

UNIVERSIDAD LATINA DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DR. WILLIAM C. GORGAS
PROGRAMA DE LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

**Detección molecular de Coronavirus endémicos y Enterovirus D68
en muestras respiratorias del año 2016 en Panamá**

ELABORADO POR:
Yobelis Quintero

**TRABAJO DESARROLLADO PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA**

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ
2025

DECLARACIÓN JURADA

Yo, **Yobelis Quintero** con cédula No. 3-753-511, estudiante graduando de la carrera de Biotecnología declaro bajo la gravedad de juramento que el material que aparece en esta tesis de grado es de mi producción intelectual, en razón de lo cual asumo toda la responsabilidad sobre el uso de producción intelectual.

Firmado: Yobelis Quintero

Cédula: 3-753-511

El Proyecto Final de Graduación de la carrera de Licenciatura en Biotecnología presentado por Yobelis Quintero fue aprobado por el siguiente comité asesor:

Asesor

Firma

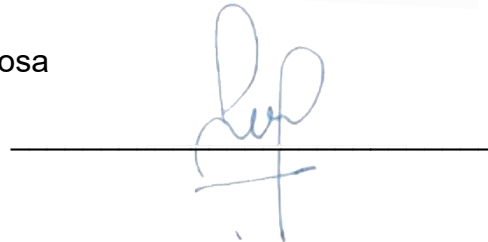
Magister Juan A. Castillo Mewa

Director

A handwritten signature in blue ink, reading "Juan A. Castillo Mewa", is written over a horizontal line. The signature is enclosed in a light gray rectangular box.

María Fernanda Alves Rosa

Jurado

A handwritten signature in blue ink, reading "María Fernanda Alves Rosa", is written over a horizontal line. The signature is enclosed in a light gray rectangular box.

Universidad Latina de Panamá
Panamá, República de Panamá
2025

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia por su apoyo incondicional en todo este recorrido, por impulsarme siempre y ser mi mayor motivación. También se lo dedico a todas las personas que han formado parte de esta trayectoria, quienes con su compañía, apoyo y confianza me motivaron a seguir adelante y culminar esta meta.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a Dios por haberme permitido llegar hasta este momento de mi vida, por darme la fortaleza necesaria y por poner en mi camino a tantas personas increíbles que me han ayudado a alcanzar esta meta.

A mis padres, gracias por acompañarme desde el primer día en el que decidí iniciar en esta carrera, por brindarme su apoyo incondicional, por impulsarme siempre y nunca dudar de mí.

Quiero agradecer profundamente a mis asesores de tesis, el M.Sc. Juan Castillo Mewa y la Dra. Leyda Abrego, quienes me brindaron su apoyo desde el inicio de este proceso. Sin su guía este trabajo no hubiera sido posible. Muchas gracias por su orientación, sus enseñanzas y por la confianza que depositaron en mí para culminar este trabajo.

Finalmente, agradezco al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de realizar esta investigación en sus instalaciones. Extiendo también mis agradecimientos a todas las personas del instituto que me ofrecieron su apoyo durante este proceso.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3 OBJETIVOS	4
1.3.1 GENERAL	4
1.3.2 ESPECÍFICOS.....	4
1.4 HIPÓTESIS	5
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 INTRODUCCIÓN.....	7
2.2 CORONAVIRUS ENDÉMICOS	10
2.2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS CORONAVIRUS ENDÉMICOS	10
2.2.2 ESTRUCTURA VIRAL Y GENÓMICA DE LOS CORONAVIRUS ENDÉMICOS	11
2.2.3 CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL DE LOS CORONAVIRUS ENDÉMICOS	15
A. Entrada viral.....	15
B. Traducción de proteínas no estructurales.....	16
C. Replicación del genoma y traducción de proteínas estructurales.....	16
D. Ensamblaje y liberación del virión.....	17
2.2.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LOS CORONAVIRUS ENDÉMICOS	19
2.2.5 EPIDEMIOLOGÍA DE LOS CORONAVIRUS ENDÉMICOS	19
2.3 ENTEROVIRUS D68	20
2.3.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL ENTEROVIRUS D68	20
2.3.2 ESTRUCTURA VIRAL Y GENÓMICA DEL ENTEROVIRUS D68	21
2.3.3 CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL DEL ENTEROVIRUS D68	22
A. Entrada del virus.....	22
B. Traducción.....	23
C. Replicación.....	24
D. Liberación.....	25
2.3.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DEL ENTEROVIRUS D68	25
2.3.5 EPIDEMIOLOGÍA DEL ENTEROVIRUS D68	26
2.4 DETECCIÓN MOLECULAR.....	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	30
3.2 POBLACIÓN Y CRITERIOS DE SELECCIÓN	30
3.2.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	30
3.2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	30
3.2.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	30

3.3 SELECCIÓN DE MUESTRAS	30
3.4 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LABORATORIO	31
3.4.1 EXTRACCIÓN AUTOMATIZADA DE ÁCIDOS NUCLEICOS	31
A. Preparación de reactivos para el equipo de extracción	32
B. Preparación de las muestras nasofaríngeas.....	32
C. Preparación del equipo de extracción	32
3.4.2 EXTRACCIÓN MANUAL DE ARN	33
A. Lisis.....	33
B. Unión	33
C. Lavados	33
D. Elusión.....	34
3.4.3 DETECCIÓN DE CORONAVIRUS ENDÉMICOS MEDIANTE RT-PCR ANIDADA MULTIPLEX EN TIEMPO REAL.....	34
A. Preparación de los reactivos para la amplificación	35
B. Procesamiento de las muestras	38
C. Preparación del termociclador en tiempo real	39
3.4.4 DETECCIÓN DEL CORONAVIRUS ENDÉMICO HKU1 POR RT-PCR EN TIEMPO REAL	40
A. Preparación de los reactivos para la amplificación	40
B. Procesamiento de las muestras	41
C. Preparación del termociclador en tiempo real	42
3.4.5 DETECCIÓN DEL EV-D68 POR RT-PCR EN TIEMPO REAL.....	43
A. Preparación de los reactivos para la amplificación	43
B. Procesamiento de las muestras	45
C. Preparación del termociclador en tiempo real	46
3.5 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	46
3.6 ANÁLISIS DE LOS DATOS	47
3.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS	47
4. RESULTADOS	48
4.1 DETECCIÓN DE CORONAVIRUS ENDÉMICOS POR RT-PCR ANIDADA MULTIPLEX EN TIEMPO REAL (CoVh-229E, CoVh-OC43, CoVh-NL63).....	49
4.2 DETECCIÓN DEL CORONAVIRUS ENDÉMICO HKU1 POR RT-PCR EN TIEMPO REAL	56
4.3 DETECCIÓN DEL EV-D68 POR RT-PCR EN TIEMPO REAL	57
4.4 COINFECCIONES.....	64
5. DISCUSIÓN	68
6.1 CONCLUSIONES.....	76
6.2 LIMITACIONES	77
6.3 RECOMENDACIONES	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
7. ANEXOS	88
7.1 DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS SELECCIONADAS	89

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos para la extracción de los ácidos nucleicos.....	32
Tabla 2. Reactivos para la extracción de ARN.....	34
Tabla 3. Información sobre los cebadores utilizados para la detección de CoVh-229E, CoVh-NL63 y CoVh-OC43.....	35
Tabla 4. Sondas utilizadas en la detección de CoVh-229E, CoVh-NL63 y CoVh-OC43.....	37
Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción de la RT-PCR anidada múltiple en tiempo real de un sólo paso.....	38
Tabla 6. Programa de amplificación usado para la detección de CoVh-229E, CoVh-NL63 y CoVh-OC43.....	39
Tabla 7. Componentes de la mezcla de reacción para la detección de CoVh-HKU1.....	42
Tabla 8. Programa de amplificación usado para la detección de CoVh-HKU1.....	43
Tabla 9. Cebadores y sondas utilizadas en la detección del EV-D68.....	45
Tabla 10. Componentes de la mezcla de reacción para la detección del EV-D68.....	45
Tabla 11. Programa de amplificación usado para la detección del EV-D68.....	46
Tabla 12. Resultados de detección de CoVh-229E, CoVh-OC43 y CoVh-NL63.....	70
Tabla 13. Valores de Ct obtenidos en las pruebas de detección de los Coronavirus endémicos CoVh- 229E y CoVh-OC43.....	73
Tabla 14. Valores de Ct de las muestras que resultaron positivas en la detección del EV-D68.....	81
Tabla 15. Valores de Ct de las muestras repetidas para la detección de EV-D68.....	83
Tabla 16. Coinfecciones detectadas con otros virus respiratorios.....	86

Tabla 17. Síntomas de coinfecciones entre EV-D68 y RSV.....	87
Tabla 18. Síntomas de coinfecciones entre EV-D68 y RV.....	87
Tabla 19. Síntomas de coinfecciones entre EV-D68 y PIV-3.....	88
Tabla 20. Características clínicas y demográficas de las muestras seleccionadas del año 2016.....	49
Tabla 21. Resultados del panel viral respiratorio de las muestras seleccionadas del año 2016 en Panamá.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomía de la familia Coronaviridae.....	11
Figura 2. Organización del genoma de los Coronavirus humanos.....	12
Figura 3. Estructura del virión de los Coronavirus.....	15
Figura 4. Ciclo de replicación viral de los Coronavirus.....	18
Figura 5. Taxonomía de la familia Picornaviridae.....	20
Figura 6. Estructura del virión de Enterovirus D68.....	21
Figura 7. Organización del genoma de Enterovirus D68.....	22
Figura 8. Ciclo de replicación viral de EV-D68.....	23
Figura 9. Resultados de amplificación de CoVh-229E, lote 1.....	71
Figura 10. Resultados de amplificación de CoVh-229E, lote 2.....	72
Figura 11. Resultados de amplificación de CoVh-OC43, lote 1.....	72
Figura 12. Resultados de amplificación de CoVh-OC43, lote 2.....	73
Figura 13. Resultados de amplificación de CoVh-NL63, lote 1.....	74
Figura 14. Resultados de amplificación del CoVh-HKU1, lote 1.....	78
Figura 15. Resultados de amplificación del EV-D68, lote 1.....	79
Figura 16. Resultados de amplificación del EV-D68, lote 2.....	80

Figura 17. Resultados de amplificación de las muestras repetidas para la detección de EV-D68.....	82
Figura 18. Representación esquemática de la metodología aplicada durante el estudio.....	110
Figura 19. Selección de las muestras.....	110
Figura 20. Extracción de los ácidos nucleicos.....	111
Figura 21. RT-PCR en tiempo real.....	111
Figura 22. Análisis de los resultados.....	111

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Frecuencia de detección de los Coronavirus endémicos en Panamá en el año 2016 (n=127).....	71
Gráfico 2. Distribución de CoVh-229E según grupo etario en las muestras analizadas del año 2016 en Panamá (n=127).....	75
Gráfico 3. Distribución de CoVh-OC43 según grupo etario en las muestras analizadas del año 2016 en Panamá (n=127).....	75
Gráfico 4. Distribución geográfica de CoVh-229E en las muestras analizadas del año 2016 en Panamá (n=126).....	76
Gráfico 5. Distribución geográfica de CoVh-OC43 en las muestras analizadas del año 2016 en Panamá (n=126).....	76
Gráfico 6. Distribución de los casos positivos de CoVh-229E según el desenlace clínico del paciente al momento de la recolección (n=127).....	77
Gráfico 7. Distribución de los casos positivos de CoVh-OC43 según el desenlace clínico del paciente al momento de la recolección (n=127).....	77
Gráfico 8. Frecuencia de detección del EV-D68 en Panamá en el año 2016 (n=127).....	79
Gráfico 9. Distribución del EV-D68 según grupo etario en las muestras analizadas del año 2016 en Panamá (n=127).....	82
Gráfico 10. Distribución geográfica del EV-D68 en las muestras analizadas del año 2016 en Panamá (n=126).....	82

Gráfico 11. Frecuencia de síntomas reportados en casos positivos y negativos del EV-D68 (n=82).....	83
Gráfico 12. Distribución de los casos positivos del EV-D68 según el desenlace clínico del paciente al momento de la recolección (n=127).....	83

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones respiratorias son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, por lo que un diagnóstico viral sensible y preciso es crucial para orientar la atención clínica. Los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizan con frecuencia para el diagnóstico de enfermedades virales debido a su alta sensibilidad y especificidad, lo que permite detectar cantidades mínimas de material genético y diferenciar entre patógenos estrechamente relacionados. Además, ofrece resultados en corto tiempo, lo que facilita la toma de decisiones clínicas oportunas, y tiene la ventaja de poder identificar virus no cultivables en medios de laboratorio. Su versatilidad y adaptabilidad permiten desarrollar paneles multiplex para la detección simultánea de múltiples patógenos respiratorios, así como actualizar rápidamente cebadores y sondas para identificar nuevas variantes o virus emergentes. Estas características la convierten en una herramienta clave para la vigilancia epidemiológica y molecular de enfermedades de importancia en salud pública, como influenza, SARS-CoV-2 y VIH.

Sin embargo, los costos limitan el número de patógenos que son incluidos dentro de los paneles de diagnóstico. Estos otros virus no incluidos, también pueden ser responsables de algunos casos de infección en los pacientes y en consecuencia, no se logra determinar el agente etiológico causante de la enfermedad. (Phan et al., 2022). Es por esto, que una identificación precisa de los patógenos virales causantes de las infecciones respiratorias es fundamental para el manejo correcto de los pacientes y la elección de un tratamiento adecuado (Colagrossi et al., 2021).

En Panamá, durante el año 2016, el Sistema de Vigilancia para Influenza y otros virus respiratorios recibió 4041 muestras con infecciones respiratorias, de estas, el 62, 78% (n=2537) resultaron positivas a los virus más frecuentes que están incluidos dentro del panel viral respiratorio. Este panel incluye a los virus de Influenza A/H1 pandémico (A/H1pdm), Influenza A/H3 (A/H3), Influenza A/No tipificable (A/No tipificable), Influenza B/Victoria (B/VIC), Influenza B/Yamagata (B/YAM), Virus Sincitial Respiratorio (RSV), Metapneumovirus humano (hMPV), Parainfluenza tipo 1 (PIV-1), Parainfluenza tipo 2 (PIV-2), Parainfluenza tipo 3 (PIV-3), Adenovirus (AdV) y

Rinovirus (RV). En el 37,22% (n=1504) de las muestras restantes no se logró determinar el agente causal de las infecciones respiratorias, por lo que estos pacientes con resultados negativos no lograron tener un diagnóstico etiológico de la enfermedad. Esto resalta la necesidad de conocer cuáles otros virus menos frecuentes fuera de nuestro Sistema de Vigilancia, pudiesen estar causando estos cuadros clínicos en los pacientes.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Las infecciones respiratorias que, en Panamá, permanecen sin un diagnóstico etiológico, representan una limitación en cuanto al tipo de atención clínica que reciben estos pacientes y a la vigilancia de otros virus menos frecuentes que no son detectados en nuestro Sistema de Vigilancia Rutinario. Los Coronavirus humanos (CoVh) CoVh-229E, CoVh-HKU1, CoVh-NL63 y CoVh-OC43 son endémicos a nivel mundial y están asociados con enfermedades respiratorias de diversa gravedad (Shao et al., 2022). Estos se detectan en una proporción pequeña pero no insignificante de infecciones del tracto respiratorio. Los casos leves pueden ocurrir en un amplio rango de edad, sin embargo, los casos graves afectan predominantemente a niños pequeños y ancianos (Otieno et al., 2020). Es por esto la importancia de una vigilancia y un diagnóstico preciso de estas infecciones respiratorias que permita un mejor pronóstico de la enfermedad y un tratamiento adecuado que contribuya a la reducción de la gravedad de los síntomas (Silva et al., 2022).

En la última década, el Enterovirus D68 (EV-D68) ha resurgido como un desafío relevante para la salud pública, especialmente tras su primer brote significativo en Estados Unidos (EE. UU.) en 2014 que afectó principalmente a niños (Grizer et al., 2024). Este virus captó la atención pública debido a su capacidad de causar infecciones respiratorias graves y su relación con la Mielitis flácida aguda (MFA) (Andrés et al., 2022). Este brote condujo a la implementación de una vigilancia mejorada para EV-D68 en muchos países (Fall et al., 2022) incluidos los EE. UU., la Unión Europea, Japón, Canadá, Australia y Taiwán (Li et al., 2024) lo que evidencia la importancia de monitorear su circulación y comprender su impacto.

En Panamá, la información epidemiológica sobre los Coronavirus endémicos y el EV-D68 es limitada, lo que dificulta comprender su patrón de circulación y el impacto que tienen en la salud pública del país. Esta carencia de datos resalta la necesidad de fortalecer los sistemas de vigilancia y generar evidencia local que permita ampliar el conocimiento sobre estos virus que son poco monitoreados en el país. En este contexto, la detección y descripción de su presencia en muestras respiratorias resulta esencial para aportar información valiosa que contribuya a la vigilancia epidemiológica de las infecciones respiratorias y a la toma de decisiones en la salud pública.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 GENERAL

- Identificar la presencia de los Coronavirus endémicos y del EV-D68 en muestras clínicas colectadas durante el año 2016 en Panamá.

1.3.2 ESPECÍFICOS

- Realizar la detección molecular de los Coronavirus endémicos en muestras respiratorias colectadas en el año 2016.
- Realizar la detección molecular del EV-D68 en muestras respiratorias colectadas en el año 2016.
- Identificar la presencia de coinfecciones entre los Coronavirus endémicos y EV-D68.
- Identificar la presencia de coinfecciones entre Coronavirus endémicos o EV-D68 y alguno de los virus detectados mediante el panel respiratorio de rutina utilizado en el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud.

1.4 HIPÓTESIS

Durante el año 2016, al menos uno de los Coronavirus endémicos (229E, NL63, OC43, HKU1) y/o el Enterovirus D68 circularon en Panamá y estuvieron presentes tanto en infecciones respiratorias únicas como en coinfección con virus respiratorios incluidos en el panel de diagnóstico rutinario, contribuyendo a la carga de enfermedad respiratoria en la población.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 INTRODUCCIÓN

La principal causa de enfermedad aguda en todo el mundo son las infecciones respiratorias agudas (IRA) y son responsables de casi 4 millones de muertes cada año, principalmente en niños pequeños y lactantes (Gandhi et al., 2022). Las infecciones respiratorias, ya sean agudas o crónicas, son extremadamente frecuentes tanto en adultos como en niños, lo que representa una carga económica para los sistemas de salud, así como una mayor morbilidad y mortalidad (Niederman & Torres, 2022).

Las infecciones respiratorias incluyen afectaciones de las vías respiratorias superiores (rinitis, faringitis, faringoamigdalitis, otitis, sinusitis y laringitis) y de las vías respiratorias inferiores (bronquitis, bronquiolitis y neumonía). Estas últimas, representan actualmente la tercera causa principal de muerte a nivel mundial y se han identificado numerosos virus como agentes etiológicos de infecciones respiratorias, pero los más comunes son el RSV, la Influenza, PIV, hMPV, Coronavirus (CoV), RV y EV (Colagrossi et al., 2021).

Sin embargo, los virus respiratorios con mayor impacto en la salud pública mundial son el RSV, que afecta a lactantes y ancianos, y las Influenzas A y B, que comprometen a toda la población (Carvajal & Pérez, 2020). A nivel mundial, se estima que el virus de la Influenza causa 39,1 millones de infecciones respiratorias inferiores agudas y 58.200 muertes al año, y se estima que el Virus Sincitial Respiratorio causa 24,8 millones de infecciones y 76.600 muertes al año (Gandhi et al., 2022).

En Panamá, se han realizado estudios epidemiológicos sobre los virus respiratorios en pacientes con un diagnóstico de IRA y el principal virus identificado ha sido el RSV (25,9 %) seguido por la Influenza A (10,6 %), RV (10,6%), PIV-3 (8,2%) y AdV (5,9%) (Núñez-Samudio & Landires, 2021).

Sin embargo, además de estos virus que son ampliamente estudiados, existen otros virus menos frecuentes causantes de infecciones respiratorias. Los virus CoVh-229E, CoVh-OC43, CoVh-NL63 y CoVh-HKU1 son endémicos a nivel mundial y representan una fracción sustancial de las infecciones de las vías respiratorias superiores. Estos

virus, si bien no causan ninguna epidemia importante mortal, pueden ocasionalmente producir enfermedades graves en sujetos frágiles (Raoult et al., 2020).

Estos 4 Coronavirus han circulado en la población humana a nivel mundial y están asociados con una amplia gama de enfermedades respiratorias de diversa gravedad (Shao et al., 2022), siendo responsables de entre el 15% y el 30% de los resfriados comunes anuales en el mundo. En general, estas cuatro cepas endémicas de coronavirus no se consideran amenazas importantes para la salud pública y es por esto, que no han sido un foco de investigación importante durante años (Miller et al., 2020).

Estos virus generalmente causan enfermedades leves a moderadas del tracto respiratorio superior, sin embargo, también pueden causar enfermedades más graves en poblaciones de riesgo, como ancianos, personas inmunocomprometidas y niños pequeños (Fausto et al., 2023). Actualmente, no existen fármacos terapéuticos efectivos, ni vacunas autorizadas disponibles para el tratamiento y la prevención de las infecciones causadas por estos virus respiratorios (Shao et al., 2022).

Las infecciones causadas por EV-D68 representan un problema de salud pública mundial. Desde su descubrimiento en 1962, este virus circuló en niveles bajos alrededor del mundo y se identificaron infecciones esporádicas hasta 2014. En ese año, el virus emergió y capturó la atención pública cuando se reportaron brotes en EE.UU. y Canadá asociado a casos de MFA que afectó principalmente a niños pequeños. Este brote impredecible de EV-D68, condujo a la implementación de una vigilancia mejorada para Enterovirus en muchos países (Fall et al., 2022).

Debido a esto, EV-D68 ha despertado interés dada su creciente prevalencia y su asociación con infecciones causantes de una alta morbilidad, predominantemente en niños. Estas complicaciones incluyen infecciones respiratorias graves como MFA (Elrick et al., 2021). La MFA se manifiesta como una rara afección neurológica similar a la poliomielitis que se caracteriza por la aparición aguda de debilidad flácida en las extremidades, lesiones en la materia gris o, eventualmente, parálisis (Galitska et al., 2023).

Las infecciones por EV-D68 provocan enfermedades respiratorias de leves a graves, representando una seria amenaza para la salud pública mundial. Sin embargo, hasta el momento no existe ninguna vacuna o fármaco antiviral aprobado contra la infección por este virus (Dai et al., 2023).

Debido a la falta de vacunas aprobadas para proteger contra estas infecciones y dada su capacidad de causar enfermedades respiratorias graves y posibles complicaciones neurológicas como la MFA, es importante comprender su epidemiología para dilucidar los patrones y la dinámica de los brotes de dichas infecciones y predecir su carga de enfermedad a largo plazo y su impacto en la salud pública (Fall et al., 2022).

En Panamá, el Sistema Nacional Vigilancia Epidemiológica de Influenza y de otras infecciones respiratorias agudas graves, tiene como propósito generar conocimientos epidemiológicos relevantes sobre eventos de salud que permitan describir las tendencias en el tiempo, lugar, persona y sus factores determinantes con la finalidad de fortalecer las acciones de prevención y control, así como aportar conocimientos para la planificación, ejecución y evaluación de las acciones de salud. Esto se realiza mediante un conjunto de normas y procedimientos que permiten detectar brotes, determinar la relación entre los casos y generar alertas epidemiológicas (Ministerio de Salud, 2017).

El desarrollo de técnicas moleculares en los últimos años ha tenido una repercusión considerable en el conocimiento de la epidemiología y las manifestaciones clínicas de los patógenos virales. Si bien existen diversas técnicas de diagnóstico, la RT-PCR brinda una mejor sensibilidad para la detección y por lo tanto es la metodología recomendada para la mayoría de los laboratorios para dar respuestas rápidas al inicio de un brote. Gracias a esta estructura, en Panamá se ha podido identificar virus emergentes, aportar datos para la composición de la vacuna anual contra influenza y mejorar la preparación ante pandemias. Sin embargo, la norma enfatiza la necesidad de seguir fortaleciendo la capacidad de diagnóstico molecular, la capacitación del personal y la integración de datos clínicos, epidemiológicos y genómicos para responder de forma más rápida y eficiente a futuros eventos epidémicos (Ministerio de Salud, 2017).

Este estudio se enfoca en la detección molecular de otros virus respiratorios que son menos frecuentes, pero que tienen la capacidad de causar infecciones respiratorias graves en sujetos vulnerables. El objetivo es detectar la presencia de estos virus en las muestras analizadas del panel viral respiratorio del año 2016, con el fin de determinar si fueron responsables de infecciones respiratorias en casos con diagnóstico etiológico negativo, o si causaron coinfecciones con los virus previamente detectados durante ese año.

2.2 CORONAVIRUS ENDÉMICOS

2.2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS CORONAVIRUS ENDÉMICOS

Los Coronavirus pertenecen a la subfamilia Coronavirinae en la familia Coronaviridae del orden Nidovirales, y esta subfamilia incluye cuatro géneros, alpha Coronavirus, beta Coronavirus, gamma Coronavirus y delta Coronavirus (Chen et al., 2020). Los Coronavirus que infectan a humanos están dentro de los géneros alfa y beta, mientras que los gamma y delta infectan principalmente a aves (Hartenian et al., 2020). Los CoVh que pertenecen a los géneros alpha y beta se originan en roedores y murciélagos y se transmiten a humanos a través de contactos zoonóticos (Guruprasad, 2020).

Hasta la fecha, se conocen 7 CoVh. Entre ellos, CoVh-229E y CoVh-NL63 pertenecen a los alpha Coronavirus. Mientras que CoVh-OC43, CoVh-HKU1, SARS-CoV (Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo), MERS-CoV (Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio) y el SARS-CoV-2 pertenecen a los beta Coronavirus (Ye et al., 2020).

