

## **XI.-RINOVIRUS**

Dra. Belsy Acosta Herrera.

### **INTRODUCCION:**

Los Rinovirus humanos son la causa de un tercio a la mitad de todas las infecciones agudas del tracto respiratorio aproximadamente y son más comunes en climas templados y durante los meses más fríos del año. La alta incidencia de la infección esta relacionada con la existencia de un gran número de serotipos. Alrededor de 100 serotipos diferentes han sido clasificados y a causa de mutaciones al azar y de la selección inmune natural ocurre la emergencia de nuevos serotipos.

Son virus que pertenecen a la familia *Picoarnviridae*, género Rinovirus. Son virus no envueltos, de forma esférica y con un genoma de ARN de simple cadena de polaridad positiva. Como grupo pueden ser distinguidos por su crecimiento óptimo a temperaturas reducidas (33°C) y su sensibilidad a la inactivación a pH bajo, típicamente entre 3.0 - 4.5 (1,2) La infección se disemina de persona a persona por contacto directo; a través de secreciones respiratorias contaminadas con el virus y a través del contacto con objetos ambientales o superficies contaminadas con dichas secreciones.

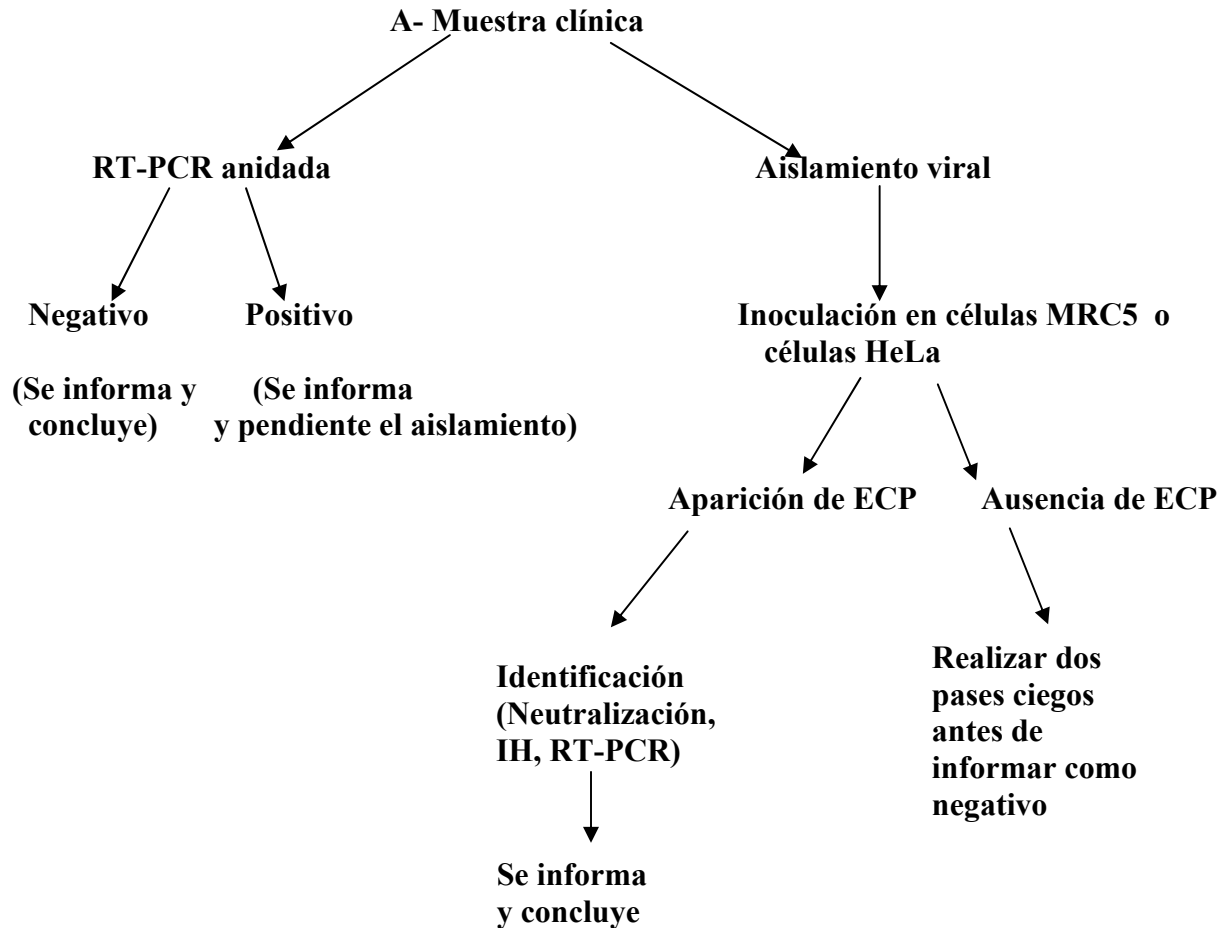
El periodo de incubación comienza con la eliminación de virus en las secreciones nasales y puede ser de 1 a 4 días. (3)

