

Ana Mafalda Santos

Deteção de Rinovírus em amostras de ar interior e exterior

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2019



Ana Mafalda Santos

Deteção de Rinovírus em amostras de ar interior e exterior

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2019

Deteção de Rinovírus em amostras de ar interior e exterior

---

Ana Mafalda da Silva Santos

(assinatura)

Trabalho apresentado à Universidade  
Fernando Pessoa como parte dos requisitos  
para obtenção de grau de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas.

## **Sumário**

O rinovírus é um vírus de RNA de cadeia simples que pertence à família dos picornavírus e que tem três espécies. Está associado a mais de metade das constipações anuais e está normalmente associado a infeções ligeiras e autolimitadas. Em idosos e pessoas com doenças respiratórias crónicas poderá causar situações de risco de vida. As vias de transmissão deste vírus ainda são alvo de alguma discussão, mas pensa-se que será por transmissão direta (contacto dador-recetor) e transmissão indireta (aerossóis e superfícies). Neste estudo, pretendeu-se detetar a presença do vírus em amostras de ar interior e exterior e também a presença do mesmo em zaragatoas nasais de voluntários saudáveis. Relacionou-se também os resultados com as condições atmosféricas (meteorológicas e qualidade do ar). Não foram detetadas amostras de ar interior positivas. Contudo, foi detetada a presença de rinovírus em amostras de ar exterior com um pico no outono. As amostras nasais mostraram também um pico na frequência e concentração do vírus na primavera e no outono. A radiação solar, o SO<sub>2</sub> atmosférico e os níveis de benzeno mostraram influenciar a presença de rinovírus nas amostras.

**Palavras-chave:** Rinovírus, Via de Transmissão, Presença de Rinovírus no ar

**Abstract**

Rhinovirus is a single stranded RNA virus that belongs to the picornavirus family and has three species. It is associated with more than half of common cold cases and is usually associated with mild, self-limiting infections. In the elderly and people with chronic respiratory diseases, rhinovirus infection can occasionally present itself as a life-threatening condition. Rhinovirus transmission is still subject of debate, but it is thought to involve direct transmission (donor-receptor contact) and indirect transmission (aerosols and surfaces). The aim of this study was to detect the presence of the virus in indoor and outdoor air samples as well as its presence in nasal swabs of healthy volunteers. The results were also related to atmospheric conditions (weather and air quality). No positive indoor samples were detected. However, positive samples were detected in the outdoor samples with a peak in the fall. Nasal samples also showed a peak in virus frequency and concentration in spring and autumn. Sun radiation, atmospheric SO<sub>2</sub> and benzene levels have all been shown to influence the presence of rhinovirus in the samples.

**Key words:** Rhinovirus, Routes of Transmission, Airborne Rhinovirus

## **Agradecimentos**

À minha mãe, por ser a minha inspiração na vida e na profissão, pela grande mulher e profissional que é e que sempre admirei. Por acreditar em mim, mesmo quando eu não o fiz, e ser a força que impulsionou este caminho.

Ao meu pai, pela motivação nos momentos decisivos, por me ensinar a enfrentar os desafios, como ele sempre fez, e por me mostrar que tudo é possível com trabalho e sacrifício.

Aos meus irmãos, por serem sempre um apoio e por acreditarem nas minhas escolhas. Por partilharem a vida comigo, por me fazerem rir, chorar e desesperar de nervos.

À minha avó Mila, por tudo o que me ensinou, pela persistência e paciência, por me incentivar em todas as etapas e por nunca me deixar desistir.

Ao meu avô Silva, por ser o primeiro a seguir este sonho e por criar os pilares onde construímos os nossos. É com orgulho que inicio a terceira geração de farmacêuticos, que partilho do seu destino e paixão, e que aspiro partilhar o método e a ciência.

Ao meu tio Artur Jorge, pelas palavras de encorajamento, pela disponibilidade nos momentos mais desafiantes, pela partilha do saber e pelo carinho com que o fez.

Ao meu namorado e à minha melhor amiga, por estarem sempre disponíveis e por serem sempre um conforto. Pelas palavras de apoio e pelo carinho que me deram.

A todos os meus amigos e colegas de curso, por acompanharem o meu percurso e por estarem presentes. À Sofia, um agradecimento especial, pelas aventuras que partilhamos, pelos desafios que ultrapassamos, pela amizade.

Às minhas Professoras Sandra e Teresa, por reconhecerem o meu potencial no primeiro minuto, e pelo amor à química que partilharam comigo.