Los CoVh-229E, CoVh-NL63, CoVh-OC43 y CoVh-HKU1 han sido considerados como patógenos relativamente inofensivos para los humanos. En cambio SARS-CoV y MERS son patógenos humanos que pueden ser letales y han causado brotes graves de infecciones del tracto respiratorio generando altas tasas de patogenicidad y mortalidad en humanos (Cong et al., 2019).

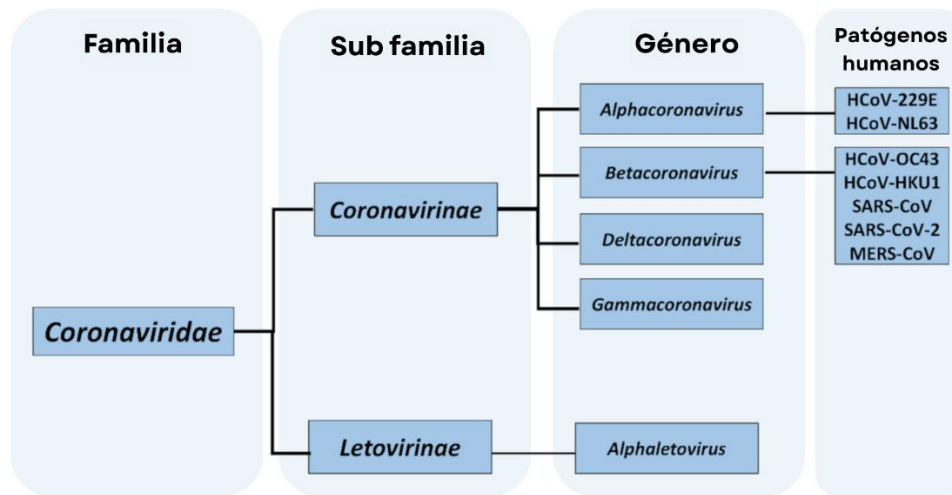


Figura 1: Taxonomía de la familia Coronaviridae. Modificada de “On the Coronaviruses and Their Associations with the Aquatic Environment and Wastewater”, por Wartecki, A., & Rzymiski, P. *Water*, 12(6), 1598. doi.org/10.3390/w12061598

2.2.2 ESTRUCTURA VIRAL Y GENÓMICA DE LOS CORONAVIRUS ENDÉMICOS

Los CoVh son virus envueltos de forma esférica con un diámetro de 100–120 nm. Estos son virus de ARN monocatenario de sentido positivo de clase IV de Baltimore con un tamaño de genoma de 27–31 kb que se traducen en proteínas estructurales y no estructurales (nsp). Desde la dirección proximal 5', dos tercios del total del genoma de los CoV codifican para dos grandes marcos de lectura abiertos (ORF1a y ORF1b) que se traducen en 2 grandes poliproteínas pp1a y pp1b (Guruprasad, 2020).

Estas 2 poliproteínas se procesan en 15 o 16 proteínas nsp mediante múltiples actividades de proteinasa viral presentes en sus secuencias. En conjunto, las nsp forman los complejos de replicación-transcripción (RTC), que desempeñan un papel crucial en la síntesis de ARN viral. Los RTC, junto con los factores del huésped reclutados, copian el genoma ya sea de manera continua (replicación) o de manera discontinua (transcripción). Estas plantillas de cadena negativa se utilizan para la síntesis de nuevas moléculas de ARN genómico (ARNg) y ARNm subgenómicos (ARNsgm). Estos ARNsgm sirven para poder codificar las proteínas estructurales y accesorias de los CoV (Cong et al., 2019).

En general, el ARNg actúa en tres capacidades durante el ciclo de vida viral de CoV: (1) como un ARN inicial del ciclo infeccioso; (2) como una plantilla para la replicación y la transcripción; y (3) como un sustrato para el empaquetamiento en el virus de la progenie. La replicasa-transcriptasa es la única proteína traducida a partir del genoma, mientras que todas las proteínas estructurales y accesorias derivan de los ARNsgm (Lim et al., 2016).

Además de estos, existen varios ORF adicionales en el tercio final del ARNg (Figura 2), que codifican 4 proteínas estructurales. Estas incluyen la proteína de la nucleocápside (N), la proteína de la matriz (M), la proteína de la envoltura (E) y la proteína de la espiga (S) (Figura 3). La proteína de la espiga es el principal determinante de la virulencia de los CoV porque media la unión del virus al receptor huésped específico (Mulabbi et al., 2021).

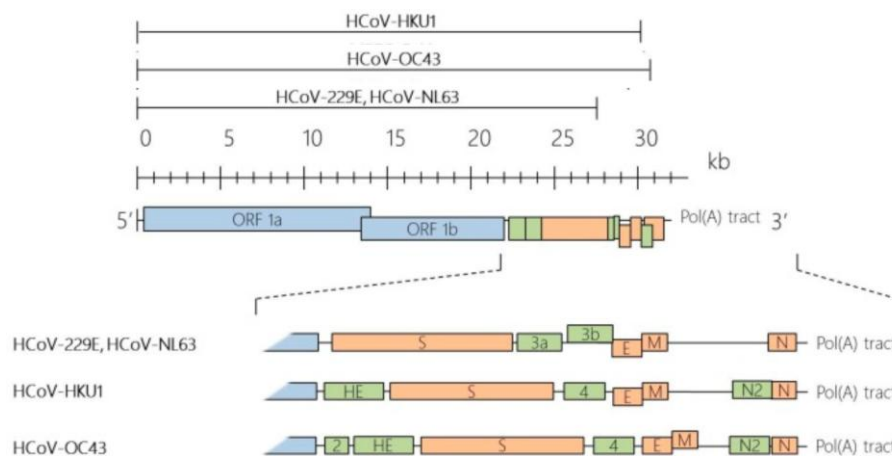


Figura 2: Organización del genoma de los coronavirus humanos. Modificada de “Human Coronaviruses: A Review of Virus–Host Interactions”, por: Lim, Y., Ng, Y., Tam, J., & Liu, D. *Diseases*, 4(3), 26. doi.org/10.3390/diseases4030026

La organización general del genoma es 5' UTR–gen de la polimerasa–genes de proteínas estructurales–3' UTR, donde los UTR son regiones no traducidas. Los genes de proteínas estructurales están en el mismo orden en todos los coronavirus: (HE)–S–E–M–N. Intercalados entre estos genes hay uno o más genes adicionales, denominados genes accesorios, ya que se ha demostrado que no son esenciales para la replicación y codifican pequeñas proteínas de función principalmente desconocida (Britton, 2019). Además, en algunos beta Coronavirus (CoVh-HKU1 y CoVh-OC43)

se encuentra la hemaglutinina esterasa, una proteína estructural de transmembrana tipo I (Liu et al., 2020).

En los Coronavirus humanos, la proteína S es un elemento estructural clave que desempeña un papel crucial en la infección viral. Esta facilita la entrada celular en la célula huésped mediante la unión y fusión del receptor. Las proteínas S forman grandes espigas con forma de corona en la superficie del virus, característica que dio nombre al grupo taxonómico de virus (Coronavirus) (Minigulov et al., 2024).

La proteína S actúa como una glicoproteína de fusión transmembrana de tipo I, que interactúa con los receptores proteicos de la célula huésped y se divide en dos subunidades funcionales: S1 y S2. Dependiendo del tipo de coronavirus, el sitio de la proteína de pico S1/S2 es escindido ya sea por furina en la célula infectada o por proteasas de la célula huésped durante la entrada viral. La subunidad S1 es responsable del contacto primario, mientras que la subunidad S2 altamente conservada promueve la fusión de membranas entre la célula huésped y el virus (Minigulov et al., 2024).

La proteína E es de membrana corta e integral de 76 a 109 aminoácidos, con un tamaño que varía de 8,4 a 12 kDa, es la más pequeña de las principales proteínas estructurales y participa en varios aspectos del ciclo de vida del virus, como el ensamblaje, la gemación, la formación de la envoltura y la patogénesis. La estructura primaria y secundaria revela que E tiene un extremo amino corto e hidrófilo que consta de 7 a 12 aminoácidos, seguido de un dominio transmembrana hidrófobo grande de 25 aminoácidos, y termina con un extremo carboxilo hidrófilo largo, que comprende la mayoría de la proteína. La proteína E se localiza principalmente en el RE y el complejo de Golgi (Schoeman & Fielding, 2019).

La proteína M del CoV es una glicoproteína transmembrana de tipo III y es la glicoproteína más abundante en la partícula del CoV. La proteína M tiene aproximadamente 230 aminoácidos de longitud y se compone de tres partes: un dominio N-terminal corto situado fuera de la membrana del virión, tres dominios transmembrana y un dominio carboxi-terminal situado dentro de la partícula. Una región anfipática situada al final del tercer dominio transmembrana está bien

conservada en casi todos los miembros de Coronaviridae. La proteína M se encuentra entre las proteínas S en la envoltura del virus junto con pequeñas cantidades de E y es el principal impulsor del proceso de gemación del virus. Durante el ensamblaje del virión, M interactúa consigo mismo, con la proteína N de la nucleocápside, con E y con la proteína S. La proteína M está presente como un dímero en el virión y las imágenes de alta resolución han sugerido que se presenta en dos conformaciones, (larga y compacta) y que juntas inducen la curvatura de la membrana y la unión a la nucleocápside (Alsaadi & Jones, 2019).

La proteína N es un componente estructural principal del virión del coronavirus. N envuelve el genoma del ARN en un complejo de ribonucleoproteína que se ensambla en viriones a través de contactos con la proteína M. Las interacciones N-ARN, N-N y N-M son cruciales para el ensamblaje del virus. Las proteínas N que abarcan los cuatro géneros de la familia de los coronavirus exhiben una arquitectura altamente conservada. La molécula N contiene dos dominios estructurales independientes, el dominio N-terminal y el dominio C-terminal, cada uno de los cuales se une al ARN (Koetzner et al., 2021).

El peso molecular de la proteína N está en un rango de 45 a 60 kDa. Esta es la proteína más abundante de los coronavirus. Su función principal es abarcar el ARN viral en la ribonucleocápside. Además de su papel estructural, la proteína N también es importante para la replicación y transcripción del ARN (Minigulov et al., 2024).

La proteína HE también es una proteína transmembrana de tipo I, presente en algunos beta Coronavirus. Gracias a su actividad de hemaglutinina que se une al ácido siálico, la proteína HE puede actuar como cofactor de la proteína S y facilitar la unión del virión. Además, dado que posee actividad esterasa que elimina los grupos acetilo de los ácidos siálicos O-acetilados, se ha postulado que desempeña un papel como enzima destructora de receptores que facilita la liberación de viriones progenie de células huésped no permisivas, mejorando así la propagación del virión en el medio extracelular (Liu et al., 2020).

La alineación de las secuencias de los genomas de los CoV muestra una identidad del 58% en la región codificante de nsp y del 43% en la región codificante de la

proteína estructural entre los diferentes CoV, con un 54% a nivel del genoma completo, lo que sugiere que las nsp están más conservadas y las proteínas estructurales son más diversas y necesitan adaptarse a nuevos huéspedes. Dado que las tasas de mutación en la replicación de los virus de ARN son mucho más altas que las de los virus de ADN, los genomas de los virus de ARN suelen tener una longitud inferior a 10 kb. Sin embargo, el genoma del CoV es mucho más grande, con aproximadamente 30 kb de longitud, el mayor virus de ARN conocido (Chen et al., 2020).

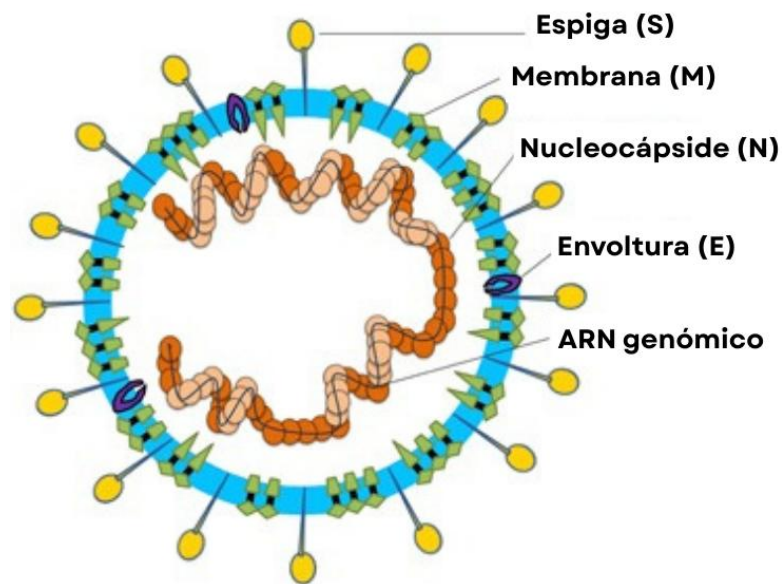


Figura 3: Estructura del virión de los Coronavirus. Reproducida de “Coronavirus infections and immune responses”, por G. Li, Y. Fan, Y. Lai, T. Han, Z. Li, P. Zhou, P. Pan, W. Wang, D. Hu, X. Liu, Q. Zhang y J. Wu, *Journal of Medical Virology*, 92(4), p. 425, 2020, doi.org/10.1002/jmv.25685

2.2.3 CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL DE LOS CORONAVIRUS ENDÉMICOS

A. Entrada viral

El dominio S1 de la proteína S se une al receptor e induce endocitosis, para esto, la activación de la actividad de fusión de la proteína S requiere una escisión proteolítica previa en dos sitios. El primer sitio de escisión se encuentra en el límite S1/S2, lo que provoca cambios estructurales en el dominio S2 que lo colocan en una conformación de pre-fusión. Esta escisión también separa S2 de S1, aunque ambos dominios

permanecen asociados de forma no covalente. El segundo sitio de escisión se encuentra en S2', lo que impulsa la fusión de las membranas viral y celular para permitir la liberación del genoma de ARN recubierto de N al citoplasma. Mientras que los coronavirus utilizan la estrategia general anterior para entrar en las células diana, los receptores y las proteasas utilizadas, así como los sitios subcelulares de escisión de S, difieren según el virus (Hartenian et al., 2020).

B. Traducción de proteínas no estructurales

Tras la entrada en una célula y la liberación de la ribonucleoproteína del virus (genoma rodeado por la proteína N) en el citoplasma, el ARN_v del coronavirus se reconoce inmediatamente como un ARN_m para la traducción de las proteínas nsp. Los ribosomas traducen el gen de la replicasa (gen 1), que tiene aproximadamente 20 kb, en dos poliproteínas (pp1a y pp1ab). Estas son escindidas por proteasas codificadas por el gen 1, para generar 15 o 16 proteínas individuales (Britton, 2019).

La traducción de la región ORF 1a da como resultado pp1a y la traducción de la región ORF 1b da como resultado pp1ab, esta última implica el desplazamiento del marco ribosómico, que tiene dos elementos, un sitio resbaladizo seguido de un pseudonudo de ARN. En el sitio resbaladizo (UUUAAAC en IBV), el ribosoma se desliza un nucleótido hacia atrás y luego se mueve hacia adelante, esta vez en un marco -1 en comparación con el ORF 1a de traducción, lo que da como resultado la poliproteína de síntesis 1ab, en la que las proteínas codificadas por el ORF 1b se fusionan en efecto con las proteínas del ORF 1a (Britton, 2019).

Este subconjunto de nsp generados por la escisión proteolítica de las poliproteínas se unen para formar los RTC que están implicados en la replicación genómica y en la síntesis de ARN_{sgm} para la traducción de las proteínas estructurales (Hartenian et al., 2020).

C. Replicación del genoma y traducción de proteínas estructurales

Tras la formación del complejo RTC, las células infectadas por el virus reorganizan sus endomembranas para establecer fábricas virales, donde se replica y transcribe el

genoma viral. La infección por CoV conduce a la formación de vesículas de doble membrana que son continuas con membranas contorneadas derivadas del retículo endoplasmático (RE) y pueden convertirse en estructuras llamadas paquetes de vesículas. Se cree que estos entornos encerrados en membranas protegen el ARN viral del reconocimiento por los mecanismos de inmunidad innata de la célula huésped, proporcionando así refugios seguros para la replicación del ARN viral (Prydz & Saraste, 2022).

El ARNg de longitud completa se replica mediante intermediarios de sentido negativo, que sirven como plantilla para la generación de genomas de progenie en sentido positivo. Este ARNg también se transcribe en ARNsg que codifica las proteínas estructurales del virus, así como las proteínas auxiliares (Song et al., 2021).

Los ARNsgm de los Coronavirus se producen mediante un proceso de transcripción discontinua, durante el cual la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) que sintetiza la cadena negativa puede detenerse o pausar en secuencias reguladoras de la transcripción (TRS) ubicadas al inicio de cada gen, conocidas como TRS-B, y luego reanudar la síntesis en el extremo 5' del genoma, donde se encuentra una TRS líder (TRS-L). Esto permite que cada ARNsgm contenga una secuencia líder común en el extremo 5', mientras que el resto del ARNm corresponde al ORF específico del gen (Britton, 2019; Hartenian et al., 2020).

Los ARNsg de cadena negativa posteriormente sirven como plantillas para generar grandes cantidades de ARNsgm. La eficiencia con la que la polimerasa detiene la síntesis en cada TRS-B varía según las secuencias adyacentes, lo que produce diferencias en la cantidad de cada ARNsgm. El propósito de la secuencia líder 5' en todos los ARNsgm, aparte de potencialmente cebar la síntesis de ARNsgm, no se entiende completamente (Britton, 2019; Hartenian et al., 2020).

D. Ensamblaje y liberación del virión

El ensamblaje está orquestado por la proteína M: la interacción homotípica de la proteína M proporciona el andamiaje para la morfogénesis del virión, mientras que las

interacciones heterotípicas de la proteína M con otras proteínas estructurales, como MS y ME, facilitan su reclutamiento e incorporación.

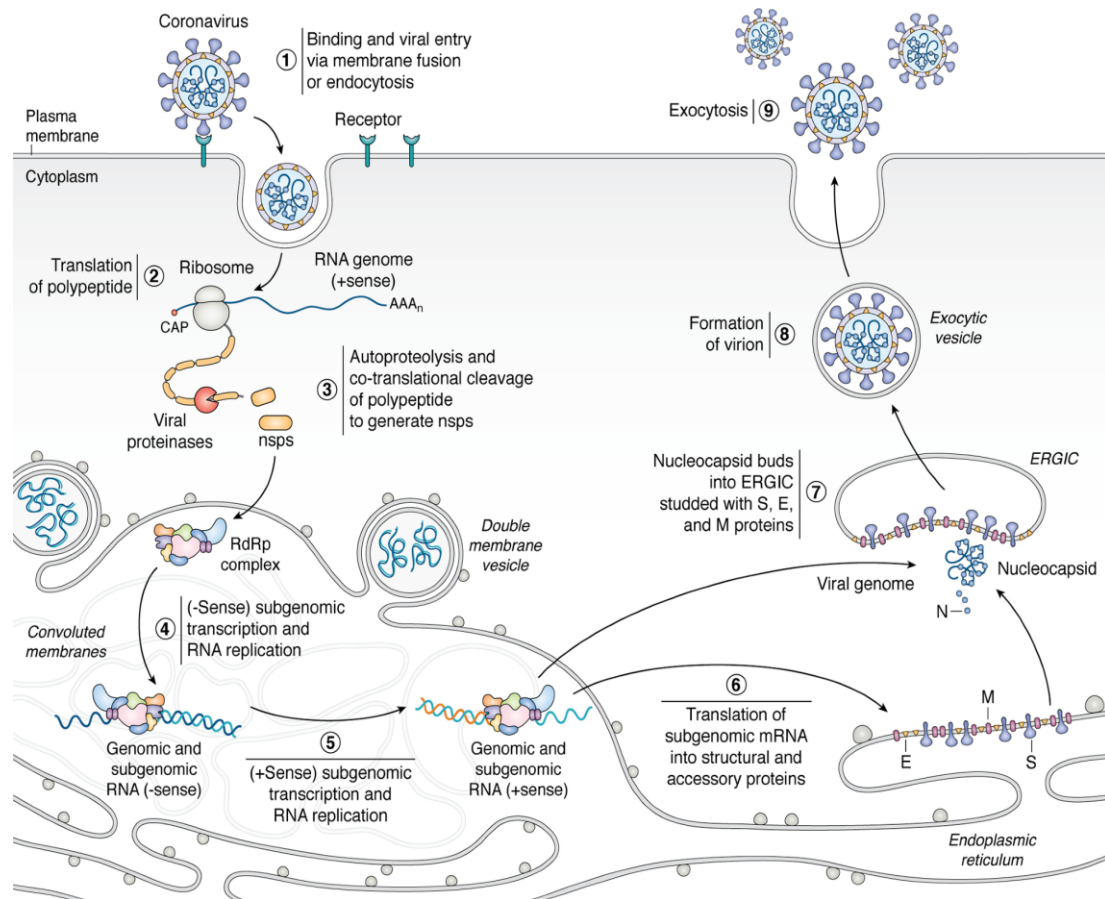


Figura 4: Ciclo de replicación viral de los Coronavirus: (1) Unión al receptor celular e ingreso por endocitosis o fusión de membranas, (2) Liberación del ARNg positivo en el citoplasma, (3) Traducción de poliproteínas y procesamiento para formar el complejo RdRp, (4) Síntesis de ARN de cadena negativa como molde, (5) Producción de genomas positivos progenie y ARNsgm, (6) Traducción de proteínas estructurales y accesorias en membranas del RE, (7) Ensamblaje de nucleocápside con el genoma positivo en el compartimento intermedio del retículo endoplasmático-Golgi (ERGIC) (con proteínas S, E y M), (8) Maduración del virión envuelto, (9) Liberación por exocitosis. Reproducida de: "The molecular virology of coronaviruses", por Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J. M., & Glaunsinger, B. A, Journal of Biological Chemistry, 295(37), 12910-12934. doi.org/10.1074/jbc.rev120.013930

El ensamblaje del virión se completa mediante la condensación de la nucleocápside con los componentes de la envoltura, un proceso mediado por interacciones MN. Una

pequeña cantidad de proteína E puede impulsar la morfogénesis de la envoltura al inducir la curvatura de la membrana. Tras el ensamblaje, los viriones de la progenie se transportan en vesículas de pared lisa, se dirigen a la membrana plasmática mediante la vía secretora y se liberan por exocitosis (Liu et al., 2020).

2.2.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LOS CORONAVIRUS ENDÉMICOS

Los Coronavirus humanos están asociados con diversas enfermedades respiratorias, y presentan una morbilidad y hospitalización considerables entre personas inmunodeprimidas de todas las edades. Estos virus circulan en poblaciones animales, pero con el tiempo se han propagado a los humanos debido a la mayor proximidad entre humanos y animales (Mulabbi et al., 2021).

La presentación clínica de los coronavirus es una de las más variables que se han descrito en la literatura sobre infecciones virales. Las infecciones leves por CoVh endémicos generalmente se caracterizan por síntomas asociados con el resfriado común, como congestión nasal y rinorrea, dolor de cabeza, tos, dolor de garganta y malestar general. Mientras que las infecciones más graves generalmente se asocian con neumonía (Flamenbaum & Roman, 2020).

2.2.5 EPIDEMIOLOGÍA DE LOS CORONAVIRUS ENDÉMICOS

Los primeros informes de CoVh endémicos se remontan a la década de 1960, cuando se describieron a CoVh-OC43 y CoVh-229E. Por otro lado, CoVh-NL63 y CoVh-HKU1 se descubrieron recientemente en 2004 y 2005, respectivamente. CoVh-OC43 se aisló por primera vez en la década de 1960 a partir de explantos traqueales humanos conservados en cultivo de órganos, de ahí el término "OC" en el nombre del virus (Corman et al., 2018).

Unos años después se aisló el virus 229E durante un estudio de enfermedad respiratoria entre estudiantes de medicina en la Universidad de Chicago en 1966 (Hamre & Procknow, 1966). El virus CoVh-NL63 fue aislado por primera vez en 2003 de un niño de 7 meses que padecía de bronquiolitis y conjuntivitis, mediante una muestra de aspirado nasofaríngeo que luego fue inoculada en células renales de

mono terciario (Van Der Hoek et al., 2004). El último Coronavirus endémico descubierto fue en el año 2004, en el que se aisló el virus HKU1 de un hombre de 71 años con neumonía en Hong Kong (Woo et al., 2004).

2.3 ENTEROVIRUS D68

2.3.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL ENTEROVIRUS D68

Los enterovirus (EV) son miembros del género *Enterovirus*, pertenecientes a la familia Picornaviridae. Los EV se clasifican en quince especies, incluidas doce especies de *Enterovirus* (EV-A a EV-L) y tres especies de *Rhinovirus* (RV-A a RV-C). Entre estas, EV-A a EV-D y RV-A a RV-C infectan a los humanos (Figura 5). Dentro de EV-A a EV-D, 116 genotipos se han caracterizado genéticamente a través del análisis filogenético de sus secuencias de proteína viral 1 (VP1). Específicamente, EV-A comprende 25 genotipos, y EV-B, EV-C y EV-D comprenden 63, 23 y 5 genotipos, respectivamente.