La enfermedad típica que produce la infección por Rinovirus es el resfriado común y se caracteriza clínicamente por la presencia de estornudo, obstrucción y secreción nasal, dolor faríngeo y otros síntomas como cefalea, tos y malestar general. En algunos casos pueden estar involucrados en otitis media aguda, sinusitis e infección del tracto respiratorio inferior. (1,3)

### **REFERENCIAS:**

- 1) **Couch, R. B.** 1996. Rhinoviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 713-734
- 2) **Melnick, J. L.** 1996. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 655-712
- 3) **Monto, A. S.** Studies of the community and family: acute respiratory illness and infection. *Epidemiol. Rev.* 1994;16:351-373

## FLUJO DE TRABAJO



### I.-DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO:

Estos virus son trabajados en un laboratorio básico con Nivel II de bioseguridad.

Muestras: El virus se encuentra solamente en las secreciones respiratorias, principalmente en la nariz, por lo que es necesario colectar tanta secreción nasal como sea posible. El aspirado o el lavado nasal constituyen métodos excelentes para la toma de estas muestras.

Las secreciones nasofaríngeas obtenidas en el primer o segundo día de la enfermedad constituyen la muestra ideal. (Ver acápite de toma de muestras)

Si el testaje se demora más de 24 horas, las muestras deben ser conservadas a -70°C. (1)

### **I.1.-AISLAMIENTO VIRAL:**

Debido a que existen múltiples serotipos y a que no poseen un antígeno común, la detección de virus es la base del diagnóstico y el cultivo viral es el método establecido.

Son virus que no se multiplican en animales de experimentación ni huevos embrionados.

El sistema empleado para aislar los Rinovirus es el cultivo celular.

El uso de más de un tipo de cultivo celular se requiere para el aislamiento óptimo de estos virus.

El uso de inóculos grandes aumenta el rango de recobrado. El cultivo de células de fibroblastos de embrión humano y la línea celular HeLa son los más empleados.

#### **Equipos**

- Microscopio invertido.
- Refrigerador de 4 °C
- Congelador (-20°C , -70°C)
- Incubadora de 33°C
- Gabinete de Seguridad Clase II

#### **Materiales: y Reactivos**

- Micropipetas (200 µL, 1000 µL)
- Puntas (200 µL, 1000 µL)
- Tubos plásticos de cultivo de células
- Gradillas de tubos
- Cultivo de células de fibroblastos de pulmón embrionario humano, no infectadas.
- Cultivo de células HeLa no infectadas.
- Rotuladores
- Bata
- Guantes desechables
- Medio de mantenimiento MEM
- Medio RPMI
- Solución salina de Hanks balanceada
- Antibióticos : Penicilina (100 U/mL) y Estreptomicina (100 µg/mL) en el medio de mantenimiento, Gentamicina 50 µg/mL, anfotericín B 2.5 µg/mL y neomicina 1 µg/mL.

