



Síndrome Respiratorio Agudo Severo: Aspectos virológicos y diagnóstico viral

Dulia Tovar¹.

¹Biólogo Molecular Jefe del Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" UCV frewjmvl97@cantv.net

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Investigadores en todo el mundo, usando diferentes métodos diagnósticos, han demostrado que un nuevo coronavirus es el causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SRAS), sin embargo no se descarta que otros patógenos actuando como oportunistas pueda agravar la progresión de la enfermedad. La comparación de la secuencia de todo el genoma, de distintas cepas del nuevo coronavirus, ha generado discrepancias en cuanto a si la epidemia de SRAS surgió como un brote único o fue producida por mas de un genotipo. El análisis del código genético permitirá explorar mejor la etiología, patogénesis y evolución de la enfermedad, así como la creación de drogas antivirales, desarrollo de vacunas, elaboración de primers más específicos y ensayos diagnósticos que permitan la detección temprana del virus causante de SRAS

PALABRAS CLAVE: SARS, Síndrome Respiratorio Agudo Severo, Neumonía Atípica, Diagnóstico de SARS.

SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME VIROLOGIC ASPECTS AND VIRAL DIAGNOSIS

SUMMARY

Researches around the world, using different diagnostic methods, have demonstrated that the cause of the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) is due to a new coronavirus, however it's not discarded that other pathogens acting as opportunists can increase the progress of the illness. The comparison of

the sequence in whole genome from differents strains of the new coronavirus has generated discrepancies about the arising of the SARS's epidemic was produced for an unique bud or for several genotypes. The analysis of the genetic code will allow a better exploration of the etiología, patogénesis and evolution, as well as the creation of antivirals drugs, development of vaccine, elaboration of more specifics primers and diagnostics assays that allow the early detection of the causing virus of SARS.

KEY WORDS: SARS, Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS diagnosis,

INTRODUCCIÓN

Una epidemia de neumonía atípica tuvo lugar en la provincia de Guangdong, China a finales de 2002. A mediados de febrero de 2003 se habían reportado 305 casos con esta enfermedad en Hong Kong, los cuales estuvieron unidos a la cadena de transmisión que se inició luego de que un médico visitó esta ciudad, padeció la enfermedad y luego murió, afectando a las personas que tuvieron estrecho contacto con él, quienes contrajeron el virus y se convirtieron en portadores y propagadores de la enfermedad^(1,2).

El nuevo desorden fue denominado Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SRAS) y se extendió más tarde a Norte América, Europa y otros países de Asia⁽³⁾.

Esta enfermedad se ubica dentro de la clasificación de neumonía atípica debido a ciertas características como la ausencia de síntomas respiratorios superiores, la presencia de tos seca, el riesgo mas marcado en los contactos del paciente y la leve desproporción de los síntomas respiratorios tanto como los hallazgos en la auscultación en comparación con los hallazgos radiográficos⁽³⁾. Por otro lado, resultados de laboratorio como linfopenia, leucopenia, trombocitopenia, enzimas hepáticas y creatinquinasa elevadas, también son propios de esta patología⁽⁴⁾.

Investigadores alrededor del mundo han hecho grandes esfuerzos para encontrar el agente causal de la enfermedad y prevenir la diseminación. En este trabajo se hace una revisión de los diferentes trabajos reportados y los resultados encontrados hasta la fecha.

Etiología – antecedentes

Los ensayos realizados para determinar la etiología de SRAS no demostraron la presencia de agentes conocidos que podrían haber estado involucrados en esta enfermedad, tales como: Influenza A y B, Parainfluenza 1, 2 y 3, virus respiratorio sincicial RSV, adenovirus, *Mycoplasma pneumoniae*, *Hantavirus*, *Citomegalovirus*, *Hendra virus* y *Nipah virus*^(3,5); la presencia de *Chlamydia pneumoniae*, en muestras de lavado broncoalveolar fue probablemente un hallazgo ocasional⁽⁵⁾.

Se evaluaron varios virus como posibles agentes etiológicos responsables de SRAS; inicialmente se pensó en el metapneumovirus humano (HMPV), representante de la familia Paramixoviridae^(6,7), debido a la detección de este virus por investigadores canadienses mediante Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) a partir de lavado broncoalveolar e hisopado nasofaríngeo de pacientes con SRAS⁽⁸⁾. Sin embargo, investigadores de la Universidad de Hong Kong no detectaron evidencia de este virus cuando evaluaron muestras de pacientes con neumonía atípica mediante amplificación genómica o detección de anticuerpos y los Centros para el control de Enfermedades de Atlanta (CDC) tampoco encontraron evidencias de metapneumovirus en ninguna de los pacientes positivos a coronavirus por RT-PCR excepto por la detección de un rhinovirus que no parece tener implicación en el proceso patológico⁽⁹⁾.

Aunque ciertas partículas sugestivas de Paramixovirus fueron vistas por investigadores alemanes mediante microscopía electrónica a partir de muestras de hisopado faríngeo y esputo proveniente de

pacientes con SRAS, los ensayos de PCR específicos para especies de la familia Paramixoviridae resultaron negativos⁽⁵⁾.

Los metapneumovirus, recientemente descubiertos⁽⁶⁾, son responsables de infecciones respiratorias en niños y adultos y el espectro de la enfermedad es de mediano a severo siendo patógenos ubicuos del tracto respiratorio por lo que no es raro detectarlos en algunas muestras clínicas tomadas de manera fortuita⁽¹⁰⁾.