E, por último, ao meu orientador, pela confiança que depositou em mim, pela oportunidade de desenvolver este projeto e por todo o tempo que dispensou para me acompanhar.

## **Índice**

Sumário .....	i
Abstract .....	ii
Agradecimentos .....	iii
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas .....	viii
Abreviaturas .....	ix
I. Introdução.....	1
II. Desenvolvimento .....	2
1. Picornavírus .....	2
2. Rinovírus.....	3
2.1. História do rinovírus.....	3
2.2. Caracterização .....	3
2.3. Genoma.....	4
2.4. Espécies de rinovírus.....	5
2.5. Infecção, Replicação e Tradução .....	6
2.6. Epidemiologia .....	7
2.7. Exacerbação de outras patologias .....	9
2.8. Transmissão .....	12
2.9. Resposta Imunológica .....	18
2.10. Diagnóstico Laboratorial.....	21

2.11. Tratamento .....	23
3. Objetivos.....	27
4. Material e Métodos.....	28
4.1. Amostras .....	28
4.2. Controlos.....	29
4.3. Extração de RNA viral a partir de zaragatoas nasais .....	29
4.4. Deteção e quantificação do RNA viral.....	30
5. Resultados .....	31
5.1. Deteção de RHV nas amostras das zaragatoas nasais .....	31
5.2. Deteção de RHV nas amostras de ar .....	32
5.3. Parâmetros meteorológicos e qualidade do ar .....	32
6. Discussão .....	36
III. Conclusão .....	37
IV. Bibliografia .....	38
V. Anexos.....	43
1. Autorização da comissão de ética .....	44
2. Declaração de consentimento informado .....	45
3. Questionário recenseamento voluntários.....	46
4. Inquérito mensal para colheita de amostras.....	47
5. Poster Wurzburg – Alemanha.....	48
6. Poster V encontro da Sociedade Portuguesa de Virologia .....	49
7. Poster SPI 2018.....	50

8. Poster Euro Public Health 2018 .....	51
9. Poster SPI 2019 .....	52
10. Artigo Food and Environmental Virology .....	53

## **Índice de Figuras**

<b>Figura 1-</b> Estrutura tridimensional da cápside do RVH.....	4
<b>Figura 2-</b> Organização do genoma do RVH.....	5
<b>Figura 3-</b> Frequência de amostras de zaragatoas nasais positivas .....	31
<b>Figura 4-</b> Máximo radiação mensal versus deteção de RVH nas narinas .....	33
<b>Figura 5-</b> Níveis atmosféricos de dióxido de enxofre versus positividade de RVH nas amostras de zaragatoas nasais.....	34
<b>Figura 6-</b> Níveis atmosféricos de benzeno versus positividade das amostras de zaragatoas nasais para RVH .....	35

**Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1-</b> Classificação dos Picornavirus.....	2
<b>Tabela 2-</b> Estudos sobre a transmissão do RVH.....	13
<b>Tabela 3-</b> Primers e sondas utilizadas na deteção de RNA .....	30

## **Abreviaturas**

- CDHR3 – Terceiro membro da família das caderinas (do inglês Cadherin related family member 3)
- CD4+ - Grupo de diferenciação 4 (do inglês Cluster of differentiation 4)
- CD8+ - Grupo de diferenciação 8 (do inglês vCluster of differentiation 8)
- CXCL – Quimiocina
- DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
- dsRNA – RNA dupla cadeia
- ssRNA – RNA cadeia simples
- ELISA - Ensaio de Imunoabsorção enzimática (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
- ENA-78 – Proteína epitelial ativadora de neutrófilos 78 (do inglês Epithelial neutrophil- activating protein 78)
- FP-ENAS – Unidade de Investigação da Universidade Fernando Pessoa em Energia, Ambiente e Saúde
- G-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (do inglês Granulocyte-colony stimulating factor)
- GM-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (do inglês Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
- ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular-1
- IFN – Interferão
- Ig – Imunoglobulina
- IL – Interleucina
- IRF – Fator Regulador do Interferão
- MAVS – Molécula de Adaptação Mitocondrial

- MDA-5 - Proteína 5 associada à diferenciação de melanoma (do inglês Melanoma Differentiation-Associated protein 5)
- NASBA – Amplificação Baseada em Sequenciação de Ácidos Nucleicos
- NK - Células exterminadoras naturais (do inglês Natural Killer cell)
- OTR – Fase de leitura aberta (do inglês Open Reading Frame)
- PCR - Reação em cadeia da polimerase
- RANTES – Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
- RIG-1 – Gene indutível pelo ácido retinóico I
- RLR - Recetores do tipo RIG-I (do inglês RIG-I-like receptors)
- RNA – Ácido ribonucleico
- RT-PCR – Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
- SNP – Polimorfismo nucleótido único (do inglês single-nucleotide polymorphism)
- RVH – Rinovírus Humano
- TLR - Recetores do tipo Toll (do inglês toll-like receptors)
- UTR – Regiões não traduzidas (do inglês untranslated region)
- UV – Ultra-Violeta