- Cloruro de Magnesio 30 mM,
- Glutamina
- Bicarbonato de sodio
- Hidróxido de Sodio
- Solución salina tamponada con fosfato (SSTF) 0,01M pH 7,2).
- Buffer HEPES

## **I.2.-AISLAMIENTO EN CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE PULMÓN EMBRIONARIO HUMANO**

### **I.2.1.PROCEDIMIENTO:**

1. Decantar el medio de crecimiento e inocular por duplicado con 200  $\mu$ L de la muestra, los tubos de cultivo con monocapa confluyente de células de fibroblastos de pulmón embrionario humano (MRC5).
2. Añadir 1 mL de medio de mantenimiento.
3. Incubar los tubos a una temperatura de 33 °C.
4. Examinar todos los tubos al día siguiente para la detección de cualquier contaminación, efecto tóxico o fluctuaciones de pH.
5. Realizar un monitoreo diario con microscopio invertido para la detección de efecto citopático que debe aparecer a partir del día 3 de la inoculación. Los cambios en las células infectadas están relacionados con los inducidos por los Enterovirus. Las células se redondean, el núcleo se vuelve picnótico y más tarde se fragmenta (Karyorexis). Las células se convierten en granular o vacuoladas y se desprenden de la superficie del cristal o plástico. Característicamente, el redondeamiento se observa en grupos de células, las cuales son realmente microplacas. Esto progresa hasta afectar un mayor número de células en el curso de varios días. Cuando el crecimiento es lento o el inóculo viral es de bajo título, el efecto citopático puede no ser observado.
6. Cambiar el medio tantas veces como sea necesario para evitar un efecto tóxico y mantener las células saludables. Es necesario realizar las manipulaciones con mucho cuidado para evitar contaminaciones cruzadas entre los tubos.
7. Mantener en incubación el cultivo al menos durante 2 semanas. Si se observa progreso del efecto citopatogénico o por el contrario se ve declinar, el medio es colectado y se pasa a tubos frescos de cultivo. Es necesario realizar los pases para aumentar el título viral y

proceder a realizar pruebas de identificación. No se dará un resultado negativo hasta tener una siembra primaria y dos pases ciegos.

La identificación presuntiva de un aislamiento de Rinovirus puede ser hecha sobre la base del tipo de cultivo de tejidos que soporta el crecimiento, el patrón de efecto citopático y la demostración de la labilidad a pH 3 (1).

### **I.3.-AISLAMIENTO EN CÉLULAS HELA**

#### **I.3.1.-PROCEDIMIENTO:**

El proceder es similar al descrito para el aislamiento en fibroblastos de pulmón embrionario humano.

1. Diluir las muestras 1:3 en medio RPMI que contiene 200 µg de neomicina, 200 U de estreptomicina por mL.
2. Incubarlas durante 2 horas a 4°C .
3. Inocular 200 µL de cada dilución de la muestra-RPMI en cada uno de los dos tubos de cultivo e incubados a 33 °C durante 2 horas.
4. Realizar un lavado de los tubos con solución salina de Hanks balanceada.
5. Adicionar 1.5 mL de medio de mantenimiento (MEM)], con 1% de suero de ternera fetal inactivado con calor, 10 mg de neomicina por ml, 1% aminoácidos no esenciales, 0.03 M de MgCl<sub>2</sub>, y 1% de glutamina.
6. Incubar los tubos a 33°C durante 10 días y observarlos diariamente para detectar el efecto citopático. Las células se redondean, el núcleo se vuelve picnótico y más tarde se fragmenta (Karyorexis). Las células se convierten en granular o vacuoladas y se desprenden de la superficie del cristal o plástico. Una muestra positiva puede mostrar efecto citopático alrededor del cuarto día.
7. Pasar los cultivos sospechosos para aumentar el título viral antes de proceder a la identificación. Se deben dar hasta dos pases ciegos antes de informar un resultado negativo. (2,3)

#### **Referencias:**

1) Couch, R. B. 1996. Rhinoviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 713-734

2) Melnick, J. L. 1996. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 655-712

3) Monto, A. S. Studies of the community and family: acute respiratory illness and infection. *Epidemiol. Rev.* 1994;16:351-373

#### **I.4.-IDENTIFICACIÓN DE VIRUS AISLADOS:**

La identificación completa y la serotipificación de estos virus resulta una prueba engorrosa. El aislamiento puede ser identificado mostrando las propiedades físicas y biológicas de los Rinovirus.