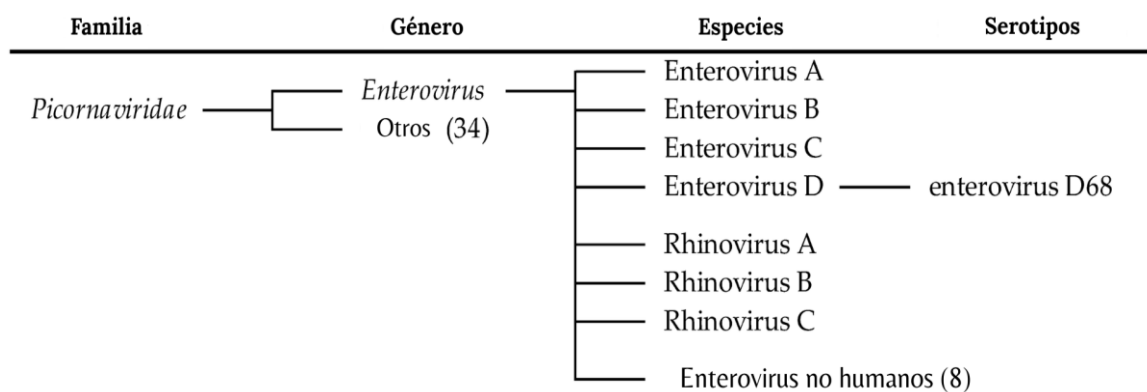


Figura 5: Taxonomía de la familia Picornaviridae. Modificada de “Advances in the Treatment of Enterovirus-D68 and Rhinovirus Respiratory Infections”, por Rahajamanana, V. L., Thériault, M., Rabezanaary, H., Sahnoun, Y. G., Mallet, M. C., Isabel, S., Trottier, S., & Baz, M. *Infectious Disease Reports*, 17(3), 61. doi.org/10.3390/idr17030061

La especie D de EV es una de las más pequeñas del género *Enterovirus*, contando con solo cinco tipos, pero el rango de hospedadores, tropismo tisular y enfermedades asociadas son muy diversos. EV-D68 y EV-D70, los primeros EV-D descubiertos, infectan solo a humanos pero, a diferencia de la mayoría de EV de las especies A-C,

no se consideran virus enterotrópicos y están más bien asociados con infecciones respiratorias y oculares (Filipe et al., 2021).

2.3.2 ESTRUCTURA VIRAL Y GENÓMICA DEL ENTEROVIRUS D68

El virión del EV-D68 contiene un único genoma de ARN monocatenario de sentido positivo rodeado por una cápside icosaédrica que contiene 4 proteínas estructurales de la cápside viral (VP1, VP2, VP3 y VP4). VP1, VP2 y VP3 están expuestas en la superficie en la superficie de la cápside, mientras que VP4 se encuentra en la parte interna, sirviendo como un estabilizador estructural (figura 5) (Hu et al., 2020). Las proteínas VP1-VP3 expuestas en la superficie son cruciales para provocar una respuesta inmune, ya que contienen la mayoría de los epítomos antigénicos neutralizantes (Xie et al., 2024).

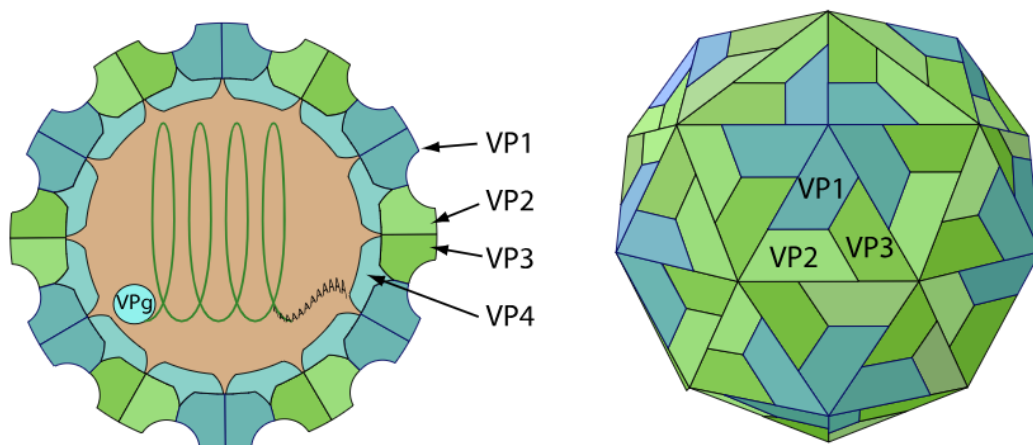


Figura 6: Estructura del virión de Enterovirus D68. Reproducida de: Philippe Le Mercier, Chantal Hulo, Patrick Masson; Yann Haefliger, Edouard de Castro, Enterovirus, ViralZone. <https://viralzone.expasy.org/97>

Estas proteínas se organizan en subunidades, ensamblándose en los vértices para crear un patrón de trímero alternado en una simetría de pentámero. Adyacente al vértice pentavalente, se cree que un "cañón" contribuye significativamente a la unión del receptor. En la base del cañón, el bolsillo hidrofóbico en cada subunidad VP1 alberga un "factor de bolsillo" similar a un lípido derivado del huésped que regula la estabilidad y entrada del virus (Kalam & Balasubramaniam, 2024).

Este es uno de los virus más pequeños con un diámetro de ~30 nm. Cada virión contiene 60 copias de las proteínas de la cápside VP1-VP4. Dentro del virión hay un ARN viral monocatenario de sentido positivo que tiene aproximadamente 7400 bases de longitud (Hu et al., 2020).

El genoma viral consta de tres segmentos: una región no traducida 5' de 700-825 nucleótidos de longitud, un único ORF que codifica una poliproteína viral y una 3' UTR de 75-100 nucleótidos de longitud (Figura 6). Esta poliproteína se escinde por auto catálisis para producir cuatro proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4) y siete proteínas nsp (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D). La región 5' UTR contiene el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), que es esencial para reclutar ribosomas para el inicio de la traducción (Grizer et al., 2024). Los EV comparten una organización conservada y una estrategia de expresión génica dentro del género, manteniendo un patrón consistente en la organización de la poliproteína (Xie et al., 2024).

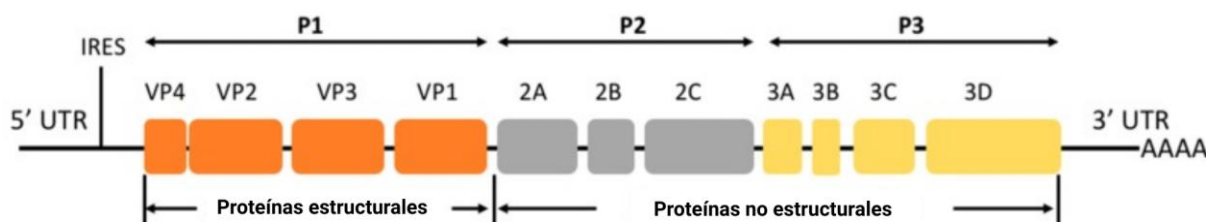


Figura 7: Organización del genoma de Enterovirus D68. Modificada de “Current Understanding of Human Enterovirus D68”, por: Sun, J., Hu, X., & Yu, X. *Viruses*, 11(6), 490. doi.org/10.3390/v11060490

2.3.3 CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL DEL ENTEROVIRUS D68

A. Entrada del virus

Para iniciar la infección, la cápside viral debe reconocer y entrar en una célula huésped. El primer paso en este proceso es la adhesión, donde la cápside viral se une a factores de adhesión en la célula huésped, que a menudo consisten en fracciones de carbohidratos. Este paso de unión sirve para concentrar viriones en la superficie celular. El siguiente paso es la unión a un receptor, más comúnmente una proteína integral de membrana, y este evento media la entrada del virus en la célula

(Elrick et al., 2021). La unión del virus en los receptores de la célula huésped (ácido siálico, ICAM-5 u otros), permite el ingreso del virión a la célula a través de endocitosis mediada por receptores. Posteriormente el bajo pH del endosoma desencadena la desvoltura de la cápside viral provocando la liberación del ARN (Hu et al., 2020).

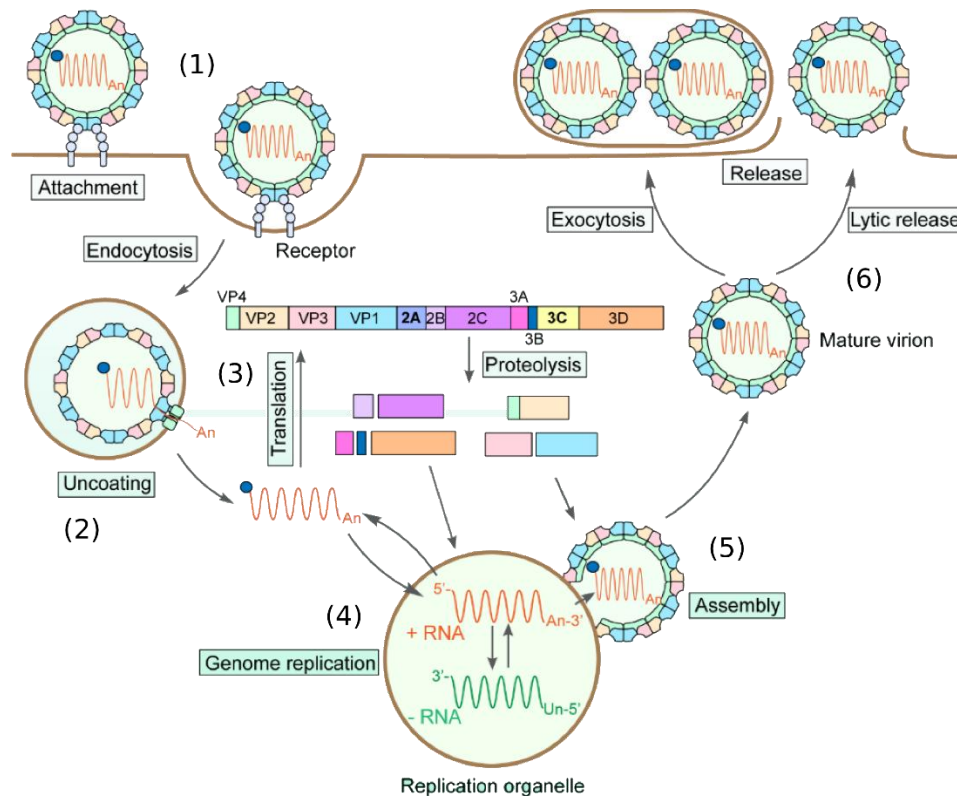


Figura 8: Ciclo de replicación viral de EV-D68: (1) Entrada en la célula mediante endocitosis mediada por receptores, (2) liberación del ARN viral, (3) traducción del ARN (+) para la síntesis de proteínas virales individuales, (4) síntesis de ARN (+) en el orgánulo de replicación mediada por la polimerasa 3D, (5) Ensamblaje del virión, (6) Maduración y liberación del virión por exocitosis o liberación lítica. Modificada de “Enterovirus D68 antivirals: past, present and future”, por Yanmei Hu a, Rami Musharrafieh, Madeleine Zheng, Jun Wang, ACS Infectious Diseases, 6(7), 1572-1586. doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00120

B. Traducción

El ARN viral es posteriormente traducido en una única poliproteína. Este proceso ocurre cuando el virus secuestra los ribosomas de la célula huésped, que se unen al IRES viral en el 5' UTR para iniciar la traducción de proteínas. La región codificante de proteínas dentro del ORF se traduce inicialmente en un único polipéptido viral en el que todas las proteínas virales están unidas. Luego, la poliproteína es escindida

por las proteasas virales 2A, 3C y su forma precursora 3CD en cuatro proteínas estructurales para la cápside del virus (VP1, VP2, VP3 y VP4) y siete proteínas de replicación nsp (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D) (Rahajamanana et al., 2025).

La primera escisión la realiza la proteasa viral 2A pro que escinde las proteínas estructurales de las proteínas nsp. Las proteasas virales 3C pro y 3CD pro luego escinden las proteínas estructurales en VP0, VP1 y VP3, junto con otros péptidos no estructurales intermedios y maduros. Por último, durante la maduración de la cápside viral, ocurre un evento de autoescisión, mientras que VP2 y VP4 se generan a partir de VP0. Cuando 3C pro alcanza una concentración suficientemente alta, un "cambio" finaliza la fase de traducción predominante (Grizer et al., 2024).

C. Replicación

La replicación del ARN la realiza la ARN polimerasa dependiente de ARN enteroviral, 3D pol . Primero se transcribe el ssARN de sentido positivo (+) a ssARN en sentido negativo (-). Este ARN en sentido negativo sirve como plantilla para la síntesis de nuevo ARN en sentido positivo, permitiendo la producción de múltiples copias de ssARN (+) genómico. La síntesis de la cadena negativa y la traducción del ARN no pueden ocurrir simultáneamente, presumiblemente porque los ribosomas y la ARN polimerasa no pueden atravesar el ARN viral en direcciones opuestas simultáneamente (Elrick et al., 2021).

Un aspecto crucial de la replicación es la formación de estructuras de membrana especializadas llamadas orgánulos de replicación, que son vesículas unidas a membranas simples y dobles que se derivan del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Rahajamanana et al., 2025). Estos orgánulos de replicación membranosos implican varias proteínas virales (2C y 3A) y factores del huésped (ACBD3, PI4KB y OSBP) que están involucrados en este proceso de remodelación de la membrana, permitiendo crear un entorno lipídico favorable para la replicación (Hu et al., 2020).

D. Liberación

El ensamblaje de los nuevos viriones implica encapsular el ARN en las proteínas estructurales, seguido de su maduración dentro de estructuras celulares llamadas auto fagosomas, que requieren un medio ácido para activarse, un paso crítico para que los viriones alcancen la infectividad (Kalam & Balasubramaniam, 2024). Finalmente, las proteínas de la cápside, junto con el ARN viral, se autoensamblan y salen de la célula huésped como viriones progenie ya sea a través de exocitosis o liberación lítica (Hu et al., 2020).

2.3.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DEL ENTEROVIRUS D68

La infección por EV-D68 causa enfermedades respiratorias de leves a graves, especialmente en niños pequeños con una edad media de 4 años. Se cree que durante una infección leve el virus infecta principalmente el tracto respiratorio superior, lo que produce fiebre y tos. Sin embargo, se observa una enfermedad respiratoria más grave cuando el virus se propaga al tracto respiratorio inferior, lo que produce disnea, neumonía con sibilancias e hipoxia, y ocasionalmente requiere asistencia respiratoria e ingreso en cuidados intensivos. Aunque las infecciones por EV-D68 se reportan predominantemente en niños, también se han reportado casos en adultos (Ayudhya et al., 2021).

Debido a que la infección por EV-D68 se asocia con síntomas inespecíficos que se superponen a otras infecciones respiratorias más comunes, es probable que la prevalencia general esté subestimada. También es probable que haya una gran proporción de infecciones clínicamente asintomáticas, especialmente en adultos sanos, lo que contribuye aún más a la subnotificación general. Además, es de particular preocupación para la salud pública mundial, la asociación de los brotes contemporáneos del EV-D68 con MFA (Vermillion et al., 2022).

La MFA es una enfermedad similar a la poliomielitis que afecta a las neuronas motoras inferiores en la materia gris de la médula espinal y se caracteriza por la aparición repentina de debilidad muscular, particularmente en los brazos o las piernas, con disminución del tono muscular y reflejos comprometidos, a veces

asociados con dificultad para tragar, caída de párpados y, en casos graves, insuficiencia respiratoria (Grizer et al., 2024). Sin embargo, si bien la MFA es una enfermedad grave, sigue siendo poco frecuente y sólo una pequeña cantidad de infecciones por EV-D68 progresan a MFA (Hu et al., 2020).

2.3.5 EPIDEMIOLOGÍA DEL ENTEROVIRUS D68

EV-D68 se aisló por primera vez en California en 1962 a partir de hisopos faríngeos de cuatro niños hospitalizados por enfermedad aguda grave de las vías respiratorias inferiores, denominadas cepas Fermon, Rhyne, Franklin y Robinson. Fermon sigue considerándose la cepa prototípica del EV-D68 (Elrick et al., 2021).

En el año 2014 ocurrió un brote en EE.UU. de casos de enfermedad respiratoria grave inducida por EV-D68 lo que llevó a 1153 casos confirmados, incluidas 14 muertes. Coincidiendo con este brote del EV-D68, se informaron 120 casos de MFA, lo que sugiere la asociación entre MFA y EV-D68. También se detectaron brotes del EV-D68 en los EE.UU en 2016 y 2018, acompañados de la identificación de 153 y 237 casos confirmados de MFA, respectivamente. Además, en los últimos años, el EV-D68 se ha extendido por todo el mundo, lo que ha provocado conglomerados o brotes de casos (Dai et al., 2023).

Los brotes de 2016 y 2018 se informaron en varias partes del mundo, incluyendo Europa, EE.UU., Sudamérica, Asia y África occidental. Estos también coincidieron con olas de MFA. Por lo tanto, la MFA principalmente asociada con EV-D68 ahora se reconoce como una enfermedad mundial, con cientos de casos notificados en Europa, Asia, Australia, África, América del Norte y América del Sur (Fall et al., 2022).

En Latinoamérica se han reportado pocos casos del EV-D68 antes de 2014. Durante 2014, se reportó un brote en la Ciudad de México, sin embargo, no se documentó una epidemia generalizada, como la ocurrida en EE.UU. (Vazquez-Perez et al., 2016). Durante ese año también se reportaron 2 casos del EV-D68 en Chile (Torres et al., 2015) y 4 en dos islas del Caribe (Nathaniel et al., 2017). Sin embargo, se conoce

poco sobre la circulación, la epidemiología y la filogenética del EV-D68 en Centroamérica .

Los primeros casos de infecciones por EV-D68 reportados por Panamá fueron a través de un estudio realizado durante los años de 2012-2013, en el que se analizaron muestras de niños hospitalizados con enfermedades respiratorias agudas. En este estudio se identificaron 17 casos positivos del EV-D68 en David, Panamá y estos tenían en común antecedentes de asma o sibilancias (Biggs et al., 2020).

2.4 DETECCIÓN MOLECULAR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó inicialmente para amplificar secuencias específicas de ADN y, desde entonces, se ha convertido en una de las herramientas de investigación más robustas en ciencias biológicas y medicina frente a métodos convencionales (Templeton, 1992). Sin embargo, dado que la PCR estándar no puede utilizarse de forma fiable para una cuantificación precisa, la técnica se perfeccionó, dando lugar a la potente herramienta analítica que ahora conocemos como reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Artika et al., 2022).

La detección de virus patógenos mediante PCR implica varios pasos. En primer lugar, se extrae, aísla y purifica el material genético de los virus de las muestras, que luego se transcriben de forma inversa utilizando una enzima ADN polimerasa dependiente de ARN que puede sintetizar ADNc utilizando ARN como plantilla. El ADNc monocatenario generado es luego convertido por la ADN polimerasa en un ADN bicatenario que luego es amplificado mediante la técnica de PCR (Artika et al., 2020).

El método de detección en tiempo real se basa en el uso de un tinte fluorescentes que se unan al ADNc a medida que se amplifica. SYBR® Green es el tinte más común y emite una señal fluorescente al intercalarse con ADN recién sintetizado. El segundo método de detección utiliza sondas de hidrólisis como las sondas TaqMan, diseñadas para hibridar con una región específica de la secuencia diana y dependen de la Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET).

El extremo 5' de la sonda está marcado con un reportero fluorescente y en el extremo 3' hay una molécula extintora (quencher) que impide la emisión de fluorescencia mientras la sonda está intacta (unida al ADN diana). A medida que la ADN polimerasa extiende el cebador, la sonda se escinde, lo que permite que la molécula reportera emita una señal fluorescente al separarse del quencher (Adams, 2020).

La cuantificación se realiza en función de los niveles de fluorescencia emitidos por las sondas o colorantes marcados. El valor del umbral de ciclo (Ct) representa el número de ciclos de amplificación necesarios para que la señal fluorescente de la muestra supere un umbral definido, lo que indica una amplificación detectable del ADN diana. Por lo que los valores bajos de Ct indican altas cantidades de ADN mientras que los valores altos de Ct indican bajas cantidades (Bong et al., 2024).

La aplicación de la PCR en tiempo real constituye una estrategia fundamental para la identificación precisa de agentes virales en muestras clínicas. En el presente estudio, esta herramienta será empleada para la detección molecular de los Coronavirus endémicos (229E, OC43, NL63 y HKU1), así como del Enterovirus D68. De esta manera, se busca garantizar una caracterización confiable de los agentes virales circulantes y aportar evidencia que contribuya al fortalecimiento de su epidemiología.

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo y descriptivo, basado en el análisis de muestras biológicas recolectadas por el Sistema Nacional de Vigilancia de Influenza y otros Virus Respiratorios en Panamá durante el año 2016.

3.2 POBLACIÓN Y CRITERIOS DE SELECCIÓN

3.2.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Muestras de hisopados nasofaríngeos recolectadas de pacientes que acudieron a las instalaciones de salud participantes del sistema de vigilancia, con sospecha de infección respiratoria.

3.2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Muestras de hisopados nasofaríngeos recibidas en el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) en el año 2016.
- Muestras que habían sido procesadas mediante el panel viral respiratorio rutinario del ICGES durante el año 2016.
- Para el estudio, se incluyó de forma aleatoria y por conveniencia el 30 % de las muestras con resultado positivo para alguno de los virus del panel y el 70% restante que fueran negativas a todos los virus testados en el panel respiratorio.

3.2.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Muestras que no contaban con la cantidad mínima de material biológico necesaria para su procesamiento.

3.3 SELECCIÓN DE MUESTRAS

Para este estudio, se seleccionaron retrospectivamente, por conveniencia, un total de 127 muestras de hisopados nasofaríngeos que habían sido previamente analizadas

mediante el panel viral respiratorio rutinario del ICGES, el cual detecta Influenza A (A/H1pdm, A/H3 y A/No tipificable), Influenza B (B/VIC y B/YAM), RSV, hMPV, Parainfluenza (PIV-1, PIV-2 y PIV-3), AdV y RV. De estas, el 70 % correspondió a muestras previamente reportadas como negativas en dicho panel y el 30 % a muestras previamente clasificadas como positivas para alguno de los virus detectados.

Las muestras con resultados positivos al panel viral respiratorio rutinario se incluyeron con el fin de evaluar la posible presencia de coinfecciones con otros virus respiratorios. Los datos de los resultados del panel viral respiratorio rutinario, junto con las características clínicas y demográficas de cada muestra, fueron tabulados para su análisis.

3.4 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LABORATORIO

Las muestras seleccionadas fueron procesadas mediante reacción en cadena de la polimerasa mediante la transcripción Inversa en tiempo real (RT-PCR en tiempo real) para la detección de los siguientes virus: Coronavirus endémicos humanos: CoVh-229E, CoVh-HKU1, CoVh-NL63, CoVh-OC43 y Enterovirus D68

Los procedimientos que se realizaron para la amplificación y detección de los virus mencionados, incluyeron controles positivos y negativos en cada corrida para garantizar la validez de los resultados y estos procedimientos se describen a continuación:

3.4.1 EXTRACCIÓN AUTOMATIZADA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se extrajeron los ácidos nucleicos de las 127 muestras seleccionadas utilizando el kit MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation mediante perlas magnéticas. La extracción se llevó a cabo en el equipo automatizado Thermo Scientific Kingfisher Flex, utilizando el programa MVP_2Wash_200_Flex. El ARN extraído fue eluido en un volumen final de 50 µL. El siguiente procedimiento de extracción fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante.

A. Preparación de reactivos para el equipo de extracción

Para iniciar el proceso de extracción de ácidos nucleicos, se roturaron 4 platos de 96 pocillos, uno para cada reactivo (tabla 1). Los reactivos se añadieron en reservorios y se sirvieron a los platos con micropipeta multicanal, agregando las cantidades que indica la tabla 1. La extracción se hizo en 2 lotes de muestras, para esto, se prepararon 2 platos de cada reactivo, según la cantidad de muestras por procesar. En el primer lote se procesaron 95 muestras y en el segundo se procesaron 32 muestras. En cada plato se incluyó 1 pocillo para utilizarlo como control negativo de reactivo.

B. Preparación de las muestras nasofaríngeas

Se preparó una plantilla para establecer el orden en el cual se iban a agregar las muestras en los platos. Las muestras se llevaron a una cabina de bioseguridad y se agregaron 200 uL de cada muestra por pocillo en el plato de la mezcla de unión, dejando un pocillo sin muestra como control negativo de reactivo.

C. Preparación del equipo de extracción

Las muestras se llevaron al equipo automatizado Thermo Scientific Kingfisher Flex y se seleccionó el programa MVP_2Wash_200_Flex. Una vez seleccionado, se colocó la placa de peine de punta (Tip comb plate) y se ingresaron los platos con los reactivos según el orden que indica el equipo (Tabla 1) para iniciar el proceso de extracción. Una vez finalizada la extracción (25 minutos aproximadamente), el plato de elución fue cubierto inmediatamente con una película adhesiva transparente MicroAmp™ para evitar la evaporación de las muestras y luego se almacenaron a -20° C.

Tabla 1. Reactivos para la extracción de los ácidos nucleicos

Orden de ingreso	Reactivos	Volumen de reactivo (µL)
1	Tampón de elución	50
2	Etanol 80 %	500
3	Solución de lavado	500

4	Mezcla de unión	280
---	-----------------	-----

Tabla 1. Reactivos utilizados en el programa MVP_2Wash_200_Flex durante el proceso de extracción de los ácidos nucleicos.

3.4.2 EXTRACCIÓN MANUAL DE ARN

Se extrajo de forma manual el ARN de una muestra positiva para CoVh-HKU1, con el fin de emplearla como control positivo en la detección de este virus. La extracción se realizó mediante columnas de sílice utilizando el Kit QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN). El ARN extraído fue eluido en un volumen final de 60 μ L. El siguiente procedimiento de extracción fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante.

A. Lisis

En un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL se agregaron 560 μ L de tampón AVL (contiene ARN transportador) y 140 μ L de la muestra y se mezcló en el vortex durante 15 segundos. Esto se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó brevemente el para eliminar las gotas del interior de la tapa.

B. Unión

Luego se añadieron 560 μ L de etanol al lisado y se mezcló mediante vórtex durante 15 segundos. Tras mezclar, se centrifugó brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa. Posteriormente se colocó una columna QIAamp Mini en un tubo de recolección de 2 mL y se añadieron 630 μ L de la solución con el lisado y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se colocó la columna en un tubo de recolección limpio de 2 mL y se desechó el tubo con el filtrado. Se repitió este paso añadiendo el volumen restante del lisado en la columna de centrifugación.

C. Lavados

Se añadieron 500 μ L de tampón AW1 y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min. Se colocó la columna en un tubo de recolección limpio de 2 mL y se desechó el tubo con el filtrado. Luego se añadieron 500 μ L de tampón AW2, se centrifugó a 14000 rpm

durante 3 min y se colocó la columna QIAamp Mini en un tubo de microcentrifuga limpio de 1.5 mL.