## **I. Introdução**

O rinovírus foi pela primeira vez isolado em 1953. É uma espécie que pertence ao género *Enterovirus* sendo conhecidos mais de 160 genótipos. Estes estão divididos em três espécies, o Rinovírus A, Rinovírus B e Rinovírus C.

Este vírus está normalmente associado a infeções ligeiras, autolimitadas e de resolução espontânea no trato respiratório superior, sendo a constipação, a patologia mais comum. Contudo, pode também estar associado a patologias mais graves do trato respiratório inferior, em idosos e pessoas com doenças respiratórias crónicas.

Apesar deste vírus circular durante todo o ano, ele apresenta também alguma sazonalidade com picos no Outono e Primavera.

A forma de transmissão do vírus ainda é um tema com alguma controvérsia mas pensa-se que a transmissão seja feita de forma direta, por contacto direto e autoinoculação, e por transmissão indireta por aerossóis e superfícies contaminadas.

Em Portugal, a epidemiologia da infeção por rinovírus e as vias de transmissão possíveis não têm sido alvo de estudo. Assim, no presente trabalho pretendeu-se estudar a presença do vírus em narinas de voluntários e em amostras de ar, de modo a: caracterizar a sazonalidade do vírus e a estudar o papel da transmissão aérea para este vírus. Foram assim definidos os seguintes objetivos:

- ➔ Caracterizar a sazonalidade do rinovírus em Portugal tanto pela sua presença nas narinas de voluntários como pela sua presença no ar.
- ➔ Detetar e quantificar a presença de rinovírus em amostras semanais de ar interior e exterior e relacionar a deteção com a presença de rinovírus em indivíduos jovens saudáveis que frequentam habitualmente os locais de colheita de ar
- ➔ Estudar se os parâmetros meteorológicos e da qualidade do ar se relacionam ou influenciam de alguma forma a frequência de amostras positivas para rinovírus.

## II. Desenvolvimento

### 1. Picornavírus

Os picornavírus são pequenos vírus (30nm), sem invólucro lipídico, e com uma cápside icosaédrica constituída por 60 subunidades e 12 vértices pentaméricos. O genoma deste vírus é constituído por uma cadeia de RNA de polaridade positiva que pode variar de 6.7 Kb a 10.1 Kb (Tuthill *et al.*, 2010; Dietzgen *et al.*, 2017; Zell, 2018; Cifuentes and Moratorio, 2019).

Esta classe foi designada de *Picornaviridae* e o seu nome teve origem nas palavras pico, RNA e vírus, indicando que este é um vírus de RNA muito pequeno. São vírus muitas vezes associados a patologias ligeiras (constipações, síndromes febris e situações de resolução espontânea), contudo, podem também causar outras patologias mais graves (hepatite A, encefalite, poliomielite e miocardite). Estes vírus não infetam apenas o ser humano, podendo afetar também alguns animais (Miller, 2010; Cabeda *et al.*, 2014).

Ao longo dos anos, a classificação dos diferentes géneros na família dos picornavírus tem sido feita de diversas formas, sendo que, atualmente, a classificação tem-se baseado na sequenciação total ou parcial do genoma do vírus. Contudo, ocorreu nos últimos anos um aumento significativo na descoberta de novos picornavírus (Tabela 1).