##### **I.4.1.-Efecto citopático y sensibilidad a la temperatura.**

La presencia de un efecto citopático característico observado por un investigador de experiencia y que no corresponda al de un Adenovirus, o un virus Respiratorio Sincitial, pero si al de un Picoarnvirus y además que no se desarrolle a una temperatura de 37°C es sugestivo de un Rinovirus.

##### **I.4.2.-Resistencia a solventes lipídicos.**

Existen múltiples protocolos para realizar esta prueba entre los que se encuentra el siguiente:

1. Mezclar 1 mL del sobrenadante del cultivo infectado con 0.1 mL de cloroformo.
2. Agitar fuertemente y centrifugar.
3. Tratar una segunda muestra de manera similar pero sin añadir el cloroformo.
4. Titular ambas muestras empleando diluciones seriadas en base 10 y realizar el cálculo de la infectividad.
5. Realizar la prueba por duplicado para cada dilución. La prueba debe llevarse a cabo en paralelo empleando otros virus como los Herpesvirus y los Poliovirus como controles negativo y positivo respectivamente.

##### **I.4.3.-Sensibilidad a ácidos débiles.**

1. Adicionar 0.2 mL del sobrenadante del cultivo a un tubo que contenga 1.8 mL de buffer HEPES a pH 3 y otros 0.2 mL a un tubo con igual cantidad de buffer HEPES a pH 7 y mantener a 4°C durante 1 hora.
2. Adicionar hidróxido de sodio al tubo con pH ácido hasta ajustarlo a 7 y proceder a calcular la infectividad del virus en ambos tubos.

Si el aislamiento no conocido es un Rinovirus, el título infectivo se reducirá. Un Enterovirus y un Rinovirus conocido deben ser empleados como controles de la prueba. La prueba de sensibilidad

de los Rinovirus a pH ácido resulta positiva si el virus se inactiva a pH 3 y simultáneamente muestra efecto citopático característico a pH 7. (1)

#### **I.4.4.-Serotipificación**

Esta prueba requiere que el laboratorio posea un panel de sueros bien caracterizados.

#### **Referencias:**

1) Johnston S L., Tyrrell D. A. Rhinovirus. En : Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, eds. **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections.** 7 ed. Washington : American Public Health Association, 1995; 553-562

## **II.-DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO:**

Los anticuerpos contra estos virus son encontrados en la mayoría de los sueros humanos, pero el título no varía cuando ocurre la infección por Rinovirus y ellos son de insignificante valor diagnóstico.(1,2,3)

### **II.1-Prueba de neutralización en tubos:**

Esta es una prueba de gran valor que puede ser aplicada a cualquier Rinovirus aislado. Además puede ser empleada para medir la actividad de los anticuerpos específicos contra estos virus. El ensayo puede realizarse en cualquiera de los sistemas de cultivo celular empleados para el aislamiento.

#### **Procedimiento:**

- 1 Se emplean sueros de la fase aguda y convaleciente.
- 2 Inactivar los sueros a 56 °C durante 30 minutos .
- 3 Realizar diluciones seriadas (desde 1/2 hasta 1/128) en un volumen de 0.5 mL de SSTF.
  - Mezclar las diluciones de los sueros con 0.5 ml de un pool de virus previamente titulado (10 TCID<sub>50</sub> en 0.1 mL).
  - Incubar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente.
  - Añadir 0.2 ml de la mezcla a cada uno de los dos tubos de cultivo para cada dilución. Debe emplearse una punta para cada mezcla.
  - Titular el virus en paralelo.
  - Inocular la concentración más alta del suero con igual volumen de SSTF para control de la toxicidad celular.
  - Incubar los tubos de cultivo a 33°C y observarlos diariamente para detectar la presencia de efecto citopático a una dilución determinada del suero.

La dilución más alta del suero que muestre neutralización completa (ausencia de efecto citopático) es considerada el título del suero. Una diferencia de 4 diluciones entre el título del suero de la fase convaleciente con respecto al título del suero de la fase aguda; indica infección con un virus relacionado al empleado en la prueba. (Ver neutralización en acápite anteriores).