D. Elusión

Se añadieron 60 µL de tampón AVE y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Esto se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min, se desechó la columna y el ARN extraído se almacenó a -30°C .

Tabla 2: Reactivos para la extracción de ARN

Reactivos	Volumen de reactivo (µL)
Tampón AVL	560
Etanol 100%	560
Tampón AW1	500
Tampón AW1	500
Tampón AVE	60

Tabla 2. Reactivos y volúmenes utilizados durante el proceso de extracción manual con el kit QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN®).

3.4.3 DETECCIÓN DE CORONAVIRUS ENDÉMICOS MEDIANTE RT-PCR ANIDADA MULTIPLEX EN TIEMPO REAL

Se realizó una RT-PCR anidada multiplex en tiempo real de un solo paso para la detección de CoVh-229E, CoVh-NL63 y CoVh-OC43. Se utilizó como referencia el protocolo descrito por Zhao et al. (2020). Las muestras se procesaron en el equipo CFX96 Real-Time System utilizando el software CFX Maestro. Se utilizaron sondas Taqman marcadas con distintos fluoróforos para la identificación de cada virus. Para la detección de CoVh-229E se utilizó FAM, para CoVh-OC43 se utilizó Cy5 y para CoVh-NL63 se utilizó VIC. La secuencia de la sonda y los cebadores utilizados se muestran en la tabla.

A. Preparación de los reactivos para la amplificación

Cebadores:

Los cebadores internos y externos de cada virus (tabla 3) estaban a una concentración inicial de 100 μ M y 200 μ M, por lo que se prepararon alícuotas de trabajo a 10 μ M para cada uno de estos cebadores, esto se realizó aplicando la fórmula de dilución $C1V1=C2V2$, donde C1 corresponde a la concentración inicial de los cebadores (100/200 μ M), C2 a la concentración final deseada (10 μ M), V2 al volumen final de dilución (100 μ L) y V1 al volumen requerido de la solución original de los cebadores (5 μ L). La dilución se realizó agregando 5 μ L de los cebadores en 95 μ L de agua grado molecular. Los cebadores diluidos se mezclaron en el vórtex y se colocaron en la centrifuga (spin). Ejemplo:

$$C1V1 = C2V2$$

$$V1 = \frac{C2V2}{C1}$$

$$C1$$

$$V1 = \frac{10 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{L}}{200 \mu\text{M}}$$

$$200 \mu\text{M}$$

$$V1 = 5 \mu\text{L}$$

Luego se preparó un mix con los cebadores de cada virus previamente diluidos, agregando cada uno en la misma cantidad dependiendo del volumen final requerido en las reacciones de PCR. Esto se mezcló en el vórtex y se colocó en la centrifuga (spin). Los cebadores diluidos y las mezclas de cebadores fueron almacenadas a -30° C.

Tabla 3: Información sobre los cebadores utilizados para la detección de CoVh-229E, CoVh-NL63 y CoVh-OC43

Cebador	Secuencias (5' - 3')	Gen
CoVh-229E		
HCoV-229E-outer F	CA+GT+CAAAT+GGGCTGATGCA	N

HCoV-229E-outer R	A+CGA+GAA+GG+CTTAGGAGTAC	
HCoV-229E-inner F	ATGAGGCTATTCCGACTAGG	
HCoV-229E-inner R	AAAGGGCTATAAAGAGAATAAGGTATTCT	
CoVh-OC43		
HCoV-OC43-outer F	ATT+GCA+CCA+GGAGTCCCA	N
HCoV-OC43-outer R	TT+CC+T+GA+GC+CTT+CAATATAGTAAC	
HCoV-OC43-inner F	ATGAGGCTATTCCGACTAGG	
HCoV-OC43-inner R	TTCCTGAGCCTTCAATATAGTAAC	
CoVh-NL63		
HCoV-NL63-outer F	A+GATGA+GCA+GATT+GGTTATTGG	N
HCoV-NL63-outer R	ATTACGTTT+GC+GATTA+C+CAAGACT	
HCoV-NL63-inner F	GACCTTAAATTCAGACAACGTTCT	
HCoV-NL63-inner R	ATTACGTTT+GC+GATTACCAAGACT	

Tabla 3. Cebadores descritos por Zhao et al. (2020). Outer F (cebador externo forward), Outer R (cebador externo reverse), inner F (cebador interno forward), inner R (cebador interno reverse), N (Nucleocápside), pb (pares de bases), + (nucleótidos con modificación LNA/Locked Nucleic Acid).

Sondas:

Las sondas para la identificación de cada virus en la PCR multiplex (tabla 4) estaban a una concentración inicial de 100 µM, por lo que estos se diluyeron a 10 µM para la preparación de las alícuotas de trabajo. Esto se realizó aplicando la fórmula de dilución $C1V1=C2V2$, donde C1 corresponde a la concentración inicial de las sondas (100 µM), C2 a la concentración final deseada (10 µM), V2 al volumen final de dilución

(100 µL) y V1 al volumen requerido de la solución original de los cebadores (10 µL). Se prepararon de la siguiente forma:

Se agregaron 10 µL de los cebadores en 90 µL de agua grado molecular. Los cebadores diluidos se mezclaron en el vórtex y se colocaron en la centrifuga (spin).

$$C1V1 = C2V2$$

$$V1 = \frac{C2V2}{C1}$$

$$C1$$

$$V1 = \frac{10 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{L}}{100 \mu\text{M}}$$

$$V1 = 10 \mu\text{L}$$

Luego se preparó un mix con las 3 sondas de cada virus previamente diluidas, agregando cada una en la misma cantidad. El volumen de cada sonda añadida se calculó en función al volumen final de cebadores requeridos en las reacciones de PCR.

Tabla 4. Sondas utilizadas en la detección de CoVh-229E, CoVh-NL63 y CoVh-OC43

Sonda	Secuencias (5' - 3')
HCoV-229E-Sonda	FAM-CCCTGACGACCACGTTGTGGTTCA-BHQ1
HCoV-OC43-Sonda	CY5-TCCGCCTGGCACGGTACTCCCT-BHQ3
HCoV-NL63-Sonda	VIC-TAACAGTTTTAGCACCTTCCTTAGCAACCCAAACA-BHQ1

Tabla 4. Se emplearon sondas tipo TaqMan, previamente descritas por Zhao et al. (2020). Estas sondas están constituidas por oligonucleótidos marcados con un fluoróforo en el extremo 5' y un extintor de fluorescencia (quencher) en el extremo 3', en este caso BHQ (Black Hole Quencher), el cual absorbe la energía emitida por el fluoróforo e impide su señal hasta que ocurre la amplificación específica.

B. Procesamiento de las muestras

Se prepararon plantillas para establecer la cantidad y el orden de las muestras que se iban a procesar en cada lote. Debido a la cantidad de muestras, estas fueron divididas en 2 lotes para la detección de cada virus.

Primero se prepararon mezclas de reacción con los componentes mostrados en la tabla 5, según la cantidad de reacciones, incluyendo los controles positivos y negativos. Esta mezcla se sirvió en placas de 96 pocillos, y se agregó el volumen del mix por reacción (8 μL). Las placas fueron llevadas a otra cabina de bioseguridad para servir las muestras.

Las muestras se llevaron a una cabina de bioseguridad y se agregaron 2 μL en cada pocillo del plato con la mezcla de reacción para completar el volumen final de 10 μL . Se incluyó un control positivo para cada Coronavirus al mismo volumen que el resto de las muestras y se utilizaron reacciones del mix sin muestra como control negativo de reactivo. Los platos de 96 pocillos se sellaron para evitar la evaporación de las muestras durante su procesamiento y se centrifugaron (spin) para evitar la formación de burbujas.

Tabla 5: Componentes de la mezcla de reacción de la RT-PCR anidada múltiple en tiempo real de un solo paso

Componentes de la mezcla de reacción	Volumen de reactivos y muestra (μL)
H ₂ O libre de nucleasas	1,5
Master Mix 2X	5,0
Mezcla de todos los cebadores a 10 μM	0,5
Mezcla de todas las sondas 10 μM	0,5
Mix de enzimas	0,5
ARN (extraído) / Control positivo /	2,0

Control negativo	
Volumen final	10 µL

Tabla 5. Mezcla de reacción utilizada para la detección de los Coronavirus endémicos CoVh-229E, CoVh-NL63 y CoVh-OC43.

C. Preparación del termociclador en tiempo real

Los platos se colocaron en el equipo CFX96 Real-Time System y se inició el software CFX Maestro para la configuración de la plantilla con las muestras, seleccionar los fluoróforos correspondientes para la detección de cada virus y establecer el programa de temperatura (Tabla 6) para la retrotranscripción del ARN y la amplificación del ADNc.

Tabla 6: Programa de amplificación usado para la detección de CoVh-229E, CoVh-NL63 y CoVh-OC43


Pasos	Cantidad de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Transcripción inversa	1	50° C	30 min
Inactivación de la retro transcriptasa	1	95° C	15 min
Desnaturalización	10	94° C	30 seg
Hibridación		64° C	40 seg
Extensión		72° C	40 seg
Desnaturalización	40	94° C	30 seg
Hibridación		54° C 	30 seg
Extensión		72° C	30 seg

Tabla 6. Los primeros 10 ciclos corresponden a la amplificación del gen N por los cebadores externos y los siguientes 40 ciclos corresponden a la amplificación del gen N

por los cebadores internos. La lectura de la fluorescencia ocurre en el paso de la hibridación (54°C).

3.4.4 DETECCIÓN DEL CORONAVIRUS ENDÉMICO HKU1 POR RT-PCR EN TIEMPO REAL

Se realizó una RT-PCR en tiempo real de un sólo paso para la detección de CoVh-HKU1. Las muestras se procesaron en el equipo Quant Studio™ 5 utilizando el software Quant Studio™ Design & Analysis Software v 1.5.1. Se utilizaron cebadores y sondas del CDC (Atlanta, Georgia). Las sondas para la identificación de CoVh-HKU1 estaban marcadas con el fluoróforo ROX.

A. Preparación de los reactivos para la amplificación

Cebadores:

Los cebadores forward y reverse del virus estaban a una concentración inicial de 200 µM, por lo que se prepararon alícuotas de trabajo a 10 µM para cada uno de estos cebadores. El cálculo de los volúmenes necesarios se realizó aplicando la fórmula de dilución $C_1V_1=C_2V_2$, donde C_1 corresponde a la concentración inicial del cebador (200 µM), C_2 a la concentración final deseada (10 µM), V_2 al volumen final de la dilución (200 µL) y V_1 al volumen requerido de la solución original del cebador (10 µL). La dilución se realizó agregando 10 µL de los cebadores forward y reverse en 190 µL de agua grado molecular. Los cebadores diluidos se mezclaron en el vórtex, se colocaron en la centrifuga (spin) y se almacenó a -30° C.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{10 \mu\text{M} \times 200 \mu\text{L}}{200 \mu\text{M}}$$

$$V_1 = 10 \mu\text{L}$$

Sondas:

Las sondas para la identificación de este virus estaban a una concentración inicial de 100 µM, por lo que estos se diluyeron a 10 µM para la preparación de las alícuotas de trabajo. Los cálculos se realizaron aplicando la fórmula de dilución $C_1V_1=C_2V_2$ para determinar los volúmenes requeridos, donde C1 corresponde a la concentración inicial de la sonda (100 µM), C2 a la concentración final deseada (10 µM), V2 al volumen final de la dilución (100 µL) y V1 al volumen requerido de la solución original de la sonda. La dilución se preparó agregando 10 µL de la sonda en 90 µL de agua grado molecular. La sonda diluida se mezcló en el vórtex, se colocó en la centrifuga (spin) y se almacenó a -30°C.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{10 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{L}}{100 \mu\text{M}}$$

$$V_1 = 10 \mu\text{L}$$

B. Procesamiento de las muestras

Se prepararon plantillas para establecer la cantidad y el orden de las muestras que se iban a procesar en cada lote. Estas se dividieron en 2 lotes para la detección del virus.

Primero se prepararon mezclas de reacción con los componentes mostrados en la tabla 7, según la cantidad de muestras por procesar, incluyendo reacciones para los controles positivos y negativos. Esta mezcla se sirvió en placas de 96 pocillos, agregando el volumen del mix por reacción (20 µL). Las placas fueron llevadas a otra cabina de bioseguridad para servir las muestras y completar el volumen final de 25 µL.

Luego las muestras fueron llevadas a otra cabina de bioseguridad para agregar 5 μ L de las muestras en cada pocillo del plato con la mezcla de reacción para completar el volumen final de 25 μ L. Se incluyó un control positivo para este virus, al mismo volumen que el resto de las muestras y se utilizaron reacciones del mix sin muestra como control negativo de reactivo.

Los platos de 96 pocillos se sellaron para evitar la evaporación de las muestras durante su procesamiento y se centrifugaron (spin) para evitar la formación de burbujas.

Tabla 7: Componentes de la mezcla de reacción para la detección de CoVh-HKU1

Componentes mezcla de reacción	Volumen de reactivos y muestra (μL)
H2O libre de nucleasas	4,5
Master Mix 2X	12,5
Primer Forward a 10 μ M	1,0
Sonda 5 μ M	0,5
Primer Reverse a 10 μ M	1,0
Mix de enzimas	1,0
ARN extraído/ Control positivo/ Control negativo	5,0
Volumen final	25 μL

C. Preparación del termociclador en tiempo real

Los platos se colocaron en el equipo CFX96 Real-Time System y se inició el software CFX Maestro para la configuración de la plantilla con las muestras, seleccionar los fluoróforos correspondientes para la detección de cada virus y establecer el programa

de temperatura (tabla 8) para la retrotranscripción del ARN y la amplificación del ADNc.

Tabla 8: Programa de amplificación usado para la detección de CoVh-HKU1


Pasos	Cantidad de ciclos	Temperatura	Tiempo
Transcripción inversa	1	50 °C	10 min
Inactivación de RT/desnaturalización inicial	1	95°C	10 min
Amplificación	45	95°C 60 °C 	15 seg 1 min

Tabla 8. La lectura de la fluorescencia ocurre en el paso de la hibridación/extensión a 60° C.

3.4.5 DETECCIÓN DEL EV-D68 POR RT-PCR EN TIEMPO REAL

Se realizó una RT-PCR en tiempo real de un sólo paso, utilizando como referencia el protocolo descrito por Piralla et al. (2015). Las muestras se procesaron en el equipo Quant Studio™ 5 utilizando el software Quant Studio™ Design & Analysis Software v 1.5.1. La sonda y los cebadores utilizados se muestran en la tabla 9. Se utilizaron sondas marcadas con FAM para la identificación del EV-D68.

A. Preparación de los reactivos para la amplificación

Cebadores:

Los cebadores forward y reverse del virus estaban a una concentración inicial de 100 µM, por lo que se prepararon alícuotas de trabajo a 10 µM para cada uno de estos cebadores. El cálculo de los volúmenes necesarios se realizó aplicando la fórmula de

dilución $C_1V_1=C_2V_2$, donde C_1 corresponde a la concentración inicial del cebador (100 μM), C_2 a la concentración final deseada (10 μM), V_2 al volumen final de la dilución (100 μL) y V_1 al volumen requerido de la solución original del cebador (10 μL). Se diluyeron de la siguiente forma:

Se agregaron 10 μL de los cebadores forward y reverse en 190 μL de agua grado molecular. Los cebadores diluidos se mezclaron en el vórtex, se colocaron en la centrifuga (spin) y se almacenó a -30°C .

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{10 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{L}}{100 \mu\text{M}}$$

$$V_1 = 10 \mu\text{L}$$

Sondas:

Las sondas para la identificación del virus estaban a una concentración inicial de 100 μM , por lo que se prepararon alícuotas de trabajo a 5 μM . El cálculo de los volúmenes necesarios se realizó aplicando la fórmula de dilución $C_1V_1=C_2V_2$, donde C_1 corresponde a la concentración inicial de la sonda (100 μM), C_2 a la concentración final deseada (5 μM), V_2 al volumen final de la dilución (100 μL) y V_1 al volumen requerido de la solución original del cebador (5 μL). Se diluyeron de la siguiente forma:

Se agregó 5 μL de la sonda en 95 μL de agua grado molecular. Las sondas diluidas se mezclaron en el vórtex, se colocaron en la centrifuga (spin) y se almacenó a -30°C .

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{5 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{L}}{100 \mu\text{M}}$$

100 μ M

V1 = 5 μ L

Tabla 9: Cebadores y sondas utilizadas en la detección del EV-D68

cebadores y sonda	Secuencia (5' a 3')	Región que se amplifica
EV-D68Pavia-For	GGCGGCCTACTCATGG	5'UTR
EV-D68Pavia-Rev	AGACTCTTCACACCTTGTTTCATGT	
EV-D68Pavia-Probe	^b FAM-AAAACCATGAGACGCT-MGB	

Tabla 9. For (Forward), Rev (Reverse), ^bFAM (6-carboxifluoresceína), MGB (ligante de ranura menor), UTR (Untranslated region/Región no traducida).

B. Procesamiento de las muestras

Las muestras se procesaron en grupos o lotes. Para ello se prepararon plantillas para establecer la cantidad y el orden de las muestras que se iban a procesar, las cuales se dividieron en 2 lotes para la detección de este virus. Las muestras se llevaron a una cabina de bioseguridad y se agregaron 5 μ L en cada pocillo del plato con la mezcla de reacción. Se incluyó un control positivo para este virus, al mismo volumen que el resto de las muestras y se utilizaron reacciones del mix sin muestra como control negativo de reactivo. Los platos de 96 pocillos se sellaron para evitar la evaporación de las muestras durante su procesamiento y se centrifugaron (spin) para evitar la formación de burbujas.

Tabla 10: Componentes de la mezcla de reacción para la detección del EV-D68

Componentes mezcla de reacción	Volumen de reactivos y muestra (μ L)
H2O libre de nucleasas	4,5
Master Mix	12,5

EV-D68 Forward a 10 µM	0,5
EV-D68 Reverse a 10 µM	0,5
EV-D68 Sonda 5 µM	0,5
Mix de enzimas	1,0
ARN extraído/ Control positivo/ Control negativo	5,0
Volumen final	25 µL

C. Preparación del termociclador en tiempo real

Los platos se colocaron en el equipo CFX96-Real-Time System y se inició el software CFX Maestro para la configuración de la plantilla con las muestras, seleccionar el fluoróforo correspondiente para la detección del virus y establecer el programa de temperaturas (tabla 11) para la retrotranscripción del ARN y la amplificación del ADNc.

Tabla 11: Programa de amplificación usado para la detección del EV-D68


Pasos	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Transcripción inversa	1	45° C	15 min
Inactivación de RT/desnaturalización inicial	1	95° C	10 min
Amplificación	45	95° C 60° C 	15 seg 45 seg

Tabla 11. Programa de temperaturas utilizado para la retrotranscripción y amplificación en un sólo paso de la región 5` UTR para la detección del EV-D68. La lectura de la fluorescencia se registra durante el paso de la hibridación/extensión a los 60° C.

3.5 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

El análisis de los resultados obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real se basó en los valores de Ct generados tras la amplificación de cada muestra. En primer lugar, se evaluaron los controles positivos y negativos de cada corrida para validar los resultados. Posteriormente, se consideraron como positivas aquellas muestras o controles con un valor de $Ct \geq 35$ ciclos. Adicionalmente, para todas las muestras y controles con $Ct \geq 35$, se evaluó la morfología de la curva de amplificación, considerándose un resultado positivo válido únicamente cuando se observó una curva sigmoidea característica. Las muestras que presentaron curvas irregulares fueron interpretadas como negativas.

3.6 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Primero se realizó un análisis descriptivo de las frecuencias de detección, para evaluar la cantidad de muestras que resultaron positivas de cada virus. Posteriormente los resultados fueron estratificados según variables clínicas y demográficas, incluyendo datos de edad, frecuencia de los síntomas, distribución geográfica (provincias y comarcas) y desenlace clínico de los pacientes (hospitalizados y ambulatorios). Para esto se construyeron gráficos en los cuales se incluyeron tanto las muestras positivas como las muestras negativas, lo que permitió describir la población estudiada, identificar posibles sesgos en la distribución de las muestras y contextualizar los resultados en función al total de muestras de la cohorte de estudio. También se evaluaron los casos de coinfección obtenidos, considerando la edad de los pacientes, los síntomas presentados y su evolución clínica, con el fin de describir las características de estos casos dentro de la población evaluada.

3.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Esta investigación fue revisada y aprobada por el Comité de Bioética de la Investigación del ICGES, bajo el protocolo de “Investigación para el fortalecimiento en la vigilancia epidemiológica de Influenza y otros virus respiratorios en Panamá” con el N° 272/CBI/ICGES/24. Toda la información de identificación personal fue anonimizada para garantizar la confidencialidad de la información y el resguardo de los datos de los participantes en todo momento.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos tras las pruebas de RT-PCR en tiempo real para la detección de los Coronavirus endémicos y de Enterovirus-D68. Los resultados fueron validados incluyendo controles positivos y controles negativos de reactivo. La detección fue cualitativa (presencia o ausencia) y se basó en la fluorescencia generada por las sondas marcadas con los fluoróforos FAM (CoVh-229E / EV-D68), VIC (CoVh-NL63), Cy5 (CoVh-OC43) y ROX (CoVh-HKU1) para los diferentes virus en sus respectivas reacciones de amplificación. Las muestras y controles se consideraron positivas si el valor de Ct no era ≥ 35 ciclos. Los resultados se muestran en curvas de amplificación extraídas de los softwares CFX Maestro y Quant Studio™ Design & Analysis v1.5.1 en escala lineal y logarítmica, así como gráficos y tablas de los porcentajes de detección y las características clínicas y demográficas de las muestras.

4.1 DETECCIÓN DE CORONAVIRUS ENDÉMICOS POR RT-PCR ANIDADA MULTIPLEX EN TIEMPO REAL (CoVh-229E, CoVh-OC43, CoVh-NL63)

Los resultados de las pruebas de detección evidenciaron la presencia de CoVh-229E y CoVh-OC43, mientras que CoVh-NL63 no fue detectado en ninguna de las muestras (Tabla 12). De las 127 muestras analizadas, 6 resultaron positivas, las cuales se distribuyeron en 3 positivas para CoVh-229E (Figura 7 y 8) y 3 para CoVh-OC43 (Figura 9 y 10). Lo que resulta en un 95,28% (n=121) de muestras negativas que no fueron detectadas para ninguno de estos 2 Coronavirus endémicos (Gráfico 1). En la Tabla 13 se presentan los valores de Ct obtenidos en la detección de los Coronavirus endémicos 229E y OC43.

Tabla 12. Resultados de detección de CoVh-229E, CoVh-OC43 y CoVh-NL63

Virus	Muestras positivas	Muestras negativas
CoVh-229E	3	124
CoVh-OC43	3	124
CoVh-NL63	0	127

Gráfico 1. Frecuencia de detección de los Coronavirus endémicos en Panamá en el año 2016 (n=127)

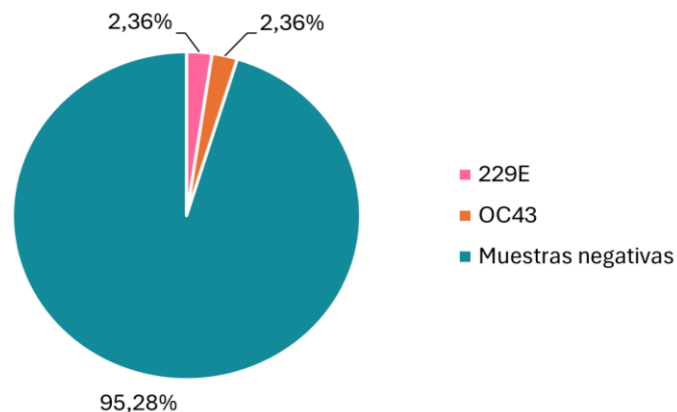


Gráfico 1. Distribución porcentual de los resultados positivos y negativos para los Coronavirus endémicos CoVh-229E y CoVh-OC43 en las 127 muestras analizadas. El color rosado representa los casos positivos para CoVh-229E (n=3), el color naranja los casos positivos para CoVh-OC43 (n=3) y el color turquesa los resultados negativos para estos Coronavirus endémicos (n=121).

Figura 9. Resultados de amplificación de CoVh-229E, lote 1

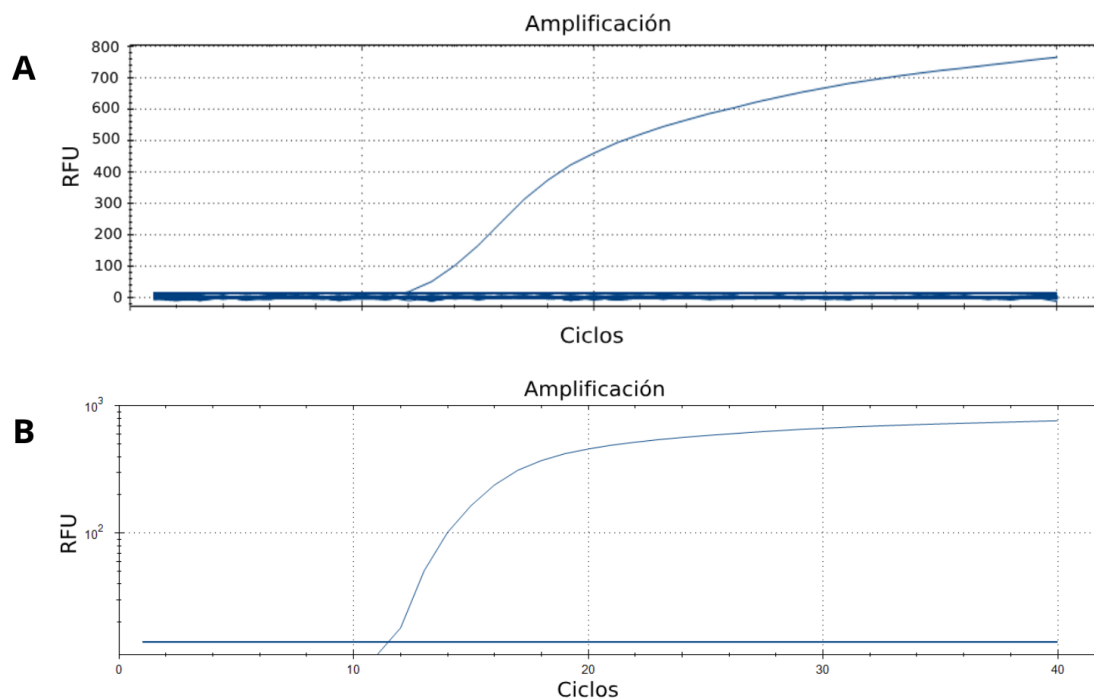


Figura 9 . Curvas de amplificación correspondientes a la muestra 319735, con un valor de Ct de 11.73. La detección se realizó mediante una sonda marcada con el fluoróforo FAM. Se presentan gráficos en escala lineal (A) y gráficos en escala logarítmica (B). Ambas figuras fueron extraídas del software CFX Maestro, en donde el eje X muestra el número de ciclos

de amplificación y el eje Y las unidades relativas de fluorescencia (RFU). Los controles positivos utilizados en esta corrida no mostraron señal de amplificación.