El estudio de la prevalencia de este virus en pacientes asintomáticos portadores de metapneumovirus podría ser útil para interpretar el significado del hallazgo de este virus en pacientes con SRAS⁽⁸⁾.

En estudios realizados por laboratorios de Hong Kong, Alemania, Estados Unidos, y Canadá se logró caracterizar un nuevo coronavirus a partir de diversas muestras como aspirado nasofaringeo, esputo, heces y tejidos de biopsia y autopsia de pulmón, provenientes de pacientes con SRAS; paralelamente también se logró demostrar seroconversión de Inmunoglobulina G (IgG) virus específica. La positividad encontrada entre los pacientes con neumonía atípica junto con la negatividad hallada en los controles sanos suministró la evidencia para la asociación de esta enfermedad con la presencia del nuevo Coronavirus lo cual colocó a estos virus como los mas probables agentes etiológicos. Se pensó también que la coinfección de paramixovirus y coronavirus podría ser la responsable de la severidad de la enfermedad, debido al hallazgo conjunto de estos dos virus en muestras de pacientes con SRAS⁽⁸⁾. Aunque es probable que otros virus actuando como oportunistas pudieran incrementar la progresión de la enfermedad o favorecer la eficiencia de la transmisión viral, estas aseveraciones no han sido comprobadas^(4,9).

CONFIRMACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DEL SRAS

El proceso de confirmación de un nuevo patógeno como agente causal de una enfermedad es un proceso riguroso. No basta con la detección morfológica, genómica o serológica Para confirmar que el nuevo coronavirus es el agente causal de SRAS es necesario que se cumplan los postulados de Koch, los cuales establecen que el patógeno debe encontrarse en todos los casos de la enfermedad, debe ser aislado del paciente y crecido en cultivo, luego el cultivo puro del agente debe ser inoculado en un hospedador susceptible sano reproduciendo la enfermedad original y por último el mismo agente debe ser aislado de nuevo a partir del hospedador infectado experimentalmente⁽¹¹⁾.

Para tratar de reproducir la enfermedad en un hospedador susceptible, científicos del Erasmus Medical Center en Rotterdam, The Netherlands, infectaron experimentalmente tres grupos de monos; el primer grupo con cultivos de coronavirus, el segundo con cultivo de metapneumovirus y el tercero con coronavirus seguido de metapneumovirus. Solamente los monos, infectado con coronavirus desarrollaron SRAS, incluyendo síntomas clínicos y lesiones patológicas vistas en pacientes que murieron de esta enfermedad. Los monos infectados con metapneumovirus, desarrollaron una ligera rinitis y los infectados con los dos virus tuvieron una enfermedad similar a la vista en los infectados únicamente con coronavirus; lo cual demuestra que el coronavirus por sí solo es capaz de causar los típicos síntomas vistos en pacientes con SRAS.

Características biológicas de los Coronavirus

Los Coronavirus, son virus pertenecientes a la familia Coronaviridae, Orden Nidovirales; son esféricos, envueltos y pleomórficos, de simetría helical, tienen un diámetro de 80-160 nm que al microscopio electrónico tienen la apariencia de estar rodeados por un halo o corona a la que deben su nombre⁽¹²⁾. (Figura 1).

Los coronavirus son virus ARN, de simple cadena no segmentada y de polaridad positiva, con 27 a 31 kilobases (kb) de longitud siendo los virus ARN más largos conocidos funcionando directamente como

un ARN mensajero (ARNm)(12). (Figura 2). En el virus se observan 5 proteínas estructurales; la glicoproteína integral de membrana "M" o E1, que determina la salida del virus de la célula y forma la envoltura viral; la glicoproteína peplomérica de la superficie "S" o E2, la cual es el principal antígeno e interviene como receptor en el enlazamiento y la fusión celular la proteína Hemaglutinina-Esterasa "HE" o E3, la cual forma proyecciones cortas en la superficie y puede tener actividades de enlazamiento y hemaglutinación; la proteína de la nucleocápside "N", que es una fofoproteína básica y la proteína pequeña de la membrana "sM" detectada en Virus de bronquitis infecciosa en aves y Virus de lagastroenteritis transmisible porcina(13). (Figura 3) La especificidad antigenica del virión puede ser determinada por ensayos de neutralización (Proteínas S y HE) o fijación de complemento (Proteína M); la inmunidad protectora es inducida en forma de anticuerpos neutralizantes e inmunidad mediada por células (Proteína S)(12).



Figura 1
Estructura esquemática de un coronavirus²⁰

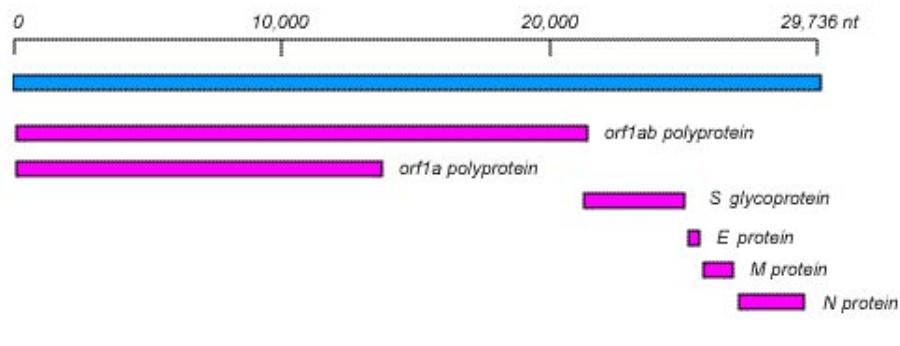


Figura 2
Diagrama del genoma de un coronavirus, se observan los transcritos que codifican para la polimerasa y las proteínas estructurales del virus²¹