El efecto citopático también puede ser detectado por lectura del pH del medio de cultivo (prueba de inhibición metabólica). La destrucción de las células infectadas trae consigo un cambio de pH que ocasiona que el indicador del medio de cultivo cambie de rojo púrpura a naranja y posteriormente a amarillo. Esta prueba no es muy usada porque requiere un control muy cuidadoso de las células, el medio y las condiciones de incubación.

### **REFERENCIAS:**

- 1) Couch, R. B. 1996. Rhinoviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 713-734
- 2) Melnick, J. L. 1996. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 655-712
- 3) Johnston S L., Tyrrell D. A. Rhinovirus. En : Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, eds. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 7 ed. Washington : American Public Health Association, 1995; 553-562

## **III.-DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.**

Los métodos de diagnóstico convencional para los Rinovirus dependen casi exclusivamente de los métodos de cultivo celular. La poca sensibilidad del cultivo celular y la utilidad limitada de los métodos serológicos para la serotipificación, son entre otras razones las que han motivado el desarrollo de métodos moleculares para la identificación de Rinovirus y estas herramientas ofrecen interesantes perspectivas en el diagnóstico de infecciones respiratorias virales comunes. (1,2)

### **III.1.-RT-PCR PARA RINOVIRUS**

El desarrollo de un ensayo de Reverso Transcripción –Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) para la detección de ARN de Rinovirus es complicado debido a la estrecha homología existente entre el genoma de los Rinovirus y los Enterovirus en la región 5' no codificante que es altamente conservada, región que es utilizada para el diseño de cebadores en la mayoría de los



ensayos de RT-PCR. Steininger C, et.al, 2000, desarrollaron un ensayo de nested-RT-PCR rápido y sensible para la detección específica de Rinovirus en muestras de aspirado nasofaríngeo tomadas de pacientes con infección aguda del tracto respiratorio. (3)

#### **Equipos:**

- Horno de 80°C
- Transiluminador de luz ultravioleta
- Termociclador (ADN Thermal Cycler)
- Cámara y fuente de electroforesis
- Gabinete de seguridad Clase II

#### **Materiales y Reactivos:**

- Muestras de aspirado nasofaríngeo.
- ARN viral (previamente extraído)
- Juego de pipetas (10µL, 20µL, 200µL, 1000µL)
- Puntas con filtros estériles y horneados.
- Microtubos de centrifuga (500µL, 1.7mL), estériles y horneados.
- Inhibidor de ARNsa
- Agua libre de ARNsa
- Kit para la extracción de ARN viral (Qiagen)
- Buffer EZ (5× buffer Gene Amp Kit)
- Mn(OAc)<sub>2</sub> (solución 25 mM)
- MgCl<sub>2</sub> (solución 25 mM)
- *Taq*-Gold ADN polymerase (5 U/µL; 250 U of AmpliTaq Gold ADN polymerase)
- Deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dUTP)
- rTth ADN polimerasa (2.5 U/µL [Gene Amp kit])
- AmpErase UNG (1 U/µL)
- H<sub>2</sub>O bidestilada estéril
- Colorante de corrida : 6 X.
- SDS (BDH) 0,5%.
- Glicerol (BDH) 50%.

-EDTA (BDH) 10 mM.

-Azul de Bromofenol (BDH) 0,1%.

-Agua bidestilada c.s.p. 5 mL.

- T.B.E. (Tris-ácido bórico) 100 mM EDTA 2,5 mM
- Marcador de peso molecular
- Agarosa NuSieve al 3%
- Bromuro de etidio 10 mg/mL
- Juego de cebadores:

-Cebadores para el primer paso de la PCR que amplifica un fragmento de 106 pares de bases (pb):

Positivo: 5'-CCC CTG AAT G(CT)G GCT AAC CT-3'

Negativo: 5'-CGG ACA CCC AAA GTA GT(CT) GGT C-3'

-Para la PCR anidada se emplean cebadores que amplifican un fragmento de 93 pb .

Positivo: 5'-GAA TG(CT) GGC TAA CCT TAA (AC)CC-3'

Negativo: 5'-CAA AGT AGT (CT)GG TCC C (AG)T CC-3'.