Figura 10. Resultados de amplificación de CoVh-229E, lote 2

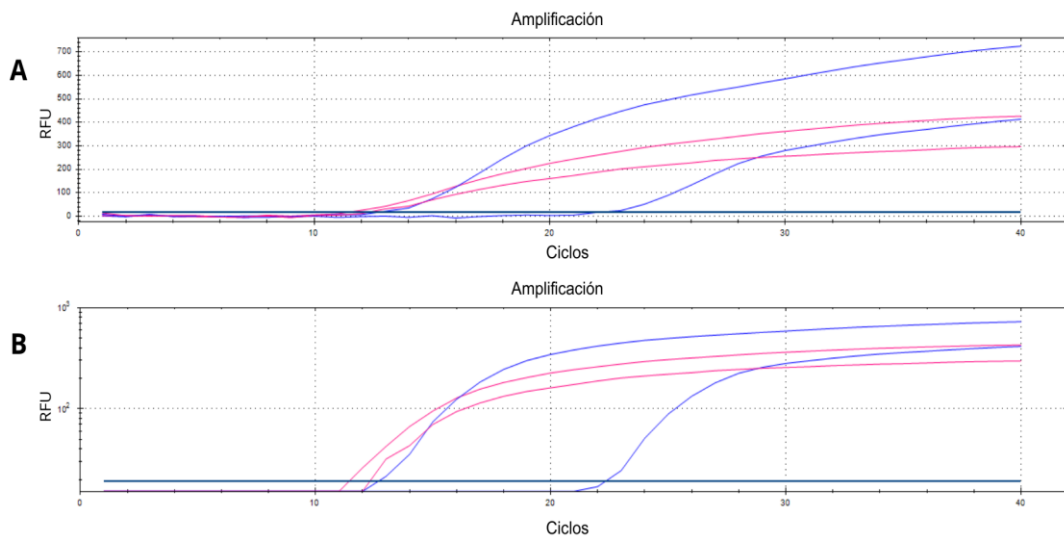


Figura 10. Curvas de amplificación correspondientes a la muestra 318648 (Curva de la derecha) con un Ct de 23,22 y a la muestra 318669 (Curva de la izquierda) con un Ct de 14,00. La detección se realizó mediante una sonda marcada con el fluoróforo FAM. Se presentan gráficos en escala lineal (A) y gráficos en escala logarítmica (B) que fueron extraídos del software CFX Maestro, en donde el eje X muestra el número de ciclos de amplificación y el eje Y las RFU. Las curvas azules indican muestras positivas para CoVh-229E, mientras que las curvas rosadas indican la amplificación de los controles positivos.

Figura 11. Resultados de amplificación de CoVh-OC43, lote 1

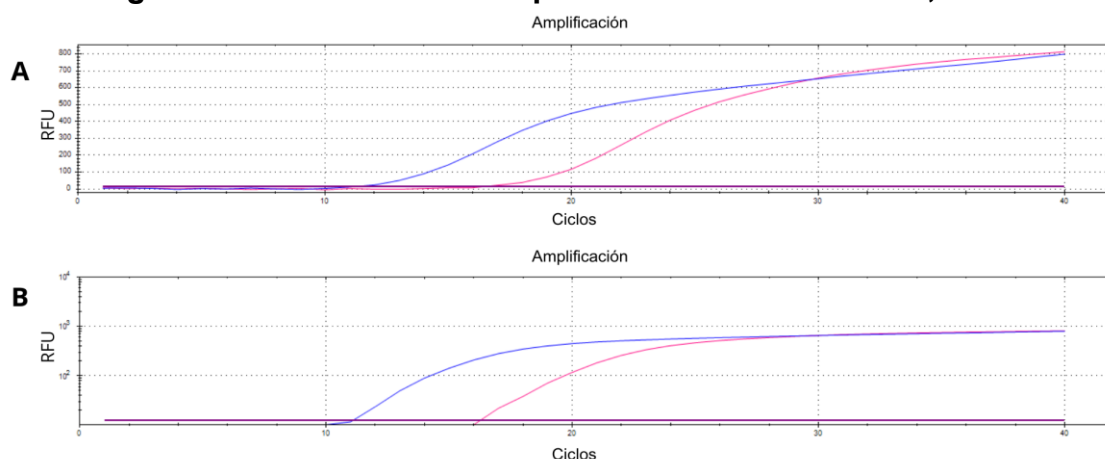


Figura 11 . Curvas de amplificación correspondientes a la muestra 318099 con un Ct de 13,54. La detección se realizó mediante una sonda marcada con el fluoróforo Cy5. Se presentan gráficos en escala lineal (A) y gráficos en escala logarítmica (B) que fueron extraídos del software CFX Maestro, en donde el eje X muestra el número de ciclos de

amplificación y el eje Y las RFU. La curva en color azul indica la muestra positiva para CoVh-OC43, mientras que la curva rosada indica la amplificación del control positivo.

Figura 12. Resultados de amplificación de CoVh-OC43, lote 2

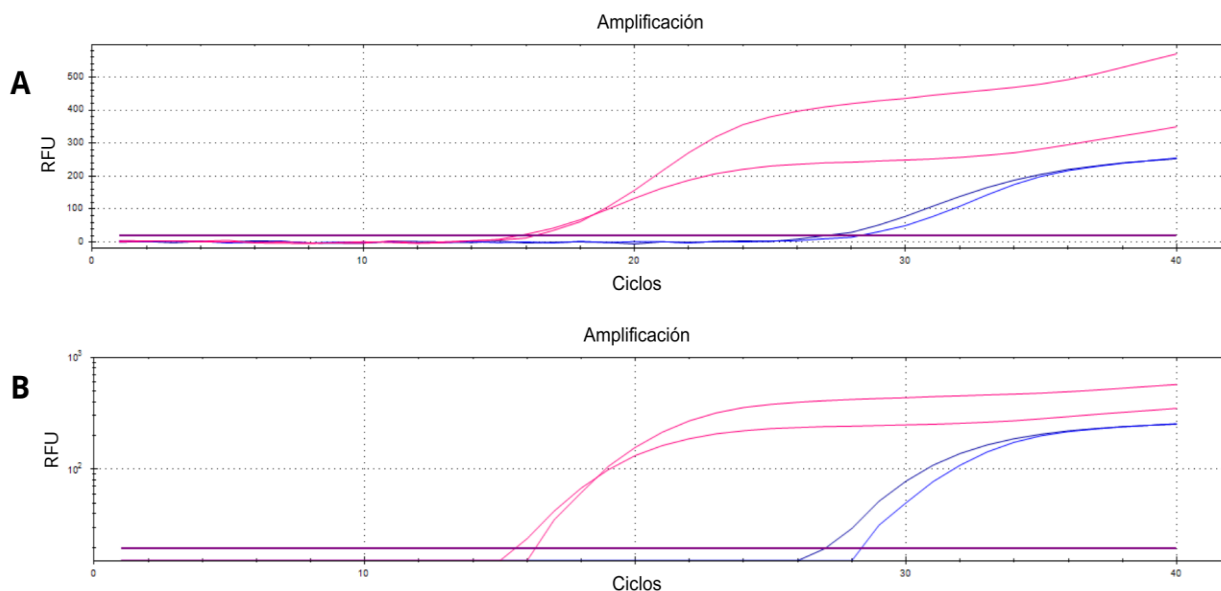


Figura 12. Curvas de amplificación correspondientes a las muestras 318087 (Curva de la izquierda) con un Ct de 28,00 y 318750 (Curva de la derecha) con un Ct de 29,00. La detección se realizó mediante una sonda marcada con el fluoróforo Cy5. Se presentan gráficos en escala lineal (A) y gráficos en escala logarítmica (B) que fueron extraídos del software CFX Maestro, en donde el eje X muestra el número de ciclos de amplificación y el eje Y las RFU. Las curvas azules indican muestras positivas para CoVh-OC43, mientras que las curvas rosadas indican la amplificación de los controles positivos.

Tabla 13: Valores de Ct obtenidos en las pruebas de detección de los Coronavirus endémicos 229E y OC43

Número de muestras	Código de muestras	Ct	Virus
1	319735	11.73	CoVh-229E
2	318648	23.22	
3	318669	14	
4	318087	28	CoVh-OC43

5	318099	13.54	
6	318750	29	

Por otro lado, no se detectó la presencia de CoVh-NL63 en ninguna de las muestras procesadas; únicamente se observó amplificación de los controles positivos (Figura 13), mientras que el control negativo permaneció sin amplificación. Esto indica que las condiciones de la reacción de PCR fueron adecuadas y que el sistema de detección funcionó correctamente, validando los resultados negativos obtenidos.

Figura 13. Resultados de amplificación de CoVh-NL63, lote 1

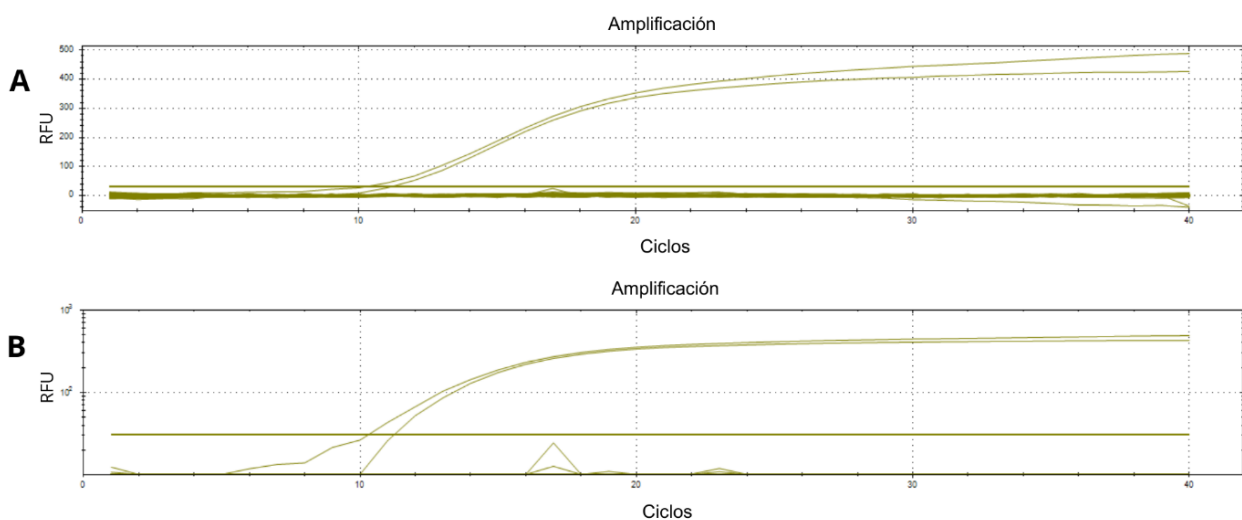


Figura 13. Curvas de amplificación correspondientes a los controles positivos de CoVh-NL63 por duplicado, detectados mediante una sonda marcada con el fluoróforo VIC. Se presentan gráficos en escala lineal (A) y gráficos en escala logarítmica (B). Las figuras fueron extraídas del software CFX Maestro, en donde el eje X representa el número de ciclos de amplificación y el eje Y las RFU. Las muestras negativas permanecieron sin señal de amplificación, manteniéndose en la línea basal durante cada ciclo.

Las 127 analizadas tuvieron la siguiente distribución en los grupos etarios: <5 años (n=82), 5-18 años (n=9), >18 años (n=36). De las muestras positivas de CoVh-229E, 2 pertenecían a adultos mayores de 18 años y 1 a un niño <5 años (Gráfico 2). Mientras que de las muestras positivas de CoVh-OC43, 2 de ellas pertenecían a niños <5 años y 1 a un adulto >18 años (Gráfico 3).

Gráfico 2. Distribución de CoVh-229E según grupo etario en las muestras analizadas del año 2016 en Panamá (n=127)

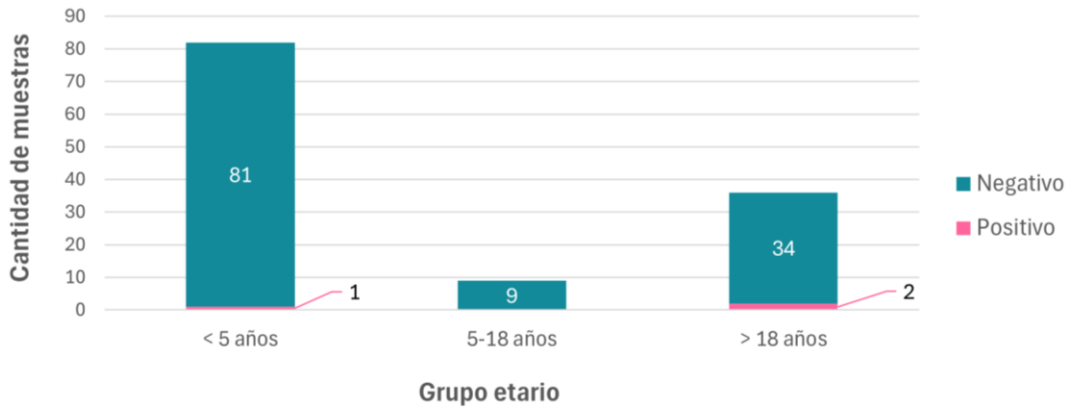


Gráfico 2. Distribución de las muestras positivas de CoVh-229E por grupo etario, respecto al total de muestras en cada grupo de la cohorte de estudio. Las barras turquesas indican las muestras negativas y las barras rosadas las muestras positivas.

Gráfico 3. Distribución de CoVh-OC43 según grupo etario en las muestras analizadas del año 2016 en Panamá (n=127)

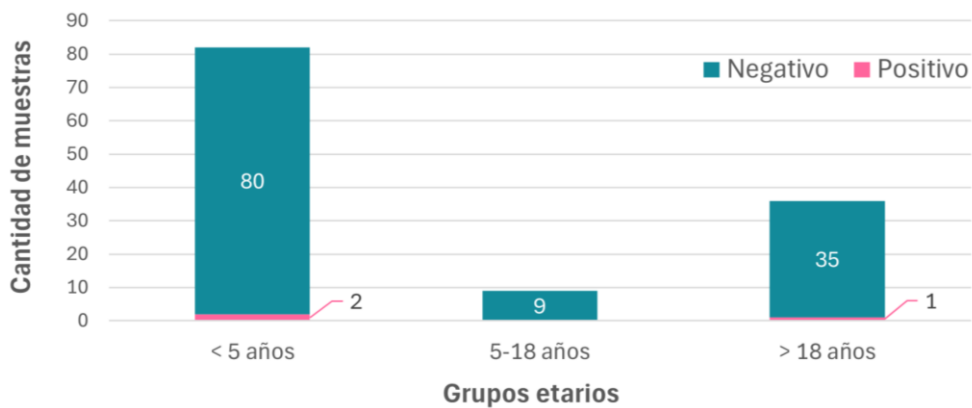


Gráfico 3. Distribución de las muestras positivas de CoVh-OC43 por grupo etario, respecto al total de muestras en cada grupo de la cohorte de estudio. Las barras turquesas indican las muestras negativas y las barras rosadas las muestras positivas.

La distribución geográfica de las muestras positivas de CoVh-229E fue de 1 en la provincia de Colón, 1 en la provincia de Los Santos y 1 en la provincia de Panamá (Gráfico 4). Mientras que las muestras positivas detectadas para CoVh- OC43 tuvieron una distribución de 1 caso en la provincia de Darién y 2 en la provincia de Panamá (Gráfico 5).

Gráfico 4. Distribución geográfica de CoVh-229E en las muestras analizadas del año 2016 en Panamá (n=126)

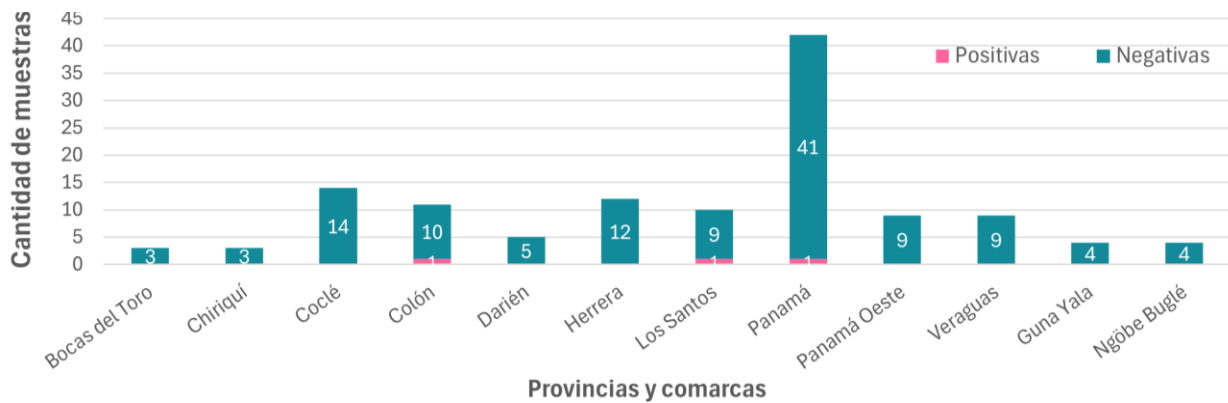


Gráfico 4. Distribución de las muestras positivas de CoVh-229E según provincias y comarcas. 1 muestra con información faltante no fue incluida dentro de este análisis. Las barras turquesas indican las muestras negativas y las barras rosadas las muestras positivas.

Gráfico 5. Distribución geográfica de CoVh-OC43 en las muestras analizadas del año 2016 en Panamá (n=126)

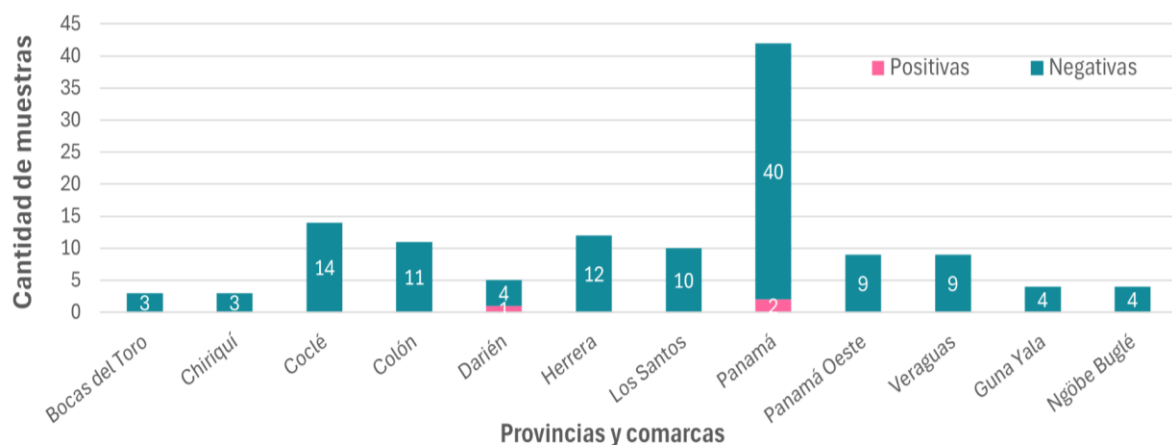


Gráfico 5. Distribución de las muestras positivas de CoVh-OC43 según provincias y comarcas. 1 muestra con información faltante no fue incluida dentro de este análisis. Las barras turquesas indican las muestras negativas y las barras rosadas las muestras positivas.

De las 127 muestras seleccionadas, 2 corresponden a pacientes fallecidos, 106 a sujetos hospitalizados y recuperados y 19 a sujetos recuperados sin hospitalización (Ambulatorios). De estas, 2 muestras de sujetos hospitalizados y 1 de un ambulatorio fueron detectadas con CoVh-229E (Gráfico 6). Mientras que 2 de las muestras de sujetos ambulatorios y 1 de un hospitalizado fueron detectadas con CoVh-OC43 (Gráfico 7).

Gráfico 6. Distribución de los casos positivos de CoVh-229E según el desenlace clínico del paciente al momento de la recolección (n=127)

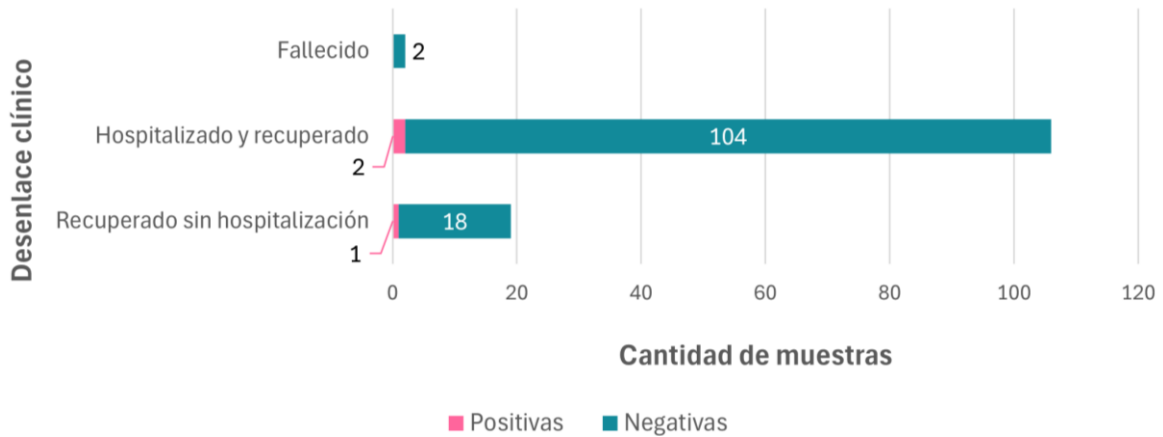


Gráfico 6. Distribución de las muestras positivas de CoVh-229E según pacientes hospitalizados y ambulatorios. Las barras turquesas indican las muestras negativas y las barras rosadas las muestras positivas.

Gráfico 7. Distribución de los casos positivos de CoVh-OC43 según el desenlace clínico del paciente al momento de la recolección (n=127)

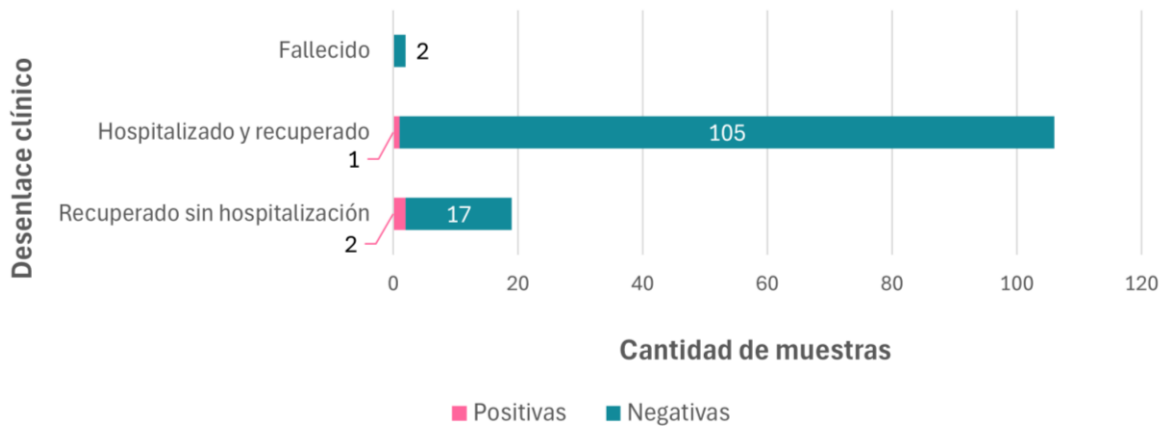


Gráfico 7. Distribución de las muestras positivas de CoVh-OC43 según pacientes hospitalizados y ambulatorios. Las barras turquesas indican las muestras negativas y las barras rosadas las muestras positivas.

4.2 DETECCIÓN DEL CORONAVIRUS ENDÉMICO HKU1 POR RT-PCR EN TIEMPO REAL

De las 127 muestras procesadas, no se obtuvo ninguna detección positiva para este virus, únicamente se observó la amplificación de los controles positivos incluidos en el ensayo (Gráfico 8), mientras que los controles negativos permanecieron sin

amplificación. Esto confirma que las condiciones de la reacción de PCR fueron adecuadas y que el sistema de detección funcionó correctamente, pudiendo validar los resultados negativos obtenidos.