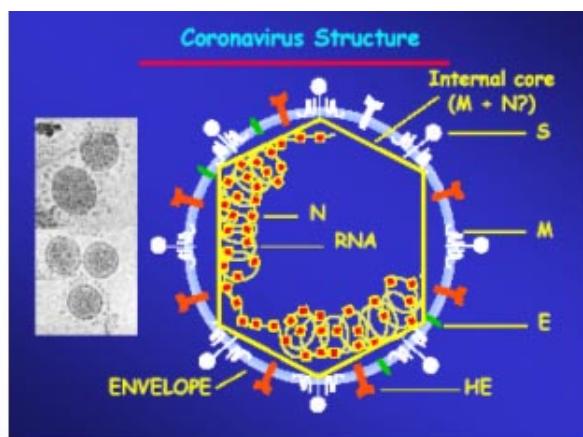


Figura 3
Modelo de la estructura de un coronavirus²²
Imagen de Microscopía Electrónica (izq), Diagrama esquemático del virión.(der)
S: glicoproteína de superficie, **M**: glicoproteína de membrana, **E**: proteína pequeña de la envoltura y
HE: Proteína hemaglutinina-esterasa

La replicación de los coronavirus comienza con la entrada del virus a la célula por fusión celular y endocitosis mediado probablemente por E2 o S; posteriormente 20 Kb de la cadena de ARN(+) son traducidos para producir una polimerasa viral que genera una cadena de ARN(-), la cual es usada como templado para producir un grupo de transcritos de ARNm (5-7), solapados, con 3' finales comunes y secuencia leader común (70 bases) hacia el 5' final. Cada ARNm es monocistrónico y produce un polipéptido; estas estructuras inusuales citoplasmáticas no son producidas post-transcripcionalmente sino durante la transcripción mediada por la polimerasa, ya que entre cada uno de los genes hay una secuencia intergénica repetida UCUAAAC la cual interactúa con la transcriptasa haciendo que la secuencia patrón sea leída y escindida sucesivamente en cada marco de lectura abierto, fenómeno que favorece la recombinación genética(12). (Figura 4)

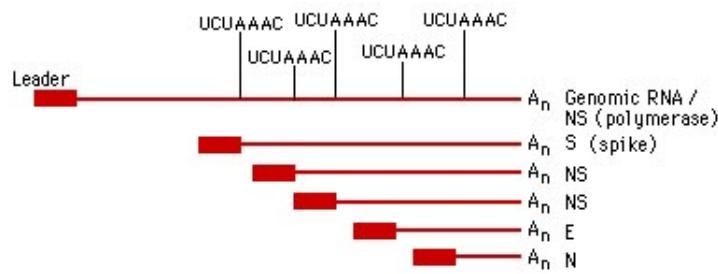


Figura 4
Replicación de los coronavirus (izquierda)²³
Transcripción de los Coronavirus (derecha)²⁴

Estos virus causan infección respiratoria en humanos siendo los tipos 229E y OC43 agentes etiológicos del resfriado común; ocasionalmente pueden producir neumonía en personas de edad avanzada, neonatos y pacientes inmunocomprometidos. También producen infección respiratoria, gastrointestinal, hepática y neurológica en animales encontrándose en aves, cerdos, perros, gatos, roedores y ganado. De acuerdo a su composición antigenica los coronavirus se ubican en tres grupos distintos siendo el 229E y OC43 pertenecientes a los grupos I y II respectivamente⁽¹²⁾.

Origen del nuevo coronavirus

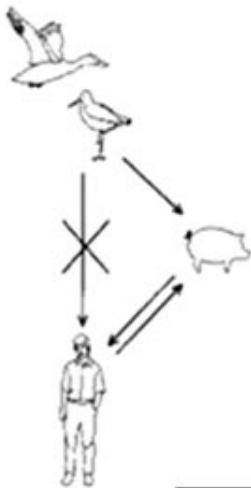


Figura 5
Salto de especies del virus Influenza

El genoma de los virus Influenza está formado de 8 fragmentos de ARN los cuales pueden ser intercambiados cuando virus genéticamente distintos se replican en un hospedador intermediario; algunos autores opinan que las pandemias originadas por virus Influenza parecen tener un origen agrícola y las vinculan con la cría de patos y cerdos en China. Las epidemias anuales o bienales son por lo regular, el resultado de mutaciones; sin embargo los virus pandémicos de influenza se originan cuando segmentos genéticos de dos cepas de Influenza se asocian para producir un nuevo virus capaz de infectar a los humanos, las aves acuáticas como los patos constituyen grandes reservorios de virus Influenza y los cerdos funcionarían como "vasos mezcladores" para la generación de nuevas cepas de influenza en mamíferos; la cría conjunta de cerdos y patos, practicada en China durante siglos, proporciona el mecanismo para crear nuevos recombinantes del virus Influenza, capaces de generar una nueva pandemia⁽¹⁴⁾.