**Tabela 1-** Classificação dos Picornavírus (adaptado de Group, 2019)

Género	Data Aprovação	Género	Data Aprovação	Género	Data Aprovação
<i>Aalivirus</i>	2018	<i>Harkavirus</i>	2009	<i>Potamipivirus</i>	2009
<i>Ampivirus</i>	2017	<i>Hepatovirus</i>	2009	<i>Rabovirus</i>	2009
<i>Aphthovirus</i>	1978	<i>Hunnivirus</i>	2009	<i>Rosavirus</i>	2009
<i>Aquamavirus</i>	2013	<i>Kobuvirus</i>	2009	<i>Sakobuvirus</i>	2009
<i>Avihepatovirus</i>	2009	<i>Kunsagivirus</i>	2009	<i>Salivirus</i>	2009
<i>Avisivirus</i>	2009	<i>Limnipivirus</i>	2009	<i>Sapelovirus</i>	2009
<i>Bopivirus</i>	2009	<i>Megrivirus</i>	2009	<i>Senecavirus</i>	2009
<i>Cardiovirus</i>	2009	<i>Mischivirus</i>	2009	<i>Shanbavirus</i>	2009
<i>Cosavirus</i>	2009	<i>Mosavirus</i>	2009	<i>Sicinivirus</i>	2009
<i>Crohivirus</i>	2009	<i>Orivirus</i>	2009	<i>Teschovirus</i>	2009
<i>Dicipivirus</i>	2009	<i>Oscivirus</i>	2009	<i>Torchivirus</i>	2009
<i>Enterovirus</i>	2009	<i>Parechovirus</i>	2009	<i>Tremovirus</i>	2009
<i>Erbovirus</i>	2009	<i>Pasivirus</i>	2009		
<i>Gallivirus</i>	2009	<i>Passerivirus</i>	2009		

Uma vez que esta família apresenta cada vez maior diversidade, a complexidade dos critérios para a classificação dos picornavírus está também a aumentar. Atualmente, existem mais de 35 géneros (Cabeda *et al.*, 2014; Dietzgen *et al.*, 2017; Zell, 2018).

## **2. Rinovírus**

### **2.1.História do rinovírus**

O rinovírus foi pela primeira vez isolado em 1953. O seu isolamento foi feito a partir de uma amostra de uma lavagem nasal e efetuado *in vitro*, em amostras de explantes pulmonares. Este estudo decorreu na *The Common Cold Research Unit* em Inglaterra. Esta estirpe identificada veio mais tarde a ser classificada como HRV9 (Stott and Killington, 1972; Blomqvist, 2004).

Mais tarde, em dois laboratórios dos Estados Unidos foram isolados novos agentes a partir de amostras de lavagens nasais e isoladas em culturas de tecidos de rins de macacos. Estas estirpes apresentaram-se idênticas e por isso foram designadas de Echo 28, agora designadas de HRV1A (Blomqvist, 2004).

Nos anos 60, houve um avanço no isolamento do rinovírus. Tyrrell e Parsons conseguiram a partir de células embrionárias de rins humanos mimetizar as condições no epitélio nasal e isolar a estirpe HGP, atualmente designada de HRV2 (Gwaltney, 1997; Blomqvist, 2004).

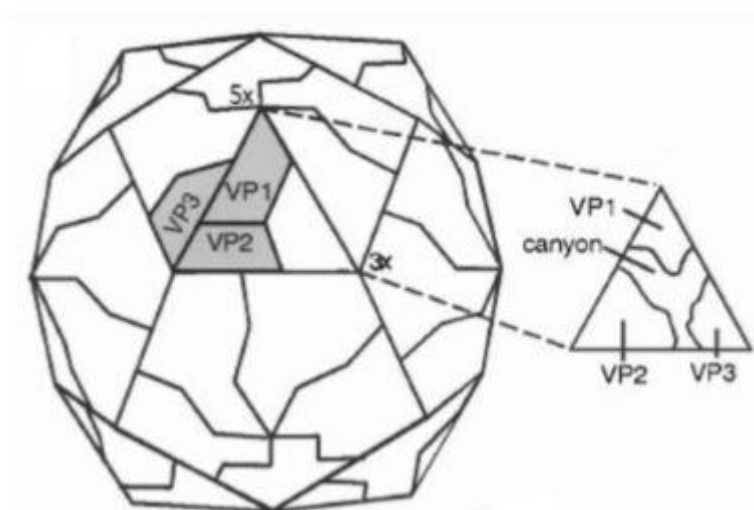
Com a descoberta de todas estas novas estirpes, cada laboratório foi nomeando as estirpes de forma diferente, apesar de saberem que todas elas estavam associadas à constipação. Porém, rapidamente começaram a aperceber-se das semelhanças biológicas entre todas as estirpes. Assim, em 1961, Andrewes sugeriu o nome Rhinovirus uma vez que, todos os vírus pareciam ter afinidade especial para crescer no epitélio nasal (Stott and Killington, 1972; Blomqvist, 2004).

### **2.2.Caracterização**

O Rinovírus é uma espécie que pertence ao género *Enterovirus* da família *Picornaviridae*. É um vírus com RNA de cadeia simples com polaridade positiva (7200 bases), de forma esférica e pequeno (Blomqvist, 2004; Fuchs and Blaas, 2010; Waman *et al.*, 2014).