Figura 14. Resultados de amplificación del CoVh-HKU1, lote 1

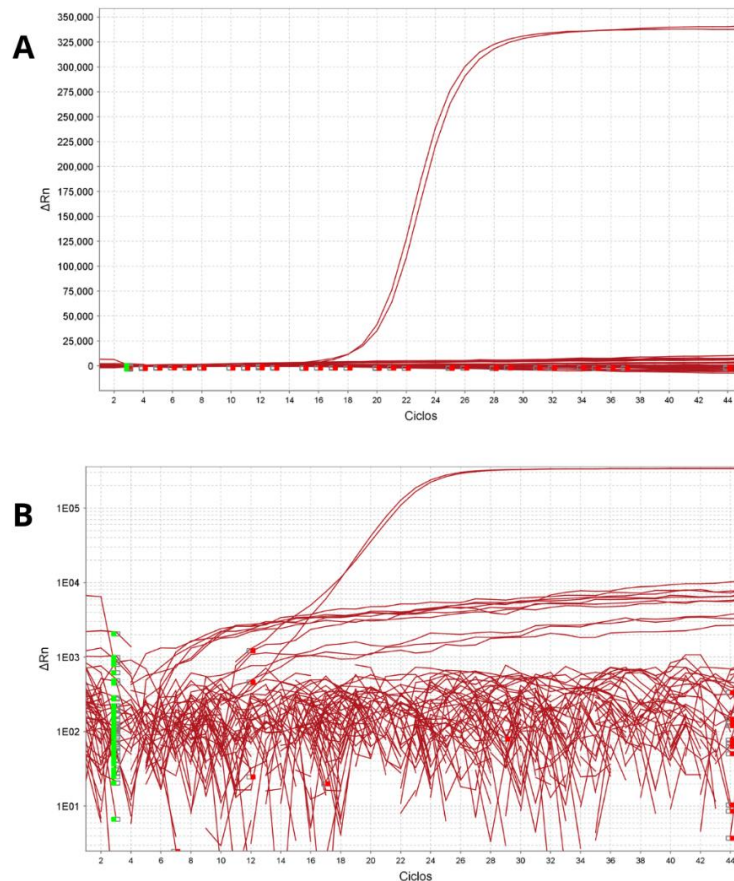


Figura 14. Curvas de amplificación correspondientes a los controles positivos de CoVh-HKU1 por duplicado, detectados mediante una sonda marcada con el fluoróforo ROX. Se presentan gráficos en escala lineal (A) y gráficos en escala logarítmica (B). Las figuras fueron extraídas del software Quant Studio Design & Analysis, en donde el eje X representa el número de ciclos de amplificación y el eje Y (ΔRn) la fluorescencia detectada. Las muestras negativas permanecieron sin señal de amplificación, manteniéndose en la línea basal durante cada ciclo.

4.3 DETECCIÓN DEL EV-D68 POR RT-PCR EN TIEMPO REAL

De las 127 muestras procesadas, se obtuvieron un total de 17 muestras positivas para EV-D68 (Figura 13), resultando en un 86.61 % ($n=110$) de muestras sin detectar para

este virus (Gráfico 8). La Tabla 14 presenta los resultados de los valores de Ct obtenidos en las pruebas de PCR para estas 17 muestras positivas.

Gráfico 8. Frecuencia de detección del EV-D68 en Panamá en el año 2016 (n=127)

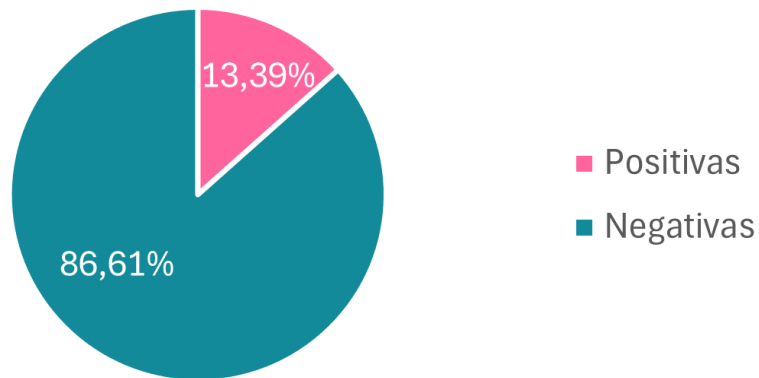


Gráfico 8. Distribución porcentual de los resultados de detección del virus respiratorio EV-D68 en muestras seleccionadas del año 2016. El 13,39% resultaron positivas (n=17) y el 86,61% resultaron negativas (n=110).

Figura 15. Resultados de amplificación del EV-D68, lote 1

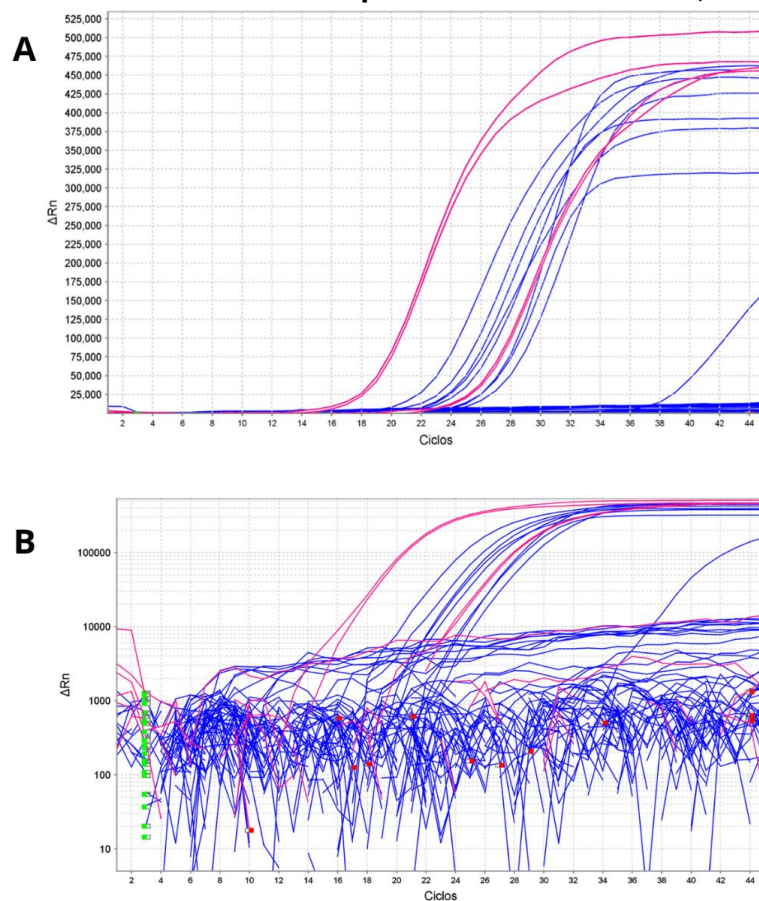


Figura 15. Curvas de amplificación correspondientes a las muestras positivas procesadas en el lote 1. La detección se realizó mediante una sonda marcada con el fluoróforo FAM. Se presentan gráficos en escala lineal (A) y gráficos en escala logarítmica (B) que fueron extraídos del software Quant Studio™ Design & Analysis Software v 1.5.1, en donde el eje X muestra el número de ciclos de amplificación y el eje Y (ΔRn) la fluorescencia detectada. Las curvas sigmoideas en color azul indican muestras positivas para EV-D68, mientras que las curvas sigmoideas rosadas indican la amplificación de los controles positivos.

Figura 16. Resultados de amplificación del EV-D68, lote 2

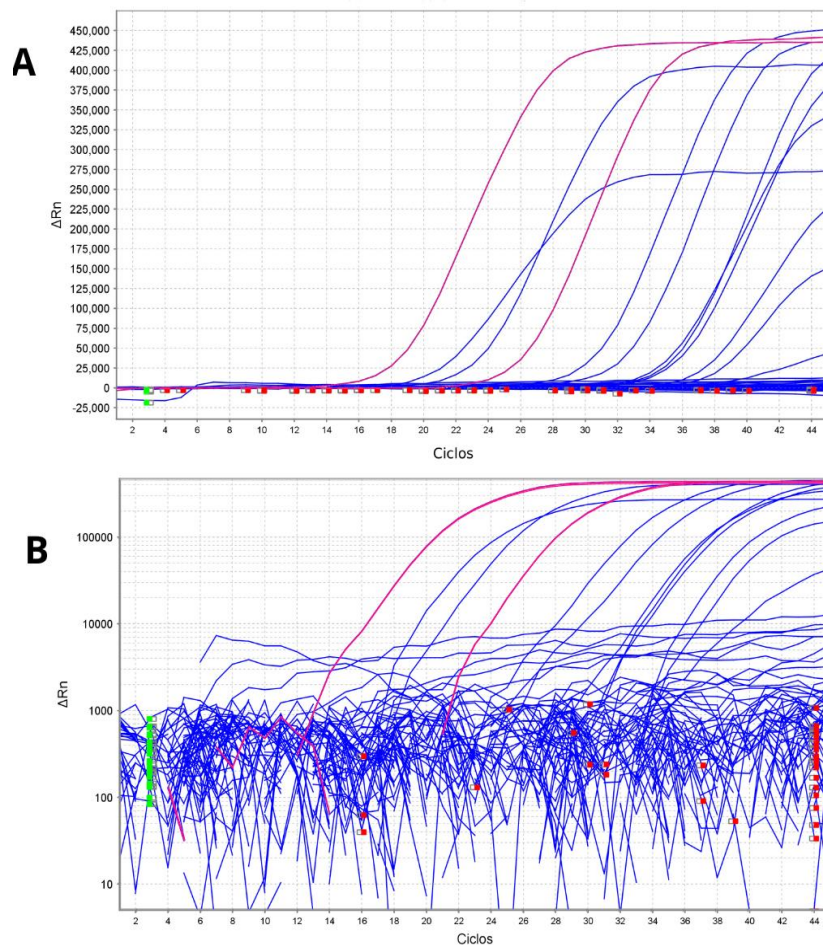


Figura 16. Curvas de amplificación correspondientes a las muestras positivas procesadas en el lote 2. La detección se realizó mediante una sonda marcada con el fluoróforo FAM. Se presentan gráficos en escala lineal (A) y gráficos en escala logarítmica (B) que fueron extraídos del software Quant Studio™ Design & Analysis Software v 1.5.1, en donde el eje X muestra el número de ciclos de amplificación y el eje Y (ΔRn) la fluorescencia detectada. Las curvas sigmoideas en color azul indican muestras positivas para EV-D68, mientras que las curvas sigmoideas rosadas indican la amplificación de los controles positivos.

Tabla 14. Valores de Ct de las muestras que resultaron positivas en la detección del EV-D68

Número de muestras	Código de muestras	Ct
1	318808	26,10
2	319429	21,22
3	319442	25,40
4	319627	23,81
5	319822	23,35
6	320104	23,24
7	320187	22,53
8	320440	25,45
9	320557	34,41
10	320548	38,00
11	320585	20,59
12	320570	31,12
13	320710	34,68
14	320717	29,26
15	320861	22,29
16	320901	34,02
17	319999	36,96

En el lote 2 de muestras procesadas para la detección de EV-D68, se observó que 5 de las muestras que resultaron positivas (320585, 320710, 320570, 320717 y 320901) tenían proximidad en la placa de 96 pocillos, por lo que se decidió repetir la prueba para descartar la posibilidad de contaminación entre ellas, pero esta vez las muestras se colocaron en posiciones lejanas entre sí dentro de la placa.

Además, en este lote también se observaron 2 muestras que tuvieron valores de Ct mayores a 35 ciclos (319999 y 320548), sin embargo, a pesar de tener un Ct mayor al establecido, se observó que estas muestras tenían curvas sigmoideas con

una señal alta de fluorescencia, por lo que también se decidió repetir estas muestras para confirmar su positividad (Figura 18).

Figura 17. Resultados de amplificación de las muestras repetidas de EV-D68

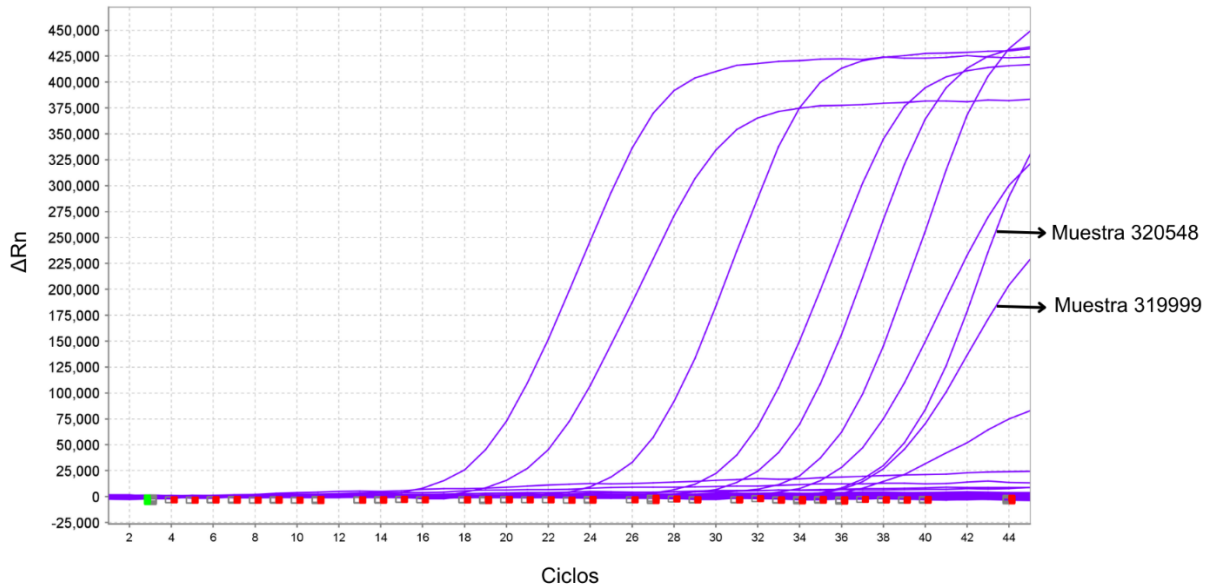


Figura 18. Curvas de amplificación de las muestras repetidas para confirmar su positividad. La detección se realizó mediante una sonda marcada con el fluoróforo FAM. Este gráfico lineal se extrajo del software Quant Studio™ Design & Analysis Software v 1.5.1, en donde el eje X muestra el número de ciclos de amplificación y el eje Y (ΔRn) la fluorescencia detectada

En los resultados de la Figura 18 se observó que las muestras 320585, 320570, 320717 y 320901 obtuvieron resultados consistentes con la corrida del lote anterior (Tabla 15), por lo cual se confirmó que sí eran muestras positivas. Mientras que la muestra 320710, luego de la repetición obtuvo un valor de Ct mayor a 35 ciclos, sin embargo, esta también se consideró como positiva.

Por otro lado, las muestras 319999 y 320548 seguían teniendo valores de Ct mayores a 35 ciclos (Tabla 15), sin embargo, la forma de las curvas de amplificación indicó una señal alta de fluorescencia en estas muestras, por lo que se decidió determinarlas como positivas para nuestros siguientes ensayos.

Tabla 15. Valores de Ct de las muestras repetidas para la detección de EV-D68

Código de muestra	Ct inicial	Ct final
320585	20,59	21,03
320710	34,68	36,01
320570	31,12	32,26
320717	29,26	30,36
320901	34,02	34,52
319999	36,96	38,05
320548	38,00	37,87

De las 17 muestras positivas del EV-D68, 9 pertenecían a niños menores de 5 años (52,94%), 5 pertenecían a adultos mayores a 18 años (29,41%), mientras que el grupo con menor cantidad de muestras positivas fue el de sujetos de entre 5 y 18 años, con 3 muestras detectadas (17,65%) (Gráfico 9).

Mientras que la distribución en el país fue dentro de 6 provincias y 1 comarca. La provincia de Panamá presentó la mayor cantidad de detecciones con 4 casos, seguida por las provincias de Colón y Coclé con 3 casos en cada una. En la provincia de Herrera, Panamá Oeste y la Comarca de Guna Yala hubo 2 casos en cada una. En cambio, la provincia de Darién presentó el menor porcentaje de detección para este virus con sólo 1 caso del EV-D68 (Gráfico 11).

Gráfico 9. Distribución del EV-D68 según grupo etario en las muestras analizadas del año 2016 en Panamá (n=127)



Gráfico 9. Las muestras positivas del EV-D68 se distribuyeron en los 3 grupos etarios. Las barras turquesas indican las muestras negativas y las barras rosadas las muestras positivas.

Gráfico 10. Distribución geográfica del EV-D68 en las muestras analizadas del año 2016 en Panamá (n=126)

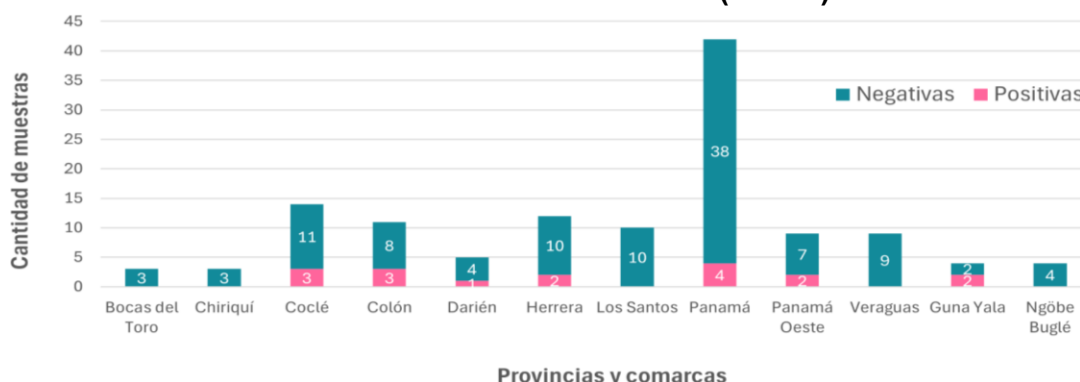


Gráfico 10. Distribución de las muestras positivas del EV-D68 según provincias y comarcas. Una de las muestras no fue incluida en el análisis debido a información faltante. Las barras turquesas indican las muestras negativas y las barras rosadas las muestras positivas.

En las 17 muestras positivas del EV-D68 se observaron 8 síntomas, los más comunes fueron: Tos (n=13), dificultad respiratoria (n=11), fiebre >38 °C (n=11) y rinorrea (n=9). Mientras que dolor de garganta (n=3), disnea (n=2), odinofagia (n=1) y malestar general (n=1) se presentaron en una menor frecuencia. Además se observó que en las muestras con resultados negativos para este virus se presentaron 5 síntomas diferentes, aunque en una menor proporción: Dolor en el pecho (n=1), dolor torácico (n=2), vómitos (n=3), diarrea (n=3) y edema en extremidades (n=1) (Gráfico 12).

Gráfico 11. Frecuencia de síntomas reportados en casos positivos y negativos del EV-D68 (n=82)

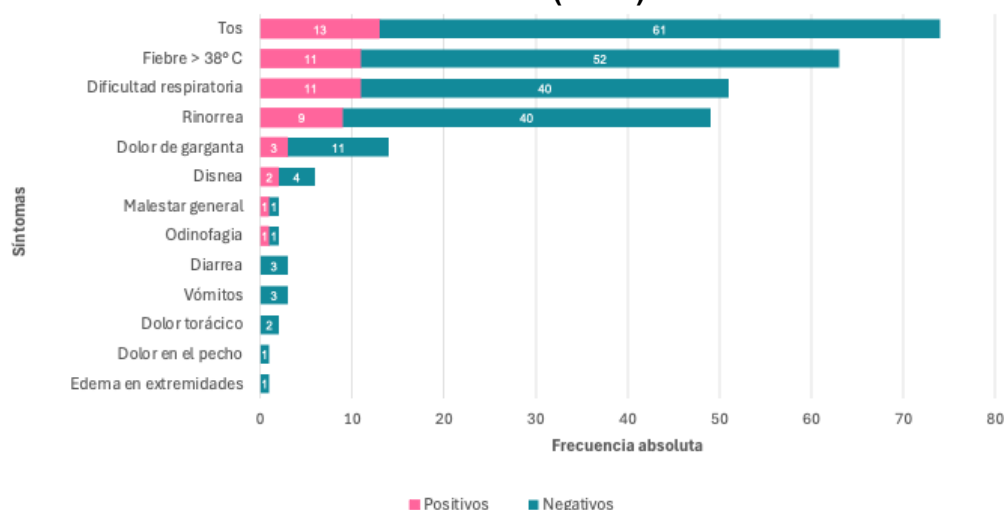


Gráfico 11. Las barras turquesas indican los síntomas que se observaron en los casos negativos y las barras rosadas los síntomas que se observaron en los casos positivos del EV-D68. Para este análisis sólo se consideraron 82 muestras debido a la falta de datos disponibles.

De las 127 muestras analizadas, 2 corresponden a pacientes fallecidos, 106 a sujetos hospitalizados y recuperados y 19 a sujetos recuperados sin hospitalización (Ambulatorios). De estas, 15 muestras detectadas con EV-D68 provenían de sujetos hospitalizados y 2 de sujetos ambulatorios (Gráfico 12).

Gráfico 12. Distribución de casos positivos del EV-D68 según el desenlace clínico del paciente al momento de la recolección (n=127)

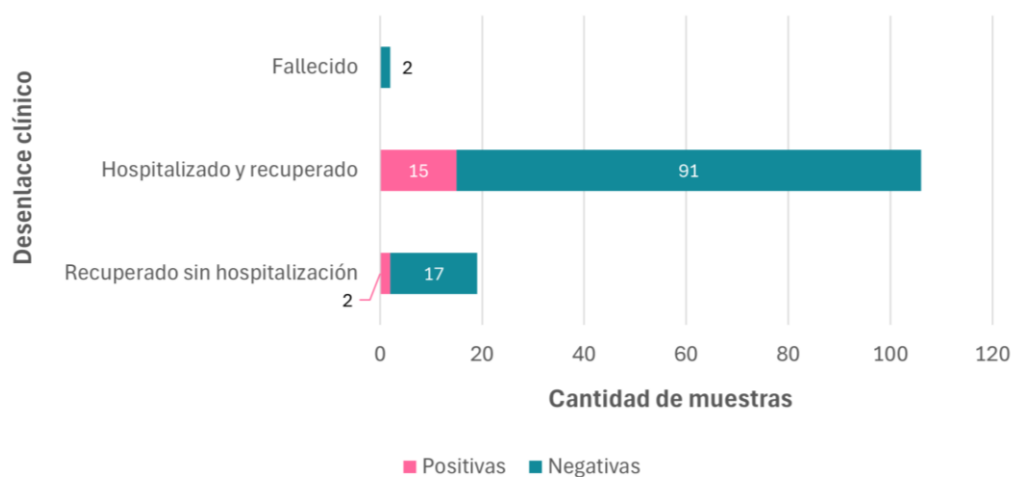


Gráfico 12. Distribución de las muestras positivas del EV-D68 según pacientes hospitalizados y ambulatorios. Las barras azules indican las muestras negativas y las barras rosadas las muestras positivas.

4.4 COINFECCIONES

Las coinfecciones se evaluaron en base a los resultados obtenidos de las pruebas de detección y considerando los resultados del panel viral respiratorio del año 2016 mostrado en la Tabla 21. Tomando esto en consideración, no se observaron coinfecciones entre los 3 virus detectados (CoVh-229E, CoVh-OC43 y EV-D68). Sin embargo, sí se observaron co-infecciones entre estos virus y los virus respiratorios previamente detectados del panel viral del año 2016.

Se observaron coinfecciones en 5 muestras, destacando la presencia simultánea de los siguientes virus: CoVh-229E con A/H1 pdm, CoVh-OC43 con PIV-1, EV-D68 con Rhinovirus, EV-D68 con RSV y EV-D68 con PIV-3 (Tabla 16).

Las coinfecciones detectadas fueron mucho más comunes en niños menores a 5 años, presentándose en 4 de las 5 muestras detectadas con coinfecciones (80%). En cambio solo una muestra pertenecía a un adulto mayor de 18 años (20 %).

EV-D68 fue el virus que presentó una mayor frecuencia de coinfecciones con otros virus respiratorios, siendo responsable de 3/5 de las coinfecciones detectadas (60%), en comparación con CoVh-229E que estuvo presente en 1/5 de las muestras coinfectadas (20%) al igual que CoVh-OC43 (20%).

En los casos de coinfección se observaron distintos cuadros clínicos asociados. La coinfección entre EV-D68 y RSV se manifestó con síntomas como fiebre, tos y dificultad respiratoria (Tabla 17). Por su parte, la coinfección entre EV-D68 y RV se asoció a la presencia de tos, rinorrea y dificultad respiratoria (Tabla 18). En el caso de la coinfección entre EV-D68 y PIV-3, los síntomas reportados fueron fiebre y disnea (Tabla 19).

Cabe señalar que, en relación con las coinfecciones de los coronavirus endémicos, no fue posible describir las manifestaciones clínicas debido a la ausencia de datos clínicos completos en las muestras analizadas.

Tabla 16. Coinfecciones detectadas con otros virus respiratorios

Virus detectados	Cantidad de muestras positivas (n=23)	Cantidad de muestras coinfectadas (n=5)	Virus Codetectados
CoVh-229E	3	1 (318648)	CoVh-229E + A/H1 pdm
CoVh-OC43	3	1 (318087)	CoVh-OC43 + PIV-1
EV-D68	17	1 (320440)	EV-D68 + RV
		1 (320548)	EV-D68 + RSV

		1 (319999)	EV-D68 + PIV-3
--	--	------------	----------------

Tabla 17. Síntomas de coinfecciones entre EV-D68 y RSV

	Síntomas de EV-D8	Síntomas de RSV	Síntomas de las muestras coinfectadas	Desenlace clínico	Edad (años)
Infecciones leves	Fiebre	Fiebre	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	1 año
	Tos	Tos	Tos		
	Dolor de garganta	Dolor de garganta			
	Congestión	Congestión			
	Rinorrea	Estornudos			
		Dolor de cabeza			
Infecciones graves	Dificultad respiratoria	Dificultad respiratoria	Dificultad respiratoria		
	Sibilancias	Sibilancias			
	Hipoxia	Respiración rápida			
		Tos intensa			

Tabla 18. Síntomas de coinfecciones entre EV-D68 y RV

	Síntomas de EV-D8	Síntomas de RV	Síntomas de la muestra coinfectada	Desenlace clínico	Edad (años)
	Tos	Tos	Tos		
	Fiebre	Secreción nasal	Rinorrea		

Infecciones leves	Dolor de garganta	Dolor de garganta		Hospitalizado	<1 año (8 meses)
	Congestión	Congestión			
	Rinorrea				
Infecciones graves	Dificultad respiratoria	Dificultad respiratoria	Dificultad respiratoria		
	Sibilancias	Sibilancias			
	Hipoxia	Tos intensa			

Tabla 19. Síntomas de coinfecciones entre EV-D68 y PIV-3

	Síntomas de EV-D8	Síntomas de PIV-3	Síntomas de la muestra coinfectada	Desenlace clínico	Edad (años)
Infecciones leves	Fiebre	Fiebre	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	29 años
	Tos	Tos	Disnea		
	Dolor de Garganta	Dolor de garganta			
	Congestión	Secreción			
	Rinorrea	Rinorrea			
		Estornudos			
Infecciones graves	Dificultad respiratoria	Sibilancias			
	Sibilancias	Ronquera			
	Hipoxia	Tos seca			

CAPÍTULO V

5. DISCUSIÓN

5.1 DISCUSIÓN

Principales hallazgos del estudio

El presente estudio constituye una de las primeras caracterizaciones, en Panamá, de la circulación de Coronavirus endémicos (CoVh-229E, CoVh-OC43, CoVh-NL63 y CoVh-HKU1) y Enterovirus D68 en muestras respiratorias recolectadas en el año 2016, permitiendo aportar evidencia sobre su contribución a la carga de enfermedad respiratoria aguda en el país.