Los coronavirus tienen el genoma más largo de todos los virus ARN y frecuentemente recombinan no sólo entre ellos mismos, sino dentro de la familia, teniendo además una alta tasa de mutación; ya que los coronavirus infectan animales, un mecanismo parecido a lo que sucede en Influenza podría explicar el origen de SRAS. (Figura 5).

En ocasiones los coronavirus son capaces de adicionar trozos de nucleótidos a su genoma cuando ellos se insertan al ADN del hospedador durante su ciclo de vida, estas porciones de ADN pueden actuar como marcadores que permiten determinar de cual animal ellos proceden, lo que puede ser usado para deducir si este coronavirus proviene de la recombinación de virus animales⁽¹²⁾.

TRANSMISIÓN

La vía mas probable de diseminación de SRAS parece ser a través de gotas expelidas por los enfermos cuando éstos tosen o estornudan que podrían alcanzar a otras personas u objetos; otra forma de diseminación es a través de aerosoles las cuales pueden permanecer en el aire y abarcar mayores áreas como ocurre con los virus Influenza y Sarampión. La alta concentración de ARN viral reportada en esputo, sugiere que la excreción de virus a partir del tracto respiratorio es la principal ruta de transmisión^{3,5}. La observación de una viremia baja hacia el 9º día del inicio de los síntomas junto con la elevación de aspartato aminotransferasa y lactato deshidrogenasa sugiere que el agente causal de SRAS no se replica sólo en el tracto respiratorio.

Ciertas evidencias indican que este virus también podría ser diseminado por las heces, sin embargo, la detección de ARN viral en estas muestras no indica que el virus sea viable o transmisible³. Se ha reportado que el nuevo coronavirus asociado a SRAS puede sobrevivir en el medio hasta 3 horas después de ser expulsado al ambiente⁹. Las personas que tienen contacto directo con individuos infectados tales como su familia o trabajadores de la salud presentan más riesgo de contagiarse

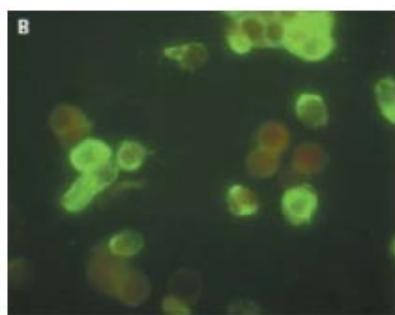
Síntomas

Esta enfermedad tiene un período de incubación de 2 a 7 días pudiendo prolongarse a 10 días; se manifiesta con fiebre mayor de 38°C (100%) asociada generalmente a malestar general (100%), dolor de cabeza (84%), mialgias (81%), mareo (61%), rigidez (55%), y síntomas respiratorios como tos seca no productiva (39%), dolor de garganta (23%) y disnea, la mayoría de los casos mejoran después de una semana, pero algunos pacientes en especial los mayores de 40 años o con enfermedades respiratorias de base pueden progresar a insuficiencia respiratoria requiriendo de ventilación mecánica en un 10%-20% de los casos siendo la letalidad de 4% aproximadamente¹.

Los hallazgos de laboratorio revelan linfopenia, trombocitopenia, leucopenia, y niveles altos de lactato deshidrogenasa y creatinfosfoquinasa, así como elevación ligera de aminotrasferasas¹⁵.

DIAGNÓSTICO

Laboratorios en todo el mundo han encontrado la evidencia de un coronavirus en pacientes con SRAS, usando una variedad de métodos diagnósticos incluyendo cultivo en células Vero, inoculación de huevos embrionados de gallina, inoculación intracerebral de ratón lactante, microscopía electrónica, inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunohistoquímica, detección de anticuerpos, amplificación por PCR y secuenciación específica del genoma. (Figura 6).



Los resultados positivos hallados para los distintos ensayos diagnósticos indican que el paciente con SRAS está o estuvo recientemente infectado con el coronavirus; sin embargo no todos los pacientes infectados con SRAS han sido diagnosticados, lo cual se debe probablemente a falsos negativos debidos a baja sensibilidad en los ensayos empleados, al tipo de muestra utilizada o la toma de la misma cuando la excreción del virus había cesado o puede tratarse en realidad de un caso negativo y el paciente no está infectado con coronavirus siendo la causa de la infección otro patógeno capaz de causar síntomas respiratorios y neumonía^(3,5,8,9).

Figura 6¹⁵
Células Vero infectadas reaccionando con el Suero convaleciente de un paciente en el ensayo de IFI (x400)

Detección viral

La detección de la partícula viral se ha logrado, en la mayoría de los pacientes con SRAS, a partir de variadas muestras como hisopado o aspirado nasofaríngeo y orofaríngeo, lavado broncoalveolar, y esputo tomadas dentro de los primeros 10 días del inicio de la fiebre y en muestras de pulmón, riñón y

nódulos linfáticos de biopsia y autopsia encontrándose que la muestra ideal parece ser el esputo debido a la alta concentración de partículas virales encontrada en esta muestra (107 millones de copias/ml); sin embargo se desconoce la duración de la viremia, las rutas de excreción y el tiempo de duración de las mismas por lo que intentos de aislamiento después de este período podría dar resultados negativos⁽¹⁵⁾.