### III.1.2.- Extracción de ARN viral.

- 1 Adicionar 1  $\mu$ L de inhibidor de ARNsa (Boehringer GmbH, Mannheim, Germany) a una concentración final de 0.01 U/ $\mu$ L
- 2 El ARN viral es extraído del sobrenadante del cultivo celular y de aspirados nasofaríngeos empleando un estuche para la extracción de ARN viral (Qiagen, Hilden, Germany).

### III.1.3.-Ensayo de RT:

- Se toma una alícuota (10  $\mu$ L) del ARN extraído y se adiciona a una mezcla de reacción que consiste en:
- 10  $\mu$ L de buffer EZ (5X buffer [Gene Amp Kit; Perkin-Elmer/Cetus Corp., Norwalk, Conn.])
- 4  $\mu$ L de Mn(OAc)<sub>2</sub> (solución 25 mM )
- 8  $\mu$ L de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dUTP)
- 25 pmol de cada cebador

positivo: 5'-CCC CTG AAT G(CT)G GCT AAC CT-3'

negativo: 5'-CGG ACA CCC AAA GTA GT(CT) GGT C-3'

- 2  $\mu\text{L}$  de rTth ADN polimerasa (2.5 U/ $\mu\text{L}$ [Gene Amp kit; Perkin-Elmer/Cetus])
  - 0.25  $\mu\text{L}$  de AmpErase UNG (1 U/ $\mu\text{L}$ ; catalog no. N808-0068; Perkin-Elmer, Branchburg, New Jersey)
  - 15  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril
  - volumen final de 50  $\mu\text{L}$ .
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

Ciclos	Temperatura	Tiempo(minutos)
RT	60°C	30 min
PCR x 50 ciclos	94°C	20 s'
	60°C	30 s'
	72°C	9 s'
Final	72°C	8 s'

### III.2.-PCR anidada

El segundo paso de amplificación se desarrolla tomando:

- 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla de la RT-PCR
- 5  $\mu\text{L}$  de buffer EZ (10 $\times$  buffer; Perkin-Elmer/Cetus)
- 4  $\mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub> (solución 25 mM)
- 8  $\mu\text{L}$  de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dUTP)
- 25 pmol de cada cebador

Sense: 5'-GAA TG(CT) GGC TAA CCT TAA (AC)CC-3'

Reverse: 5'-CAA AGT AGT (CT)GG TCC C (AG)T CC-3'

- 0.2  $\mu\text{L}$  de *Taq*-Gold ADN polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ; 250 U of AmpliTaq Gold ADN polymerase; Perkin-Elmer/Cetus)
  - 29  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O bidestilada estéril
  - volumen final de 50  $\mu\text{L}$ .
- Esta mezcla de reacción es incubada en un equipo termociclador bajo las siguientes condiciones:

<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
RT	95°C	10 min
PCR x 45 ciclos	94°C	15 s'
	60°C	30 s'
	72°C	8 s'
Final	72°C	5 min

Cada ensayo de PCR debe incluir al menos un control positivo y varios controles negativos intercalados entre las muestras clínicas que van a ser testadas.

#### **IV.-ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:**

Para la detección del producto amplificado se aplica en un gel de agarosa NuSieve al 3% (FMC Bioproducts, Rockland, Maine), teñido con 0.5 µg de bromuro de etidio por ml, 10 µl del producto de la última reacción de amplificación, a los cuales se le añadieron 4 µl del colorante de corrida (descrito previamente). La corrida se realiza a 90 volts durante 1 hora.

Las bandas son visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta. Resultarán positivas aquellas muestras en la que se amplifique un fragmento de 93 pares de bases.

#### **REFERENCIAS:**

- 1) Couch, R. B. 1996. Rhinoviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 713-734
- 2) Filipowicz E .Diagnostic methods for detection of respiratory ARN viruses. *Acta Microbiol Pol* 2002;51(1):13-21.
- 3) Steininger C, Stephan W. Aberle, Popow-Kraupp T. Early Detection of Acute Rhinovirus Infections by a Rapid Reverse Transcription-PCR Assay *J. Clin. Microbiol.* January 2001, p. 129-133, Vol. 39, No. 1