Nuestros resultados confirman la hipótesis de que al menos uno de estos virus circuló en Panamá durante el periodo de estudio, pues se detectaron tres casos de CoVh-229E, tres casos de CoVh-OC43 y diecisiete casos de EV-D68. La detección de CoVh-229E y CoVh-OC43, pero no de CoVh-NL63 ni CoVh-HKU1, es consistente con reportes de vigilancia virológica internacional que documentan una circulación heterogénea de los diferentes Coronavirus endémicos, con predominio de algunos genotipos en determinados años y regiones. La ausencia de CoVh-NL63 y CoVh-HKU1 podría explicarse por una baja circulación en 2016 o por su estacionalidad, lo que subraya la necesidad de una vigilancia sostenida y de mayor cobertura temporal para comprender patrones de circulación en el país.

En cuanto a EV-D68, la detección en el 13,4% de las muestras analizadas representa una prevalencia considerablemente mayor que la de los Coronavirus endémicos (4,7%), lo que sugiere un papel relevante de este virus en la carga de enfermedad respiratoria durante 2016. Nuestros hallazgos se alinean con reportes de otros países de la región que han documentado brotes de EV-D68 en los últimos años, asociados principalmente a infecciones respiratorias en población pediátrica.

Descripción de las características clínicas asociadas a las infecciones

Un hallazgo relevante es que la mayoría de las detecciones, tanto de EV-D68 como de los Coronavirus endémicos, ocurrieron en pacientes hospitalizados, lo que podría indicar una relación con cuadros moderados a graves de infección respiratoria aguda.

Sin embargo, dado que el estudio incluyó una cohorte previamente seleccionada a partir del sistema de vigilancia nacional, no es posible estimar con precisión la carga poblacional ni la tasa de hospitalización atribuible a estos virus.

Además, más del 50% de los casos positivos ocurrieron en niños menores de 5 años y la mayoría correspondió a pacientes hospitalizados, lo que refuerza el potencial impacto clínico de este virus en grupos vulnerables. Esto concuerda con lo descrito en la literatura, donde mencionan que estos virus afectan principalmente a niños pequeños (Shao et al., 2022; Kalam & Balasubramaniam, 2024). Además de esto hay que tener en cuenta que los niños son llevados con mayor frecuencia a los hospitales, a diferencia de los adultos cuyos casos no son tan reportados y debido a esto existe una mayor tasa de detección en poblaciones pediátricas, lo que provoca que los datos epidemiológicos sean limitados en otros grupos de edad (Ottogalli et al., 2021). Esto implica un sesgo en la información y como resultado, se subestima la carga real de infección por estos virus.

Desde el punto de vista clínico, los síntomas predominantes en los casos positivos de EV-D68, fueron la tos, la fiebre $>38^{\circ}$ C y la dificultad respiratoria, estos hallazgos concuerdan con lo reportado en la literatura, donde se describe que la fiebre y la tos son síntomas comunes en cuadros leves, mientras que la dificultad respiratoria está entre los síntomas asociados con infecciones respiratorias más graves (Kalam & Balasubramaniam, 2024; Simoes et al., 2024).

En el caso de los Coronavirus endémicos únicamente se contó con síntomas en 1 de las muestras positivas, en la cual se registró la fiebre $>38^{\circ}$ C, tos, dolor de garganta y rinorrea. Estos síntomas observados tienen concordancia con los síntomas que comúnmente causan estos virus (P. Li et al., 2020). Sin embargo, no es posible establecer una comparación entre los síntomas, dado que estos datos no estuvieron disponibles en la totalidad de las muestras que resultaron positivas, impidiendo la posibilidad de identificar patrones diferenciales entre estas muestras.

Circulación de los Coronavirus endémicos y EV-D68 en la región en el año 2016

Para contextualizar estos hallazgos, se revisaron reportes sobre la circulación de estos virus en Latinoamérica durante el año 2016. En general, la información disponible sobre la presencia de los Coronavirus endémicos en la región fue escasa, países como Argentina y Nicaragua realizaron estudios en los cuales documentaron la presencia de estos virus en la población.

En el estudio realizado en Argentina se evaluó la prevalencia de los Coronavirus endémicos durante dos periodos pre-pandémicos, en el cual destacaron la presencia de CoVh-229E, CoVh-HKU1, CoVh-NL63 y CoVh-OC43 en todos los años estudiados, incluyendo 2016. Sin embargo, no se mencionan las frecuencias de detección por cada año, por lo que no es posible conocer con precisión la circulación que tuvieron, pero sí destacar su presencia durante el año 2016 (Jara et al., 2025).

En el estudio realizado en Nicaragua, también se evidenció la circulación de los 4 Coronavirus endémicos durante el año 2016, con 15 casos positivos de CoVh-229E, 7 de CoVh-HKU1, 18 de CoVh-NL63 y 46 de CoVh-OC43 (Frutos et al., 2022). En contraste, en nuestro estudio únicamente se detectaron casos positivos de CoVh-229E y CoVh-OC43, sin presencia de CoVh-HKU1 ni de CoVh-NL63. Estas diferencias en la circulación resultan llamativas, considerando que ambos estudios se realizaron en países de Centroamérica durante el mismo año. Aunque esto podría deberse a diferencias entre las poblaciones estudiadas, variaciones de la dinámica del virus o factores epidemiológicos locales.

Por otro lado, la información sobre la circulación de EV-D68 en el año 2016 en Latinoamérica, también es limitada. Sin embargo, los estudios disponibles evidencian que el virus estuvo presente en la región, aunque con una incidencia relativamente baja, detectando casos puntuales en países como Argentina y Chile.

En Argentina, durante 2016, se reportó un brote de Mielitis flácida aguda en 11 niños con edades entre 3 meses y 6 años, quienes presentaron debilidad muscular repentina, acompañada de síntomas respiratorios. El análisis de estos casos reveló

la presencia de Enterovirus D68 en 4 de los 11 casos (Ruggieri et al., 2017), evidenciando la presencia del virus en la población durante ese año. Es importante destacar que en Argentina, la circulación de EV-D68 estuvo asociada con casos de Mielitis flácida aguda, mientras que en Panamá, a pesar de la detección de múltiples casos positivos, no se reportaron cuadros de afecciones neurológicas vinculadas a este virus.

Por otro lado, en Chile se identificó la presencia de Enterovirus D68 mediante un estudio retrospectivo que analizó 1966 muestras respiratorias recolectadas a través de su sistema de Nacional de Vigilancia, en el que encontraron únicamente un caso positivo del virus en el año 2016 (Paredes & Nicole, 2017). Aquí podemos observar un contraste notable con nuestros resultados, en donde a partir de 1966 muestras se detectó sólo 1 caso positivo de Enterovirus D68, mientras que en nuestro estudio se identificaron 17 casos positivos en un número considerablemente menor de muestras durante el mismo año.

Estos hallazgos en Argentina y Chile permiten contextualizar la circulación de EV-D68 en la región durante el año 2016, mostrando que, si bien la presencia del virus fue detectada, la incidencia reportada fue baja. Estas diferencias subrayan la necesidad de fortalecer la vigilancia epidemiológica de este virus y realizar estudios que permitan comprender mejor su impacto y la variabilidad de su circulación en la región, especialmente considerando los brotes que se han reportado durante los últimos años y la evidencia de un aumento de casos en distintas partes del mundo.

Coinfecciones

Nuestro estudio realizó un análisis las muestras que habían resultado positivas en el panel viral respiratorio de 2016. Aunque inicialmente se habían clasificado como monoinfecciones por alguno de los virus del panel, en este estudio se identificaron cinco casos con coinfecciones previamente no detectadas. Estas coinfecciones involucraron a los coronavirus endémicos 229E y OC43, así como a Enterovirus D68, lo que evidencia la circulación simultánea de estos patógenos en la población estudiada.

Al analizar los síntomas de las coinfecciones de EV-D68, no se observó alguno de mayor gravedad que indique un aumento en la severidad clínica en comparación a los casos con monoinfección. También se compararon los síntomas característicos de los virus codetectados y se observó la presencia de signos compartidos, propios de ambos agentes sin identificar ningún síntoma adicional de mayor gravedad. Es importante destacar que en ninguna de las muestras detectadas con EV-D68 se observaron síntomas neurológicos.

Aunque todas las coinfecciones con EV-D68 se presentaron en pacientes hospitalizados, en su mayoría niños menores de 5 años, estas mismas características también se observaron en las muestras con monoinfección por EV-D68. Por lo tanto, no es posible afirmar que, en este caso, las coinfecciones aumentan la gravedad de la infección. Aunque la literatura señala que las coinfecciones con Enterovirus pueden incrementar la posibilidad de desarrollar complicaciones y presentar manifestaciones clínicas más severas (De Sousa et al., 2021).

En cuanto a las coinfecciones de los Coronavirus endémicos, los casos de coinfección no cuentan con información disponible sobre los síntomas. Dado que no se disponen de estos datos clínicos, no es posible evaluar si estas coinfecciones presentaron algún síntoma de mayor gravedad que el resto. Sin embargo, se pudo observar que la coinfección de CoVh-229E provenía de un paciente hospitalizado menor a 5 años, mientras que la coinfección de CoVh-OC43 provenía de un paciente ambulatorio menor a 5 años. En este sentido, el tipo de atención médica recibida de estos pacientes permite considerar la gravedad de la infección, teniendo en cuenta que se trata de niños pequeños, los cuales constituyen una población más vulnerable frente a estas infecciones respiratorias.

Los virus codetectados en las muestras positivas para CoVh-229E y CoVh-OC43 incluyeron el RSV e Influenza A/H1 pdm. Esto concuerda con lo reportado en otros estudios, en donde se describe que el Virus Sincitial Respiratorio, el Virus de la Influenza A y los Rinovirus son los patógenos más comunes que coexisten con los Coronavirus endémicos y que la coinfección puede influir en la presentación clínica

de los pacientes positivos para este virus (Zeng et al., 2017) Aunque en nuestro estudio no es posible determinar si la coinfección incrementó la gravedad de los síntomas, debido a la falta de estos datos clínicos.

Los hallazgos de este estudio proporcionan una visión inicial valiosa sobre la circulación de coronavirus endémicos y EV-D68 en Panamá, durante el año 2016. Estas debilidades metodológicas resaltan la necesidad de fortalecer la vigilancia molecular mediante estudios prospectivos y con mayor cobertura temporal, que incluyan caracterización genética de las cepas detectadas, cuantificación viral y recopilación sistemática de datos clínicos completos. Dichas mejoras permitirán evaluar con mayor precisión la carga de enfermedad atribuible a estos virus, identificar posibles asociaciones con severidad clínica y explorar el impacto de coinfecciones en la evolución de los pacientes. En conjunto, estas acciones contribuirán a optimizar las estrategias de vigilancia y respuesta en salud pública, favoreciendo una detección temprana y una mejor comprensión del papel epidemiológico de estos patógenos respiratorios en la población panameña.

CAPÍTULO VI

**6. CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES**

6.1 CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró confirmar la circulación de dos coronavirus endémicos (CoVh-229E y CoVh-OC43) y de Enterovirus D68 (EV-D68) en Panamá durante el año 2016, constituyendo una de las primeras descripciones moleculares de estos virus en el país. Este hallazgo confirma que estos virus circularon en la población durante ese periodo, causando infecciones respiratorias tanto en infecciones únicas como en coinfecciones con otros virus del panel de diagnóstico rutinario.

Por ello, resulta fundamental ampliar el conocimiento sobre la epidemiología de los virus respiratorios que actualmente no forman parte de los sistemas rutinarios de vigilancia, pero que podrían estar contribuyendo de manera significativa a la carga de enfermedad en la población. De esta forma se reduciría el número de pacientes que permanecen sin un diagnóstico etiológico definido, se mejoraría la comprensión del verdadero impacto de estas infecciones y se facilitaría una orientación clínica más adecuada. En este contexto, los diagnósticos más sensibles y precisos son esenciales para identificar oportunamente a estos patógenos, optimizar el manejo clínico y generar evidencia que fortalezca las estrategias de vigilancia y la toma de decisiones en salud pública.

La detección de CoVh-229E y CoVh-OC43 en una baja proporción de muestras (4,7%) sugiere circulación limitada de estos virus en 2016, mientras que CoVh-NL63 y CoVh-HKU1 no fueron detectados, lo que podría indicar ausencia de circulación significativa en el periodo o una presentación estacional fuera de la ventana de muestreo. La detección de EV-D68 en el 13,4% de las muestras analizadas evidencia su papel relevante en la carga de enfermedad respiratoria en el periodo de estudio, con predominio en población pediátrica y en pacientes hospitalizados.

Se identificaron coinfecciones entre los coronavirus endémicos o EV-D68 y otros virus respiratorios (A/H1pdm, PIV-1, RSV, RV y PIV-3), lo que resalta la necesidad de continuar evaluando el impacto de estas interacciones en la severidad clínica y en la dinámica de transmisión viral. Estos hallazgos resaltan la importancia de incluir EV-D68 y coronavirus endémicos en paneles de diagnóstico molecular de vigilancia

rutinaria, de manera que se puedan detectar oportunamente eventos de circulación viral y prevenir subestimación de su impacto clínico en la población.

Este estudio contribuye al conocimiento de la circulación de estos virus que son poco monitoreados en Panamá, así como la descripción de las características clínicas y demográficas de estas infecciones. No obstante, la vigilancia y el diagnóstico de estos virus continúan siendo un desafío importante, especialmente considerando la subestimación de casos leves o no reportados. Por ello, se requieren investigaciones más amplias, representativas y complementarias, que permitan obtener una visión más completa de la epidemiología de estos virus, además de integrar herramientas moleculares más avanzadas que permitan caracterizar la diversidad genética de los virus circulantes y fortalecer las medidas de prevención y control de las infecciones respiratorias en el país.

6.2 LIMITACIONES

Si bien los hallazgos de este estudio aportan información novedosa y relevante sobre la circulación de coronavirus endémicos y EV-D68 en Panamá, es importante reconocer las limitaciones inherentes al diseño y ejecución del mismo. Identificar estas limitaciones permite contextualizar adecuadamente los resultados, evitar interpretaciones que excedan el alcance real del análisis y proponer mejoras metodológicas para investigaciones futuras que profundicen en el impacto clínico y epidemiológico de estos virus respiratorios. A continuación, se listan las limitaciones del estudio en cuanto a:

- **Tamaño y representatividad de la muestra:** El estudio incluyó 127 muestras respiratorias, lo que si bien permitió una descripción inicial de la circulación de CoVh-229E, CoVh-OC43 y EV-D68, puede no ser representativo de toda la población de Panamá ni de la carga real de enfermedad respiratoria en 2016.
- **Diseño retrospectivo y ventana temporal limitada:** Las muestras fueron recolectadas en un único año calendario, lo que impide en este estudio en

particular, evaluar patrones de circulación estacional o interanual de los coronavirus endémicos y EV-D68, así como su posible relación con picos epidémicos en otros años.

- Datos clínicos incompletos: No se contó con información clínica completa para todas las muestras, lo que limita el análisis de correlaciones entre la detección viral y la severidad de la enfermedad o el desenlace clínico de los pacientes.
- Falta de cuantificación viral: La metodología utilizada fue cualitativa (presencia/ausencia) y no incluyó carga viral, por lo que no fue posible explorar asociaciones entre niveles de replicación viral y severidad clínica.
- Coinfecciones sin análisis de impacto clínico: Aunque se detectaron coinfecciones con otros virus respiratorios, el tamaño reducido de estos subgrupos y la heterogeneidad de los datos impidieron evaluar de forma robusta su impacto en la presentación clínica o en la evolución de los casos.

6.3 RECOMENDACIONES

- Fortalecer la vigilancia epidemiológica de los Coronavirus endémicos y EV-D68 en Panamá, mediante la mejora del monitoreo de estos virus que permitan generar información sobre su circulación y conocer con mayor precisión su impacto en la salud pública. Contribuyendo a la detección temprana de brotes y la planificación de medidas preventivas efectivas.
- Realizar estudios más avanzados, como la secuenciación genética, que permitan caracterizar la diversidad de las variantes circulantes de estos virus en nuestro país. Esta información no sólo permitirá conocer las variantes presentes, sino también comprender mejor sus implicaciones en la salud pública.
- Realizar estudios más exhaustivos, empleando diseños que permitan obtener datos representativos de toda la población. Este enfoque permitirá estimar con mayor precisión la prevalencia de estos virus y describir mejor las

características de las infecciones causadas, mejorando nuestro conocimiento sobre las frecuencias y gravedad de la infección y la identificación de factores de riesgo asociados a una mayor afectación en la población

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48-53. <https://doi.org/10.1042/bio20200034>

Alsaadi, E. A. J., & Jones, I. M. (2019). Membrane Binding Proteins of Coronaviruses. *Future Virology*, 14(4), 275-286. <https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0144>

Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., & Antonjaya, U. (2022). Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*, 13(12), 2387. <https://doi.org/10.3390/genes13122387>

Artika, I. M., Wiyatno, A., & Ma'roef, C. N. (2020). Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infection Genetics And Evolution*, 81, 104215. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104215>

Biggs, H. M., Nix, W. A., Zhang, J., Rogers, S., Clara, W., Jara, J. H., Gonzalez, R., Luciani, K., Brizuela, Y. S., Estripeaut, D., Castillo, J. M., De Leon, T., Corro, M., Vergara, O., Rauda, R., Chong, E. G., Watson, J. T., Azziz-Baumgartner, E., Gerber, S. I., . . . Dawood, F. S. (2020). Enterovirus D68 infection among hospitalized children with severe acute respiratory illness in El Salvador and Panama, 2012-2013. *Influenza And Other Respiratory Viruses*, 15(2), 181-187. <https://doi.org/10.1111/irv.12815>

Bong, D., Sohn, J., & Lee, S. V. (2024). Brief guide to RT-qPCR. *Molecules And Cells*, 100141. <https://doi.org/10.1016/j.mocell.2024.100141>

Britton, P. (2019). Coronaviruses: general features (Coronaviridae). En *Elsevier eBooks* (pp. 193-197). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814515-9.00139-9>

Carvajal, L. A., & Pérez, C. P. (2020). Epidemiology of Respiratory Infections. En Springer eBooks (pp. 263-272). https://doi.org/10.1007/978-3-030-26961-6_28

Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal Of Medical Virology*, 92(4), 418-423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>

Colagrossi, L., Mattana, G., Piccioni, L., Cento, V., & Perno, C. F. (2021). Viral Respiratory Infections: New Tools for a Rapid Diagnosis. *Seminars In Respiratory And Critical Care Medicine*, 42(06), 747-758. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1739306>

Cong, Y., Ulasli, M., Schepers, H., Mauthe, M., V'kovski, P., Kriegenburg, F., . . . Reggiori, F. (2019). Nucleocapsid Protein Recruitment to Replication-Transcription Complexes Plays a Crucial Role in Coronaviral Life Cycle. *Journal of Virology*, 94(4), 10.1128/jvi.01925-01919. doi:10.1128/jvi.01925-19

Corman, V. M., Muth, D., Niemeyer, D., & Drosten, C. (2018). Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Advances In Virus Research*, 163-188. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.01.001>

Dai, W., Li, X., Liu, Z., & Zhang, C. (2023). Identification of four neutralizing antigenic sites on the enterovirus D68 capsid. *Journal of Virology*, 97(12), e01600-01623. doi:10.1128/jvi.01600-23

Elrick, M. J., Pekosz, A., & Duggal, P. (2021). Enterovirus D68 molecular and cellular biology and pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100317. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100317>

Esneau, C., Duff, A. C., & Bartlett, N. W. (2022). Understanding Rhinovirus Circulation and Impact on Illness. *Viruses*, 14(1), 141. <https://doi.org/10.3390/v14010141>

Fall, A., Kenmoe, S., Ebogo-Belobo, J. T., Mbagha, D. S., Bowo-Ngandji, A., Foe-Essomba, J. R., . . . Njouom, R. (2022). Global prevalence and case fatality rate of

Enterovirus D68 infections, a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 16(2), e0010073. doi:10.1371/journal.pntd.0010073

Fausto, A., Otter, C. J., Bracci, N., & Weiss, S. R. (2023). Improved Culture Methods for Human Coronaviruses HCoV-OC43, HCoV-229E, and HCoV-NL63. *Current Protocols*, 3(10). <https://doi.org/10.1002/cpz1.914>

Filipe, I. C., Guedes, M. S., Zdobnov, E. M., & Tapparel, C. (2021). Enterovirus D: A Small but Versatile Species. *Microorganisms*, 9(8), 1758. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081758>

Frutos, A. M., Balmaseda, A., Vydiswaran, N., Patel, M., Ojeda, S., Brouwer, A., Tutino, R., Cai, S., Bakker, K., Sanchez, N., Lopez, R., Kuan, G., & Gordon, A. (2022). Burden and seasonality of primary and secondary symptomatic common cold coronavirus infections in Nicaraguan children. *Influenza And Other Respiratory Viruses*, 17(1). <https://doi.org/10.1111/irv.13086>

Galitska, G., Jassey, A., Wagner, M. A., Pollack, N., & Jackson, W. T. (2023). Enterovirus D68 capsid formation and stability requires acidic compartments. *bioRxiv*, 2023.2006.2012.544695. doi:10.1101/2023.06.12.544695

Gandhi, L., Maisnam, D., Rathore, D., Chauhan, P., Bonagiri, A., & Venkataramana, M. (2022). Respiratory illness virus infections with special emphasis on COVID-19. *European Journal Of Medical Research*, 27(1). <https://doi.org/10.1186/s40001-022-00874-x>

Guruprasad, L. (2020). Human coronavirus spike protein-host receptor recognition. *Progress In Biophysics And Molecular Biology*, 161, 39-53. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.10.006>

Grizer, C. S., Messacar, K., & Mattapallil, J. J. (2024). Enterovirus-D68– a reemerging non-polio enterovirus that causes severe respiratory and neurological disease in children. *Frontiers In Virology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fviro.2024.1328457>

Hamre, D., & Procknow, J. J. (1966). A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract. *Experimental Biology And Medicine*, 121(1), 190-193. <https://doi.org/10.3181/00379727-121-30734>

Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J. M., & Glaunsinger, B. A. (2020). The molecular virology of coronaviruses. *Journal Of Biological Chemistry*, 295(37), 12910-12934. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev120.013930>

Hu, Y., Musharrafieh, R., Zheng, M., & Wang, J. (2020b). Enterovirus D68 Antivirals: Past, Present, and Future. *ACS Infectious Diseases*, 6(7), 1572-1586. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00120>

Jara, R., Santos, D., Reyes, N. S., Hermida, E., Seoane, A., Ypas, M., Andres, G., & Echavarría, M. (2025). Endemic coronavirus in children and adults with acute respiratory infection before the COVID-19 pandemic. *Revista Argentina de Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.11.003>

Kalam, N., & Balasubramaniam, V. R. M. T. (2024). Emerging Therapeutics in the Fight Against EV-D68: A Review of Current Strategies. *Influenza And Other Respiratory Viruses*, 18(12). <https://doi.org/10.1111/irv.70064>

Koetzner, C. A., Hurst-Hess, K. R., Kuo, L., & Masters, P. S. (2021). Analysis of a crucial interaction between the coronavirus nucleocapsid protein and the major membrane-bound subunit of the viral replicase-transcriptase complex. *Virology*, 567, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.12.004>

Li, G., Fan, Y., Lai, Y., Han, T., Li, Z., Zhou, P., Pan, P., Wang, W., Hu, D., Liu, X., Zhang, Q., & Wu, J. (2020). Coronavirus infections and immune responses. *Journal Of Medical Virology*, 92(4), 424-432. <https://doi.org/10.1002/jmv.25685>

Li, P., Ikram, A., Peppelenbosch, M. P., Ma, Z., & Pan, Q. (2020). Systematically Mapping Clinical Features of Infections With Classical Endemic Human Coronaviruses. *Clinical Infectious Diseases*, 73(3), 554-555. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1386>

Lim, Y., Ng, Y., Tam, J., & Liu, D. (2016b). Human Coronaviruses: A Review of Virus–Host Interactions. *Diseases*, 4(3), 26. <https://doi.org/10.3390/diseases4030026>

Liu, D. X., Liang, J. Q., & Fung, T. S. (2020b). Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). En *Elsevier eBooks* (pp. 428-440). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.21501-x>

Miller, K., McGrath, M. E., Hu, Z., Ariannejad, S., Weston, S., Frieman, M., & Jackson, W. T. (2020). Coronavirus interactions with the cellular autophagy machinery. *Autophagy*, 16(12), 2131-2139. doi:10.1080/15548627.2020.1817280

Minigulov, N., Boranbayev, K., Bekbossynova, A., Gadilgereyeva, B., & Filchakova, O. (2024). Structural proteins of human coronaviruses: what makes them different? *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1458383>