Investigadores de la Universidad de Hong Kong, lograron el aislamiento de un coronavirus en células de riñón fetal de mono rhesus (FRhK-4) a partir de biopsia de pulmón y aspirado nasofaríngeo proveniente de dos pacientes con SARS. Este virus produjo efecto citopático (ECP) 2 a 4 días después de su inoculación y después de sucesivos pasos, las células afectadas mostraron una apariencia redondeada y retráctil, abarcando toda la monocapa celular. Científicos del CDC encontraron un ECP similar 2 a 5 días después de haber inoculado muestras de riñón, orofaringe y esputo en células de riñón de mono (Vero E6)(9); Las preparaciones de microscopía electrónica a partir de extractos de estos cultivos demostraron a través de sus características morfológicas la presencia de partículas compatibles con un coronavirus(3,4,9). (Figura 7)

Científicos alemanes y Canadienses trabajando separadamente también lograron aislar un virus que produjo ECP en células Vero, seis días después de incubarlas con muestras respiratorias de paciente con neumonía atípica, estos aislados fueron luego caracterizados como Coronavirus mediante RT-PCR(5,8). El crecimiento de coronavirus humano en células Vero es inusual ya que estos virus prefieren líneas celulares selectas, cultivo de órganos o ratones lactantes para su propagación(9). (Figura 8)

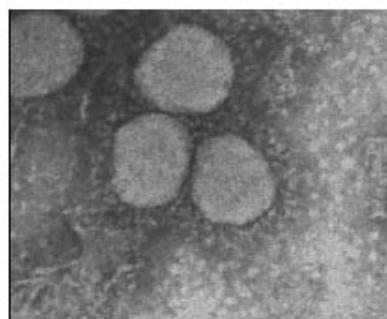


Figura 7²⁶

Microscopía electrónica de Extractos de cultivos celulares mostrando Coronavirus asociados con neumonía atípica

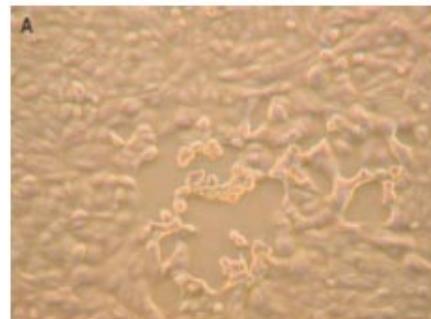


Figura 8²⁷

Células Vero E6 inoculadas con muestras de orofaringe de pacientes con SRAS. Efecto citopático temprano del Coronavirus (x40)

Ensayos Serológicos

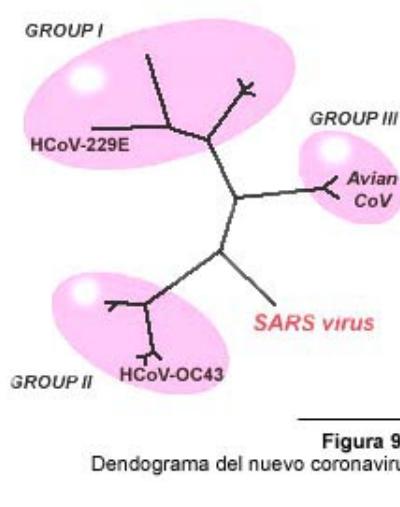
Los ensayos serológicos para la detección de anticuerpos anticonavirus se han realizado mediante detección de Inmunoglobulina M (IgM) por IFI usando como antígeno células Vero infectadas con muestras de pacientes sospechosos de SRAS y Ensayo Inmunoenzimático ligado a Enzima (ELISA) para la detección de IgG-IgA 14-21 días después del inicio de los síntomas(15). La detección de anticuerpos en sueros pareados agudo y convaleciente ha sido evaluada en pacientes sospechosos de neumonía atípica, donantes sanos y personas infectadas con coronavirus conocidos. Sólo los pacientes con SRAS mostraron seroconversión de más de 4 diluciones, usando como antígeno el propio coronavirus aislado(3,5,9). La carencia de reactividad serológica a este nuevo coronavirus entre individuos sanos sugiere que este virus no ha circulado previamente(9); la falta de reacción con suero de personas infectadas con otros coronavirus implica que hay poca reactividad antigénica cruzada entre el nuevo virus aislado y los coronavirus 229E y OC43 conocidos⁽³⁾.

Estudios moleculares

Los ensayos moleculares han sido efectuados básicamente a través de RT-PCR y secuenciación, la RT-PCR puede detectar material genético, pero esto no garantiza que lo observado se trate de un virus vivo o de una partícula inmadura incapaz de producir enfermedad.

La amplificación y secuenciación de una región conservada del gen de la polimerasa del virus causante de SRAS fue realizada mediante RT-PCR por diferentes laboratorios a nivel internacional usando o "random primers" u oligonucleótidos genéricos diseñados a partir de la alineación de secuencias de coronavirus de humanos y animales depositadas en el Banco de Genes; luego la secuencia obtenida fue utilizada para diseñar cebadores específicos que reconocieran sólo el coronavirus aislado de pacientes con SRAS; esta última secuencia obtenida se utilizó para comparar con cepas relacionadas y previamente caracterizadas(3,5,9).

El análisis de la secuencia de un fragmento de 646 pares de bases (pb) realizada por científicos de la Universidad de Hong Kong indicó preliminarmente que los virus aislados de muestras de aspirados nasofaríngeos y heces pertenecían al grupo antigenético II de los coronavirus, presentando una homología del 57% con la ARN polimerasa de coronavirus de bovinos y hepatitis de murinos confirmando que aunque pertenecen a la familia Coronaviridae son diferentes a los dos coronavirus humanos conocidos 229E y OC43⁽³⁾.



