). Washington D.C, USA: ASM Press.

Pérez, C.M., Anderson, M.S., Robinson, C.C., McFarland, E.J., Nix, W.A., Pallansch, M.A., Oberste, M.S., Glodé, M.P. (2007). Outbreak of neurologic enterovirus type 71 disease: a diagnostic challenge. *Clin. Infect. Dis*, *45* (8): 950-7.

Piralla, A., Girello, A., Grignani, M., Gozalo-Margüello, M., Marchi, A., Marseglia, G., Baldanti, F. (2014). Phylogenetic characterization of enterovirus 68 strains in patients with respiratory syndromes in Italy. *J. Med. Virol*, *86*(9):1590-3. doi: 10.1002/jmv.23821.

Plevka, P., Perera, R., Cardoso, J., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G. (2012). Crystal structure of Human Enterovirus 71. *Science*, *336*: 1274.

Qiagen. (2010a). QIAamp MinElute Virus Spin Handbook. 3^o ed.

Qiagen. (2010b). QIAGEN OneStep RT-PCR kit Handbook.

Racaniello, V.R. (2007). Picornaviridae: The viruses and their replication. En Knipe, D. M. & Howley, P. M. (Ed.), *Field's Virology, volumen 1* (pp.795-830). Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.

Racaniello, V.R. (2006). One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*, *344*: 9-16.

Rezig, D., Fares, W., Seghier, M., Yahia, A.B., Touzi, H., Triki, H. (2011). Update on molecular characterization of coxsackievirus B5 strains. *J. Med. Virol*, *83*(7): 1247-54. doi: 10.1002/jmv.22084.

Romero, J.R. (2014). Viral meningitis and aseptic meningitis syndrome. En W.M Scheld, C.M. Marra & R.J Withley (Ed.), *Infections of the Central Nervous System* (pp. 66-72). Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health.

Romero, R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana. 3^a Ed. (pp. 395-402). D.F., Mexico: Editorial Médica Panamericana S.A.

Rossmann, M.G. (1989). The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J. Biol. Chem*, *264*: 14587-14590.

Rotbart, H.A., Webster, A.D. Pleconaril Treatment Registry Group. (2001). Treatment of potentially life-threatening enterovirus infections with pleconaril. *Clin. Infect. Dis*, 32(2):228-35.

Rueckert, R., Wimmer, E. (1984). Systematic nomenclature of Picornavirus proteins. *Journal of Virology*, 50 (3): 957-959.

Sánchez, M.L., Martí, A.F. (1998). Enterovirus: características y diagnóstico. *Control Calidad Seimc. Virología/Microbiología Molecular*.

Schmid, M., Wimmer, E. (1994). IRES- controlled protein synthesis and genome replication of poliovirus. *Arch. Virol. Suppl*, 9: 279-89.

Shaw, J., Welch, T.R., Milstone, A.M. (2014). The role of syndromic surveillance in directing the public health response to the Enterovirus D68 epidemic. *JAMA Pediatr*, 168(11): 981-982. doi: 10.1001/jamapediatrics.2014.2628.

Shors, T. (2009). Virus: estudio molecular con orientación clínica (pp. 280-300). Bs. As., Argentina: Ed. Médica Panamericana S.A.

Solomon, T., Lewthwaite, P., Perera, D., Cardoso, M.J., McMinn, P., Ooi, M.H. (2010). Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis*, 10(11): 778-90. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70194-8.

Song, J.H., Choi, H.J., Song, H.H., Hong, E.H., Lee, B.R., Oh, S.R., Choi, K., Yeo, S.G., Lee, Y.P., Cho, S., Ko, H.J. (2014). Antiviral activity of ginsenosides against coxsackievirus B3, enterovirus 71, and human rhinovirus 3. *J. Ginseng Res*, 38(3):173-9. doi: 10.1016/j.jgr.2014.04.003.

Stock, I. (2014a). Human rhinovirus diseases: epidemiology, treatment and prevention. *Med Monatsschr Pharm*, 37(2): 44-53.

Stock, I. (2014b). Hand, foot and mouth disease: more than a harmless "childhood disease". *Med. Monatsschr Pharm.*, 37(1): 4-10; quiz 11-2.

Sutcliffe, C.G., Moss, W.J. (2012). Nonpolio Enterovirus mucocutaneous infections. En A.J. Magill, E.T Ryan, D. Hill & T. Solomon (Ed.), *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (pp. 262-265). Elsevier Inc.

Tapparel, C., Siegrist F., Petty T.J., Kaiser L. (2013). Picornavirus and Enterovirus diversity with associated human diseases. *Infection, genetics and evolution*. 14: 282-293. doi: 10.1016/j.meegid.2012.10.016.

Tebruegge, M., Curtis, N. (2009). Enterovirus infections in neonates. *Semin. Fetal Neonatal Med*, 14 (4): 222-7. doi: 10.1016/j.siny.2009.02.002.

Teng, S., Zhao, S. Y., Wei, Y., Shao, Q. M., Jiang, M. Y., Cui, D. W., & Xie, G. L. (2013). Observation on virus shedding periods of enterovirus-71 and coxsackievirus A 16 monitored by nucleic acids determination in stool samples of children with hand, foot and mouth disease. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 51(10): 787- 792.

Teng, Z., Tan, X.J., Shao, J.J., Zhang, Y., Kuang, X.Z., Zhang, X., Xu, W.B. (2010). Epidemiology and etiology of hand-footh-and-mouth disease in Shanghai, 2009. *Bing Du Xue Bao*, 26(6):437-42.

The Picornavirus Pages. (2014). Prototype Strains. Recuperado de: <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/prototypes/prototypes.htm>.

Thibaut, H.J., De Palma, A.M., Neyts, J. (2012). Combating enterovirus replication: state-of-the-art on antiviral research. *Biochem Pharmacol*, 83(2):185-92. doi: 10.1016/j.bcp.2011.08.016.

Trallero, G., Avellón, A. (2003). Importancia del diagnostico de los Echovirus desde el punto de vista epidemiológico. Circulación de Echovirus 11 en los últimos años en España. *Control Calidad Seimc. Virología/Microbiología Molecular*.

Tuthill, T.J., Bubeck, D., Rowlands, D.J., Hogle, J.M. (2006). Characterization of Early Steps in the Poliovirus Infection Process: Receptor-Decorated Liposomes Induce Conversion of the Virus to Membrane-Anchored Entry-Intermediate Particles. *Journal of Virology*, 80: 172-180.

Voevodin, A.F., Marx, P.A. (2009). Simian Virology (pp. 237-246). Iowa,USA: Blackwell Publishing.

White, D.O., Fenner, F.J. (1994). Picornaviridae. En *Medical Virology* (pp. 381-405). CA, USA: Academy Press.

Zhu, F.C., Liang, Z.L., Li, X.L., Ge, H.M., Meng, F.Y., Mao, Q.Y., Zhang, Y.T., Hu, Y.M., Zhang, Z.Y., Li, J.X., Gao, F., Chen, Q.H., Zhu, Q.Y., Chu, K., Wu, X., Yao, X., Guo, H.J., Chen, X.Q., Liu, P., Dong, Y.Y., Li, F.X., Shen, X.L., Wang, J.Z. (2014). Immunogenicity and safety of an enterovirus 71 vaccine in healthy Chinese children and infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial. *Lancet*, 381(9871): 1037-45.