Mulabbi, E. N., Tweyongyere, R., & Byarugaba, D. K. (2021b). The history of the emergence and transmission of human coronaviruses. *Onderstepoort Journal Of Veterinary Research*, 88(1). <https://doi.org/10.4102/ojvr.v88i1.1872>

Nathaniel, S., Ahmed, S., Wilson, J., Gutierrez, C., Chadee, D. D., Olowokure, B., & De Salazar, P. M. (2017). First reported enterovirus D68 infection in pediatric patients from the Caribbean region: evidence of spread from the U.S. outbreak. *PubMed*, 41, e11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28443999>

Niederman, M. S., & Torres, A. (2022). Respiratory infections. *European Respiratory Review*, 31(166), 220150. <https://doi.org/10.1183/16000617.0150-2022>

Núñez-Samudio, V., & Landires, I. (2021). Epidemiology of viral respiratory infections in a pediatric reference hospital in Central Panama. *BMC Infectious Diseases*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05720-1>

Otieno, G. P., Murunga, N., Agoti, C. N., Gallagher, K. E., Awori, J. O., & Nokes, D. J. (2020). Surveillance of endemic human coronaviruses (HCoV-NL63, OC43 and 229E) associated with childhood pneumonia in Kilifi, Kenya. *Wellcome Open Research*, 5, 150. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16037.2>

Paredes, A., & Nicole, C. (2017). Circulación de enterovirus D-68 y sus características filogenéticas en Chile. <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/153144>

Phan, M. V. T., Agoti, C. N., Munywoki, P. K., Otieno, G. P., Ngama, M., Kellam, P., Cotten, M., & Nokes, D. J. (2022). Identification of missed viruses by metagenomic sequencing of clinical respiratory samples from Kenya. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03987-1>

Philippe Le Mercier, Chantal Hulo, Patrick Masson (content); Yann Haefliger (front-end styling), Edouard de Castro (software). (s. f.). *Enterovirus ~ ViralZone*. <https://viralzone.expasy.org/97>

Prydz, K., & Saraste, J. (2022). The life cycle and enigmatic egress of coronaviruses. *Molecular Microbiology*, 117(6), 1308-1316. <https://doi.org/10.1111/mmi.14907>

Rahajamanana, V. L., Thériault, M., Rabezanahary, H., Sahnoun, Y. G., Mallet, M. C., Isabel, S., Trottier, S., & Baz, M. (2025c). Advances in the Treatment of Enterovirus-D68 and Rhinovirus Respiratory Infections. *Infectious Disease Reports*, 17(3), 61. <https://doi.org/10.3390/idr17030061>

Raoult, D., Zumla, A., Locatelli, F., Ippolito, G., & Kroemer, G. (2020). Coronavirus infections: Epidemiological, clinical and immunological features and hypotheses. *Cell Stress*, 4(4), 66-75. <https://doi.org/10.15698/cst2020.04.216>

Ruggieri, V., Paz, M. I., Peretti, M. G., Rugilo, C., Bologna, R., Freire, C., Vergel, S., & Savransky, A. (2017). Enterovirus D68 infection in a cluster of children with acute flaccid myelitis, Buenos Aires, Argentina, 2016. *European Journal Of Paediatric Neurology*, 21(6), 884-890. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2017.07.008>

Schoeman, D., & Fielding, B. C. (2019). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology Journal*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>

Shao, N., Zhang, C., Dong, J., Sun, L., Chen, X., Xie, Z., Xu, B., An, S., Zhang, T., & Yang, F. (2022). Molecular evolution of human coronavirus-NL63, -229E, -HKU1 and -OC43 in hospitalized children in China. *Frontiers In Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1023847>

Simoës, M. P., Hodcroft, E. B., Simmonds, P., Albert, J., Alidjinou, E. K., Ambert-Balay, K., Andrés, C., Antón, A., Auvray, C., Bailly, J., Baldanti, F., Bastings, C., Beard, S., Berengua, C., Berginc, N., Bloemen, M., Blomqvist, S., Bosma, F., Böttcher, S., . . . Benschop, K. S. M. (2024). Epidemiological and clinical insights into the enterovirus D68 upsurge in Europe 2021/22 and the emergence of novel B3-derived lineages, ENPEN multicentre study. *The Journal Of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiae154>

Song, L., Xie, Q., Lao, H., & Lv, Z. (2021). Human coronaviruses and therapeutic drug discovery. *Infectious Diseases Of Poverty*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40249-021-00812-9>

Silva, P. A. N., Ito, C. R. M., Moreira, A. L. E., Santos, M. O., Barbosa, L. C. G., Wastowski, I. J., Carneiro, L. C., & Avelino, M. A. G. (2022). Influenza and other respiratory viruses in children: prevalence and clinical features. *European Journal Of*

Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 41(12), 1445-1449.
<https://doi.org/10.1007/s10096-022-04515-3>

Sun, J., Hu, X., & Yu, X. (2019c). Current Understanding of Human Enterovirus D68. *Viruses*, 11(6), 490. <https://doi.org/10.3390/v11060490>

Torres, J. P., Farfan, M. J., Izquierdo, G., Piemonte, P., Henriquez, J., & O’Ryan, M. L. (2015). Enterovirus D68 infection, Chile, Spring 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21(4), 728-729. <https://doi.org/10.3201/eid2104.141766>

Van Der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J. M., Wolthers, K. C., Dillen, P. M. E. W., Kaandorp, J., Spaargaren, J., & Berkhout, B. (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nature Medicine*, 10(4), 368-373. <https://doi.org/10.1038/nm1024>

Vazquez-Perez, J. A., Ramirez-Gonzalez, J. E., Moreno-Valencia, Y., Hernandez-Hernandez, V. A., Romero-Espinoza, J. A. I., Castillejos-Lopez, M., Hernandez, A., Perez-Padilla, R., Oropeza-Lopez, L. E., Escobar-Escamilla, N., Gonzalez-Villa, M., Alejandro-Garcia, A., Regalado-Pineda, J., Santillan-Doherty, P., Lopez-Martínez, I., Diaz-Quiñonez, A., & Salas-Hernandez, J. (2016). EV-D68 infection in children with asthma exacerbation and pneumonia in Mexico City during 2014 autumn. *Influenza And Other Respiratory Viruses*, 10(3), 154-160. <https://doi.org/10.1111/irv.12384>

Wartecki, A., & Rzymiski, P. (2020). On the Coronaviruses and Their Associations with the Aquatic Environment and Wastewater. *Water*, 12(6), 1598. <https://doi.org/10.3390/w12061598>

Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Chu, C., Chan, K., Tsoi, H., Huang, Y., Wong, B. H. L., Poon, R. W. S., Cai, J. J., Luk, W., Poon, L. L. M., Wong, S. S. Y., Guan, Y., Peiris, J. S. M., & Yuen, K. (2004). Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. *Journal Of Virology*, 79(2), 884-895. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.2.884-895.2005>

Ye, Z., Yuan, S., Yuen, K., Fung, S., Chan, C., & Jin, D. (2020). Zoonotic origins of human coronaviruses. *International Journal Of Biological Sciences*, 16(10), 1686-1697. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45472>

Zeng, Z., Chen, D., Tan, W., Qiu, S., Xu, D., Liang, H., Chen, M., Li, X., Lin, Z., Liu, W., & Zhou, R. (2017). Epidemiology and clinical characteristics of human coronaviruses OC43, 229E, NL63, and HKU1: a study of hospitalized children with acute respiratory tract infection in Guangzhou, China. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(2), 363-369. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3144-z>

CAPÍTULO VII

7. ANEXOS

7.1 DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS SELECCIONADAS

En la Tabla 20 se muestran las características clínicas (síntomas y tipo de atención médica) y demográficas (sexo, región y edad) de las 127 muestras seleccionadas correspondientes a casos de infecciones respiratorias positivas y negativas al panel viral respiratorio del año 2016 en Panamá.

Tabla 20: Características clínicas y demográficas de las muestras seleccionadas del año 2016.

# de muestra	Código de muestra	Síntomas	Tipo de atención médica	Sexo	Región	Edad (años)
1	318056	-	Hospitalizado	-	Chiriquí	<1 año (4 meses)
2	318087	-	Ambulatorio	-	Panamá	<1 año (9 meses)
3	319329	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Darién	<1 años (4 meses)
		Tos				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
4	318090	-	Hospitalizado	-	Panamá	<1 año (10 días)
5	318099	-	Hospitalizado	-	Darién	1 año
6	318124	-	Hospitalizado	-	Veraguas	<1 año (10 meses)
7	318541	-	Hospitalizado	-	Chiriquí	<1 año (2 meses)
8	318808	-	Ambulatorio	-	Colón	3 años
9	318890	-	Fallecido	-	Ngöbe Buglé	1 año
10	319056	-	Hospitalizado	-	Los Santos	1 año
11	319263	-	Hospitalizado	-	Herrera	2 años

12	319429	Tos	Hospitalizado	F	Colón	15 años
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
13	319442	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Panamá	3 años
		Tos				
14	319640	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Colón	<1 año (11 meses)
		Dificultad respiratoria				
15	321025	-	Hospitalizado	-	Panamá	<1 año (2 meses)
16	318750	-	Ambulatorio	-	Metro	19 años
17	319160	-	Ambulatorio	-	Colón	21 años
18	318793	-	Hospitalizado	-	Herrera	23 años
19	318884	-	Hospitalizado	-	Colón	56 años
20	319464	Fiebre > 38° C	Ambulatorio	F	Coclé	48 años
		Tos				
		Dolor de garganta				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
21	319624	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Coclé	82 años
		Tos				
		Dificultad respiratoria				
22	318865	-	Fallecido	-	Veragua	93 años

					s	
23	319627	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	San Miguelito	13 años
		Tos				
		Dificultad respiratoria				
24	318011	-	Hospitalizado	-	Panamá	1 año
25	318012		Hospitalizado	-	Los Santos	<1 año (8 días)
26	318089	-	Hospitalizado	-	Metro	<1 año (25 días)
27	318120	-	Ambulatorio	-	Metro	31 años
28	318167	-	Hospitalizado	-	Herrera	45 años
29	318257	-	Hospitalizado	-	Ngöbe Buglé	<1 año (4 meses)
30	318300	-	Hospitalizado	-	-	36 años
31	318319	-	Hospitalizado	-	Los Santos	< 1 año (2 meses)
32	319076	-	Hospitalizado	-	San Miguelito	1 años
33	319122	-	Ambulatorio	-	Metro	32 año
34	319140	-	Hospitalizado	-	Oeste	16 años
35	319195	-	Hospitalizado	-	San Miguelito	<1 año (2 meses)
36	319339	Fiebre >38° C	Hospitalizado	F	Herrera	9 años
		Tos				
		Rinorrea				
		Dolor en el pecho				

		Dificultad respiratoria				
37	319404	Fiebre >38° C	Ambulatorio	F	Panamá	24 años
		Tos				
		Dolor de garganta				
		Rinorrea				
38	319450	Fiebre >38° C	Hospitalizado	M	Veraguas	73 años
		Tos				
		Dolor de garganta				
		Rinorrea				
39	319593	Tos	Hospitalizado	M	Panamá	52 años
		Dolor de garganta				
		Dificultad respiratoria				
		Dolor torácico				
40	319656	Tos	Hospitalizado	M	Panamá	1 año
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
41	321267	Fiebre >38° C	Ambulatorio	M	Panamá	<1 año (6 meses)
		Tos				

		Rinorrea				
42	321277	Fiebre >38° C	Ambulatorio	F	Colón	30 años
		Tos				
		Odinofagia				
		Rinorrea				
		Disnea				
43	321342	Fiebre >38° C	Hospitalizado	M	Ngobe Bugle	<1 año (6 meses)
		Tos				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
44	321444	-	Hospitalizado	-	Coclé	3 años
45	321526	-	Hospitalizado	-	Panamá	<1 año (9 meses)
46	321543	-	Hospitalizado	-	Panamá	<1 año (1 mes)
47	321619	-	Hospitalizado	-	Guna Yala	<1 año (1 mes)
48	321638	Fiebre >38° C	Hospitalizado	M	Panamá	<1 año (1 mes)
		Tos				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
49	321649	Tos	Hospitalizado	F	Coclé	<1 año (6 meses)
		Dificultad respiratoria				

50	321739	Tos	Hospitalizado	M	Panamá	<1 año (11 meses)
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
51	321761	Fiebre >38° C	Hospitalizado	F	Coclé	52 años
		Tos				
		Dificultad respiratoria				
52	319714	Fiebre >38° C	Hospitalizado	M	Darién	32 años
53	319735	Fiebre > 38° C	Ambulatorio	M	Los Santos	37 años
		Tos				
		Dolor de garganta				
		Rinorrea				
54	319785	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Herrera	3 años
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
55	319867	Rinorrea	Ambulatorio	F	San Miguelito	40 años
		Dolor de garganta				
		Fiebre > 38° C				
		Tos				
56	319833	Rinorrea	Hospitalizado	F	Bocas del Toro	2 años
		Tos				

		Fiebre > 38° C				
57	319851	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Guna Yala	4 años
		Dificultad respiratoria				
		Tos				
58	329822	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Oeste	1 año
		Tos				
		Dolor de garganta				
		Dificultad respiratoria				
		Rinorrea				
59	319922	Rinorrea	Hospitalizado	F	Metro	<1 año (6 meses)
		Tos				
		Fiebre > 38° C				
60	319948	Fiebre > 38° C	Ambulatorio	F	Metro	30 años
		Tos				
		Rinorrea				
		Dolor de garganta				
61	319910	Tos	Hospitalizado	M	Metro	73 años
		Dificultad respiratoria				
		Fiebre > 38° C				
62	319915	Fiebre > 38° C	Ambulatorio	F	Panamá	<1 año

		Tos				(8 meses)
		Rinorrea				
63	320022	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Colón	<1 año (8 meses)
		Tos				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
64	319976	Fiebre > 38° C	Ambulatorio	M	Panamá	41 años
		Tos				
		Disnea				
		Vómitos				
		Diarrea				
		Malestar general				
65	319959	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Panamá	1 año
		Tos				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
66	320053	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Los Santos	<1 año (7 meses)
		Rinorrea				
67	320081	Tos	Hospitalizado	M	Coclé	2 años
		Rinorrea				

		Dificultad respiratoria				
68	320104	Dificultad respiratoria	Hospitalizado	M	Veraguas	39 años
		Fiebre > 38° C				
		Tos				
69	320102	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Veraguas	1 año
		Tos				
		Dificultad respiratoria				
70	320135	Tos	Hospitalizado	M	Chiriquí	<1 año (3 meses)
		Rinorrea				
71	320138	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Herrea	4 años
		Tos				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
72	320187	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Panamá	1 año
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
73	330205	Tos	Hospitalizado	M	Bocas del Toro	<1 año (3 meses)
		Rinorrea				
		Vómitos				
		Diarrea				

		Dificultad respiratoria				
74	320240	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Metro	<1 año (10 meses)
		Tos				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
75	320206	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Panamá	<1 año (9 meses)
		Tos				
		Dolor de garganta				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
		Diarrea				
		Edema en extremidades				
76	320246	Tos	Hospitalizado	F	Coclé	59 años
		Dolor de garganta				
		Rinorrea				
77	320215	Dificultad respiratoria	Hospitalizado	F	Darién	16 años
78	320304	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Coclé	<1 año (7 meses)
		Tos				
		Vómitos				

79	320274	Fiebre > 38° C	Ambulatorio	M	Herrea	1 año
		Tos				
		Dificultad respiratoria				
80	320325	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Panamá	2 años
		Tos				
81	320407	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Coclé	91 años
		Tos				
82	320423	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Ngöbe Buglé	<1 año (9 meses)
		Tos				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
83	320424	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Veraguas	1 año
		Tos				
		Dificultad respiratoria				
84	320400	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Coclé	20 años
		Tos				
85	320440	Tos	Hospitalizado	M	Coclé	<1 año (8 meses)
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
86	320461	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Colón	<1 año

		Tos				(27 días)
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
87	320490	Tos	Hospitalizado	M	Los Santos	1 año
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
		Fiebre > 38° C				
88	320557	Tos	Ambulatorio	F	Colón	23 años
		Odinofagia				
		Fiebre > 38° C				
		Rinorrea				
		Malestar general				
		Disnea				
89	320531	Tos	Hospitalizado	M	Los Santos	14 años
		Fiebre > 38° C				
90	320548	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Guna Yala	1 año
		Tos				
		Dificultad respiratoria				
91	320585	Tos	Hospitalizado	M	Coclé	<1 año (7 meses)
		Rinorrea				

		Dificultad respiratoria				
92	320570	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Herrera	75 años
		Tos				
		Dolor de garganta				
		Rinorrea				
93	320604	-	Hospitalizado	F	Panamá Oeste	8 años
94	320592	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Herrea	<1 año (1 mes)
		Tos				
		Dolor de garganta				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
95	320669	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Veraguas	23 años
		Tos				
		Dificultad respiratoria				
96	320636	Tos	Hospitalizado	M	Panamá	<1 año (2 meses)
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
97	320702	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Panamá	<1 año (3 meses)
		Tos				

		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
98	320750	Tos	Ambulatorio	F	Colón	15 años
		Rinorrea				
		Disnea				
		Odinofagia				
		Dolor torácico				
		Fiebre > 38° C				
99	320775	Tos	Hospitalizado	M	Panamá	<1 año (4 meses)
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
100	320710	Tos	Hospitalizado	M	Guna Yala	<1 año (29 días)
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
101	320717	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Herrera	64 años
		Tos				
		Dolor de garganta				
		Dificultad respiratoria				
102	320722	Dificultad respiratoria	Hospitalizado	F	Coclé	74 años

103	320793	Tos	Hospitalizado	M	Bocas del Toro	<1 año (10 meses)
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
104	320797	Rinorrea	Hospitalizado	M	Panamá Oeste	<1 año (8 meses)
		Tos				
		Fiebre > 38° C				
105	320845	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Herrera	<1 año (1 mes)
		Tos				
106	320850	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Darién	<1 año (7 meses)
		Tos				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
107	320838	Fiebre > 38° C	Ambulatorio	F	Panamá	<1 año (9 meses)
		Tos				
		Dolor de garganta				
108	320861	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Coclé	1 año
		Tos				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
109	320831	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Herrera	17 años

		Tos				
110	320879	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Panamá	<1 año (2 meses)
		Tos				
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				
111	320901	-	Hospitalizado	-	Panamá Oeste	67 años
112	320925	-	Hospitalizado	-	Panamá	<1 año (2 meses)
113	320961	-	Hospitalizado	-	Panamá	<1 año (14 días)
114	320989	-	Hospitalizado	-	Panamá	<1 año (5 meses)
115	321111	-	Hospitalizado	-	Los Santos	33 años
116	321160	-	Hospitalizado	-	Los Santos	<1 año (2 meses)
117	321148	-	Hospitalizado	-	Panamá	<1 año (4 meses)
118	321196	-	Hospitalizado	-	Veraguas	<1 año (9 meses)
119	321224	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Panamá	<1 año (4 meses)
		Tos				
		Dificultad respiratoria				
120	318648	-	Hospitalizado	-	Panamá	1 año
121	318687	-	Hospitalizado	-	Los Santos	<1 año (10 meses)
122	318714	-	Hospitalizado	-	Panamá	2 años

123	318669	-	Hospitalizado	-	Colón	59 años
124	318247	-	Hospitalizado	-	Panamá	2 años
125	319553	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	M	Panamá Oeste	52 años
		Tos				
		Disnea				
126	319999	Fiebre > 38° C	Hospitalizado	F	Panamá	29 años
		Disnea				
127	319701	Tos	Hospitalizado	M	Veraguas	<1 año (6 meses)
		Rinorrea				
		Dificultad respiratoria				

Tabla 20. Datos clínicos y demográficos de las 127 muestras seleccionadas con resultados positivos y negativos a los virus incluidos dentro del panel viral respiratorio en el año 2016. F (Femenino), M (Masculino), - (Sin información). El código de muestra en negrita corresponde a las muestras positivas a uno o más virus respiratorios.

En la Tabla 21 se presenta la información del panel viral respiratorio correspondiente a las 127 muestras seleccionadas. Estos datos provienen del Sistema de Vigilancia de Influenza y otros virus respiratorios, que en el año 2016 realizó el análisis en el ICGES para la detección de los 12 virus respiratorios más frecuentes incluidos en la vigilancia nacional.

Tabla 21: Resultados del panel viral respiratorio de las muestras seleccionadas del año 2016 en Panamá.

# de muestra	Código de muestra	A/ H1pd m	A/ H3	A / No Tipificable	B/ VIC	B/ YAM	RSV	hMPV	PIV- 1	PIV- 2	PIV- 3	AdV	RV
1	318056	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	318087	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
3	319329	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

4	318090	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	318099	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	318124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	318541	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	318808	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	318890	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	319056	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	319263	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	319429	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	319442	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	319640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	321025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	318750	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	319160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	318793	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	318884	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	319464	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	319624	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	318865	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	319627	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	318011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	318012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
26	318089	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	318120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	318167	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	318257	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	318300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	318319	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
32	319076	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	319122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	319140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	319195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	319339	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

37	319404	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	319450	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	319593	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	319656	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
41	321267	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	321277	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	321342	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
44	321444	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	321526	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	321543	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	321619	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
48	321638	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	321649	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	321739	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
51	321761	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	319714	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	319735	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	319785	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
55	319867	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
56	319833	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	319851	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	319822	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	319922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
60	319948	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
61	319910	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
62	319915	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	320022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	319976	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	*319959	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
66	320053	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	320081	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	320104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	320102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

70	320135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	320138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	320187	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73	320205	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
74	*320240	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
75	320206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	320246	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	320215	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	320304	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	320274	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
80	320325	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
81	320407	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
82	320423	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	320424	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	320400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	320440	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
86	320461	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
87	320490	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	320557	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	320531	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	320548	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
91	320585	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	320570	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	320604	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
94	320592	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	320669	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	320636	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
97	320702	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
98	320750	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
99	*320775	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
100	320710	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101	320717	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102	320722	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

103	320793	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
104	320797	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
105	320845	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
106	*320850	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
107	320838	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	320861	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	320831	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110	320879	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
111	320901	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
112	320925	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	320961	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	320989	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
115	321111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
116	321160	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
117	321148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
118	321196	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
119	321224	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	318648	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
121	318687	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
122	318714	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
123	318669	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
124	318247	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
125	319553	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
126	319999	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
127	319701	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 21. Las muestras positivas están codificadas con un signo + y las muestras negativas con un signo -. Los códigos de las muestras resaltados en negrita representan muestras positivas, mientras que el asterisco (*) indica aquellas muestras con infección simultánea por más de un virus.

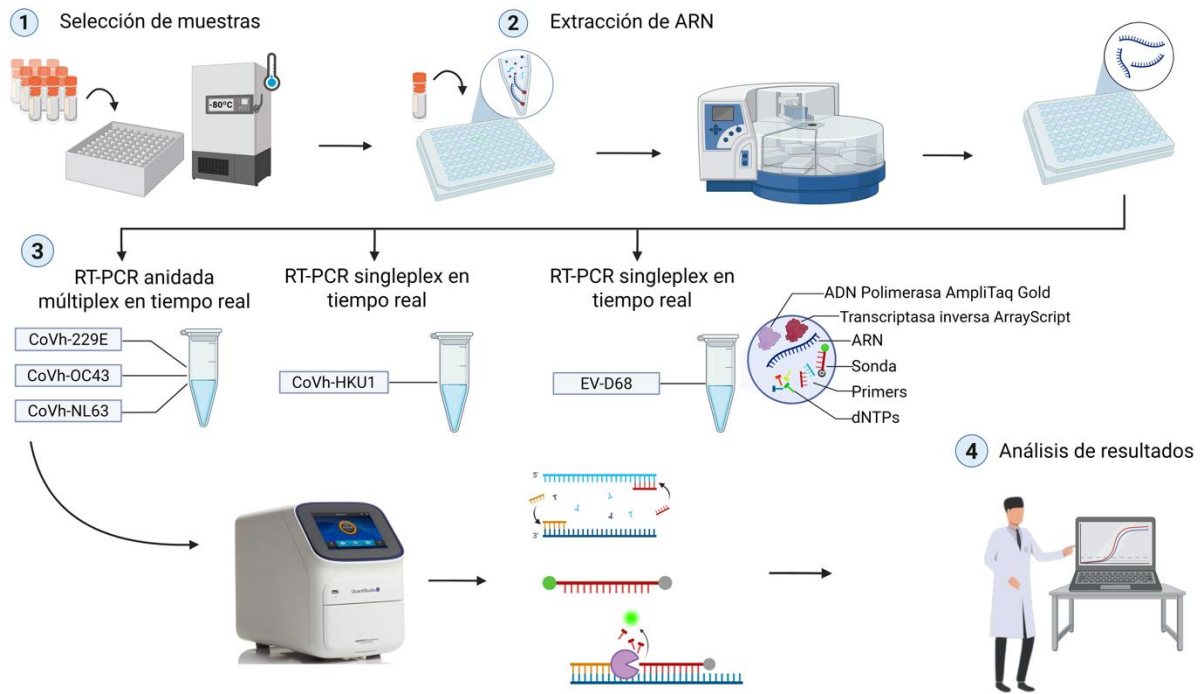


Figura 18. Representación esquemática de la metodología aplicada durante el estudio.



Figura 19. Selección de las muestras



Figura 20. Extracción de los ácidos nucleicos



Figura 21. RT-PCR en tiempo real

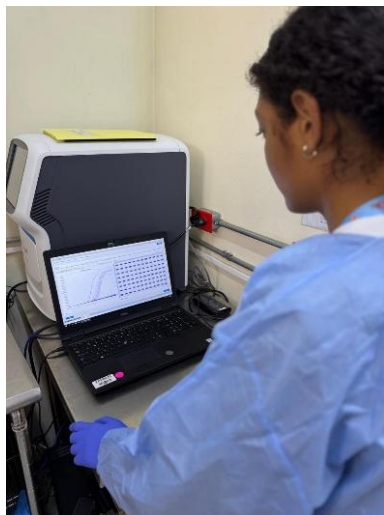


Figura 22. Análisis de los resultados