Paralelamente un segmento de 405 nucleótidos obtenido a partir de la amplificación de cultivo de muestra de hisopado faríngeo fue secuenciado por investigadores del CDC observándose que el nuevo coronavirus resultó ser genéticamente distinto a los coronavirus conocidos presentando una mayor similitud con el grupo II de coronavirus⁽⁹⁾.

Científicos alemanes realizaron la secuenciación de 300 (pb). La comparación filogenética con secuencias relacionadas indicó que el nuevo coronavirus aislado en cultivo celular a partir de esputo segregó entre los grupos genéticos II y III y su similitud fue de 61% con coronavirus bovinos y 54% con el virus de la diarrea epidémica porcina(5). (Figura 9)

Los resultados de la secuencia parcial del genoma revelaron que el nuevo coronavirus es genéticamente distinto a los coronavirus humanos conocidos y fue denominado SARS-CoV.

Investigadores del Genome Science Centre en Canadá fueron los primeros en secuenciar el genoma completo, del coronavirus responsable de SRAS equivalente a 29736 nucleótidos(8), seguidamente el CDC anunció sus propios resultados de la secuencia del virus reportando 15 nucleótidos adicionales correspondientes al inicio de la secuencia conformando un total de 29727 nucleótidos(16), investigadores chinos también lograron descifrar el código del nuevo coronavirus, reportando 29,725 kb organizados en 11 marcos de lectura abierta conteniendo una región estable que codifica para una ARN polimerasa ARN dependiente y una región variable que codifica para los genes estructurales S, E, M y N y 5 proteínas no caracterizadas aún; la alineación con todos los virus ARN conocidos lo colocó dentro de la familia de los coronavirus(17). La comparación de la secuencia del aislado de Canadá y China con la secuencia descrita por el CDC reveló una similitud cercana al 100% lo que sugirió que la epidemia de SRAS habría surgido aparentemente como un brote epidémico único, verificándose definitivamente que este virus no ha circulado anteriormente y que probablemente tiene su origen en animales, no habiendo ninguna evidencia de que haya sido creado por el hombre

Más recientemente un grupo de investigadores chinos secuenciaron el genoma completo de aislados de cultivo del caso índice de Singapur, tres contactos primarios y un contacto secundario comparando

las secuencias con los aislados de Canada, Hong Kong, Hanoi, Guandong, y Beijing. El análisis de la secuencia demostró que el nuevo coronavirus es una cepa completamente nueva, su genoma codifica para 23 putativas proteínas con funciones conocidas y desconocidas y presenta 129 variaciones en la secuencia, sin embargo ya que todas las muestras evaluadas provenían de virus propagados en cultivo de células Vero, algunas de estas 129 mutaciones pudieron haber ocurrido durante la expansión "in vitro" y no debido a las presiones inmunológicas del hospedador. Para reducir esta posibilidad los investigadores restringieron sus análisis a 16 locus conteniendo las mutaciones mas recurrentes que podrían ocurrir probablemente en su paso por el hospedador y encontraron que estas variaciones comunes definen dos genotipos distintos para el virus causante de SRAS generando discrepancias en cuanto a si la epidemia de SRAS surgió como un brote único o fue producida por mas de un genotipo(18). (Figura 10)

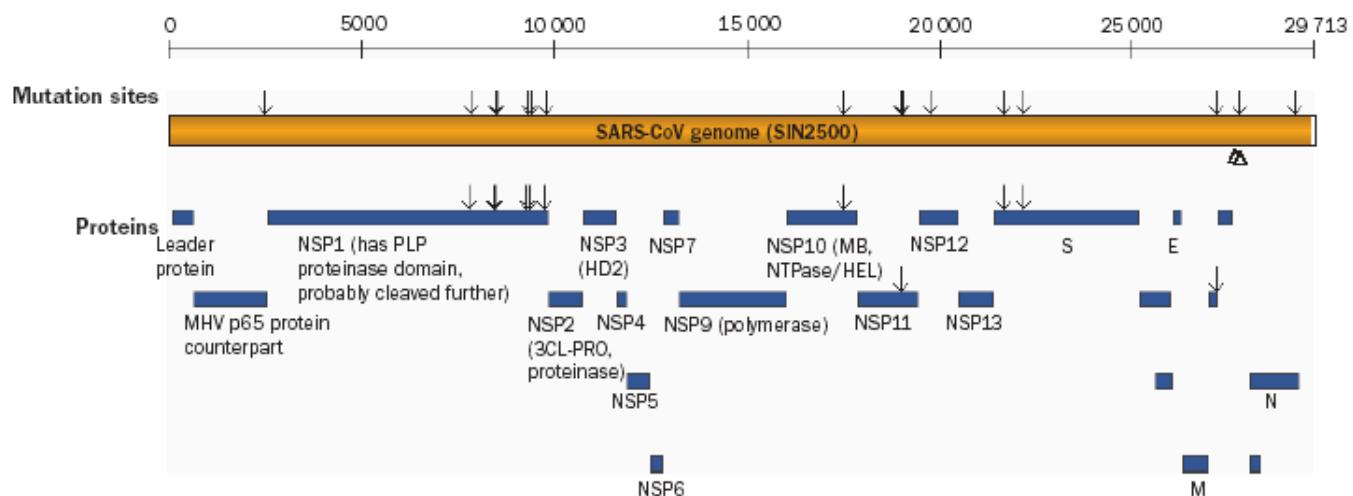


Figura 10

Estructura del genoma de SARS-CoV
La parte superior de la escala muestra la posición aproximada de los nucleótidos a lo largo del genoma SARS-CoV. Las flechas sobre el genoma muestran donde están localizadas las variaciones de los nucleótidos. Los triángulos señalan donde ocurren las dos delecciones de multinucleótidos. El genoma del agente causal de SRAS codifica 23 proteínas putativas (barras azules).

Las flechas sobre las barras azules indican la localización de los cambios de aminoácidos.

NSP: Proteínas no estructurales. S: Proteína de la Superficie. E: Proteína pequeña de la envoltura
N: Nucleocápside. M: Proteína de Membrana. MHV: Virus de la Hepatitis Murina. 3CL-PRO: Proteinasa semejante a 3C

Con la información de la secuencia del genoma completo los científicos pueden ahora explorar la etiología, patogénesis y evolución de la enfermedad, crear drogas antivirales, desarrollar vacunas, elaborar primers más específicos y ensayos diagnósticos que permitan la detección temprana del virus causante de SRAS(5,8,9,16,17).

PREVENCIÓN Y CONTROL



Para evitar la diseminación de la enfermedad, la Organización Mundial de la Salud ha tomado medidas preventivas en países donde se ha reportado casos de SRAS; algunas de ellas incluyen, restricción de visitas a estos países, vigilancia epidemiológica de pacientes que entran a hospitales y aeropuertos con signos de SRAS y medidas de seguridad para trabajadores de la salud como el uso de trajes y mascarillas especiales. Para evitar accidentes de laboratorio, el cultivo y la manipulación de virus no inactivados debe hacerse en un laboratorio de alta contención biológica con un nivel de seguridad tipo-3¹⁹. (Figura 11).

Figura 11
Traje utilizado para la manipulación de virus no inactivado

manipulación de virus no inactivados debe hacerse en un laboratorio de alta contención biológica con un nivel de seguridad tipo-3¹⁹. (Figura 11).

La prevención de la infección por Coronavirus ha sido exitosa en animales a través de la implementación de vacunas, por lo que el desarrollo de una vacuna contra el nuevo coronavirus en humanos es una posibilidad real, sin embargo es importante considerar que siendo alta la tasa de mutación genética en estos virus especialmente en la proteína S, esto podría llevar a la evolución de nuevas cepas virales, mecanismo mediante el cual los virus escapan de las defensas del hospedador lo cual podrían tener un efecto sobre el desarrollo de vacunas definitivas¹⁸.

CONCLUSIONES

Un nuevo coronavirus causa el Síndrome Respiratorio Agudo Severo. El estudio de la prevalencia del MPVH en pacientes asintomáticos podría ayudar a interpretar el significado del hallazgo de este virus en pacientes con SRAS y determinar si estos patógenos actúan como cofactores contribuyendo a incrementar la progresión de la enfermedad

No se puede descartar que la coinfección con otros patógenos sea capaz de agravar el cuadro clínico. No todos los pacientes infectados con SRAS han sido diagnosticados lo cual se atribuye a falsos negativos generados por la baja sensibilidad en los ensayos empleados, al tipo de muestra utilizada o la toma de la misma cuando la excreción del virus había cesado; los hisopados nasales y faríngeos parecen menos apropiados para el diagnóstico ya que contienen considerablemente menos partículas viral que el esputo y podría dar falsos negativos si sólo se usan estas muestras para la detección del agente causal de SRAS.

La falta de reactividad de sueros proveniente de personas sanas con células infectadas con el nuevo coronavirus indica que este virus no ha circulado previamente, esto también fue comprobado por la baja similitud encontrada entre la secuencia del agente causante de SARS con la de los coronavirus conocidos.

La alineación de la secuencia con cepas previamente caracterizadas sugiere que el nuevo coronavirus podría provenir de animales, no siendo factible que se haya originado por manipulación genética.

La comparación de la secuencia de todo el genoma entre aislados de diferentes países ha generado discrepancias en cuanto a si la epidemia de SRAS surgió como un brote único o fue producida por más de un genotipo.

La secuencia completa del genoma permitirá explorar mejor la etiología, patogénesis y evolución de la enfermedad, creación de drogas antivirales, desarrollo de vacunas, elaboración de primers más específicos y ensayos diagnósticos que permitan la detección temprana del virus causante de SRAS.

REFERENCIAS

1. Fleischauer, A.T. Outbreak of Severe Acute Respiratory Síndrome Worldwide, 2003. [en línea] MMWR. 52(11):226-228 <http://cisat.isciii.es/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5211a5.htm> [Consulta 21 mar 2003]
2. Weekly epidemiological record [en línea] WHO 78(12):81-88. <http://www.who.int/wer/pdf/2003/wer7812.pdf> [Consulta 21 mar 2003]
3. Peiris JSM, Lai ST, Poon LLM, Guan Y, Yam LYC, Lim W, et al. Coronavirus as possible cause of acute severe respiratory síndrome. [en línea] The Lancet. <http://image.thelancet.com/extras/03art3477web.pdf> [Consulta 8 abril 2003]

4. Falsey AR, Walsh EE. Novel coronavirus and severe acute respiratory síndrome. [en línea] The Lancet. <http://image.thelancet.com/extras/03cmt87web.pdf> [Consulta 8 abril 2003]
5. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt H, Becker S, et al. Identification of a novel Coronavirus in patients with Severe Acute Respiratory Síndrome. [en línea] N. Eng. J .Med. <http://content.nejm.org/cgi/reprint/NEJMoa030747v2.pdf> [Consulta 16 abril 2003]
6. Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat. Med. jun 2001; 7(6):719-724.
7. Peret TC, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus A.D. et al. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. J. Infect. Dis. 2002; 185:1660-1663.
8. Poutanem SM, Low DE, Henry B, Finkelstein S, Rose D, Green K. et al. Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome in Canada [en línea] N. Eng. J. Med. <http://content.nejm.org/cgi/reprint/NEJMoa030634v3.pdf> [Consulta 01 may 2003]
9. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith C, Kaki S.R, Peret T, Emery S. et al. A novel coronavirus associated with Severe Acute Respiratory Síndrome. [en línea] N. Eng. J. Med. <http://content.nejm.org/cgi/reprint/NEJMoa030781v3.pdf> [Consulta 16 abril 2003]
10. Nissen, M. Human metapneumovirus a new respiratory virus found in Australian children by RCH researchers. [en línea] <http://www.snp.com.au/publications/pdf/HumanMetapneumovirusArticleMNissen.pdf>. [Consulta 8 abril 2003]
11. Cann AJ. The Origins of Virology. En: Principles of Molecular Virology. 2^a Ed. Academic Press, London. 1997:1-4.
12. Holmes KV. Coronaviridae and their replication. En: Fields BN, Knipe D, editores Virology. Raven Press, New York. 1996:841-856
13. Blount A, Malone K, Hoque B. Role of Nucleocapsid protein charged residues in Coronavirus assembly [en línea] Arizona State University. <http://lsvl.la.asu.edu/ubep2003/participants/blount/>. [Consulta 8 abril 2003]
14. Majarrez MA. Virus Influenza: Enigmas del pasado y del presente. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex 1999; 12(4):290-299
15. Charles, M. Severe Acute Respiratory Síndrome (SARS) and Coronavirus Testing -United state 2003. [en línea] MMWR. 52(14):297-302. <http://cisat.isciii.es/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5214a1.htm>. [Consulta 11 abril 2003]
16. CDC Lab Sequences Genome of New Coronavirus. [en línea] CDC Media Relations. <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r030414.htm> [Consulta 14 abril 2003]
17. Qin E, Zhu Q, Yu M, Fan B, Chang G, Si B. et al. A complete sequence and comparative análisis of a SARS-associated virus. Chinese Sci. Bull. 2003; 48(10):941-948
18. Ruan Y, Wei CL, Ee LA, Vega VB, Thoreau H, Su Yung ST. et al. Comparative full-length genome sequence análisis of 14 SARS coronavirus isolated and common mutations associated with putative origins of infection. [en línea] The Lancet. <http://www.lmbe.seu.edu.cn/SARS/references/ruan-lancet0509.pdf> [Consulta 9 may 2003]
19. CDC. Interim guidance on infection control precautions for patients with suspected Severe Acute Respiratory Síndrome (SARS) and close contacts in households <http://www.cdc.gov/hcidod/sars/ic-closecontacts.htm> [Consulta 29 abril 2003]
20. Russell Kightley Media (1991). "Estructura esquemática de un coronavirus" [en línea]. Imágenes de ciencia. <<http://www.rkm.com.au/VIRUS/CORONAVIRUS/coronavirus-replication.html>>. [Consulta 28 de mayo de 2003]
21. University of Leicester. "Diagrama del genoma de un coronavirus" [en línea]. Coronavirus. <<http://www.micro.msb.le.ac.uk/3035/Coronaviruses.html>>. [Consulta 28 de mayo de 2003]
22. Arizona State University. "Modelo de la estructura de un coronavirus" [en línea]. Coronavirus. <<http://lsvl.la.asu.edu/ubep2003/participants/blount/>>. [Consulta 29 de mayo]

23. Russell Kightley Media (1991). "Replicación de los coronavirus" [en línea]. Imágenes de ciencia. <<http://www.rkm.com.au/VIRUS/CORONAVIRUS/coronavirus-replication.html>>. [Consulta 29 de mayo de 2003]
24. University of Leicester. "Transcripción de los coronavirus" [en línea]. Coronavirus. <<http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Coronaviruses.html>>. [Consulta 29 de mayo de 2003]
25. Massachusetts Medical Society (2003). "Células Vero infectadas" [en línea]. N. Eng. J.Med. <<http://content.nejm.org/cgi/reprint/NEJMoa030781v3.pdf>>. [Consulta 29 de mayo de 2003].
26. The Lancet. "Microscopia electrónica" [en línea]. <<http://image.thelancet.com/extras/03art3477web.pdf>>. [Consulta 29 de mayo de 2003].
27. Massachusetts Medical Society (2003). "Células Vero E6 inoculadas con muestras de orofaringe de pacientes con SRAS" [en línea]. N. Eng. J.Med. <<http://content.nejm.org/cgi/reprint/NEJMoa030781v3.pdf>>. [Consulta 29 de mayo de 2003].
28. University of Leicester. "Dendograma del nuevo coronavirus" [en línea]. Coronavirus. <<http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Coronaviruses.html>>. [Consulta 29 de mayo de 2003]
29. The Lancet. "Estructura del genoma de SARS-CoV" [en línea]. <<http://www.lmbe.seu.edu.cn/SARS/references/ruan-lancet0509.pdf>>. [Consulta 29 de mayo de 2003]