Algumas das características específicas deste vírus são o facto de não apresentar um invólucro lipídico, o que lhe confere uma resistência ao éter, clorofórmio, álcool e detergentes. É também um vírus que consegue resistir a pH entre 6-8 (Tyrrell and Chanock, 1963; Ferreira and Sousa, 2002; Blomqvist, 2004).

O rinovírus apresenta também uma cápside. Esta estrutura é constituída por 60 subunidades proteicas e 12 vértices pentaméricos. A cápside apresenta 4 proteínas estruturais, VP1 a VP4. A VP1, VP2 e VP3 são proteínas que se localizam à superfície e formam uma estrutura tridimensional, que contém uma fenda (Figura 1). Esta fenda é designada de *canyon* e serve de local de ligação dos recetores específicos das células. A VP4 está na superfície interna e em contacto com RNA viral (Blomqvist, 2004; Mackay, 2010; Cabeda *et al.*, 2014).



**Figura 1-** Estrutura tridimensional da cápside do RVH (adaptado de Blomqvist, 2004)

### **2.3.Genoma**

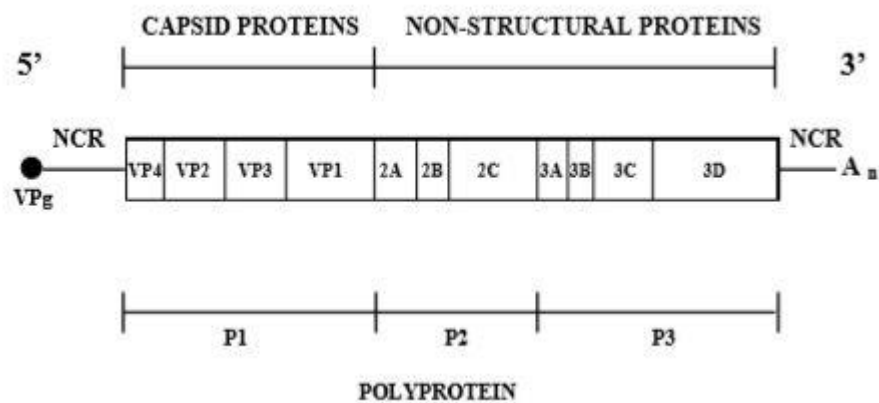
O genoma é constituído por uma única cadeia de RNA de polaridade positiva e que por isso funciona como RNA mensageiro e é alvo da tradução. Em cada extremidade do mesmo existem regiões não traduzidas (UTR) que são designadas de região 5'UTR e 3'UTR (McErlean *et al.*, 2008; Cabeda *et al.*, 2014).

A região 5'UTR tem entre 610-625 bases e é onde se encontra a região envolvida na iniciação da replicação e tradução. É nesta região que ocorre a ligação aos ribossomas

e a escolha do codão de iniciação. Esta região tem ainda, ligada covalentemente a si, uma proteína designada de VPg (Blomqvist, 2004; Cifuentes and Moratorio, 2019).

A região 3'UTR termina numa cauda poli-A curta que confere estabilidade ao genoma (Cabeda *et al.*, 2014; Cifuentes and Moratorio, 2019).

No genoma, existe ainda uma região codificante que se encontra entre as duas anteriores designada de *open reading frame* (OTR) que codifica uma poliproteína (2100-2200 aminoácidos). Esta poliproteína vai ser clivada e dar origem a proteínas estruturais e não estruturais. A região P1 da poliproteína vai dar origem as proteínas estruturais VP0, VP1 e VP3, por clivagem, a VP0 origina posteriormente a VP2 e VP4, formando assim as 4 proteínas da cápside. As regiões P2 e P3 originam as proteínas não estruturais. A P2 dá origem às proteínas 2A, 2B e 2C. A P3 origina as proteínas 3A, 3B, 3C e 3D que estão envolvidas no processamento do polipéptido e na replicação viral (Blomqvist, 2004; Cabeda *et al.*, 2014; Cifuentes and Moratorio, 2019).



**Figura 2-** Organização do genoma do RVH (adaptado de (Blomqvist, 2004))

#### 2.4. Espécies de rinovírus

São conhecidos mais de 160 genótipos de rinovírus. Estes estão divididos em três espécies, o Rinovírus A, Rinovírus B e Rinovírus C. A existência de vários tipos de rinovírus, com diferentes complexidades e diferentes tropismos assim como, diferentes potenciais de virulência fazem com que este seja um vírus que pode ter manifestações clínicas e capacidades de disseminação muito diferentes. A existência de muitas estirpes

leva à necessidade de se efetuarem mais estudos (Royston and Tapparel, 2016; Ms, Palmenberg and Gern, 2019).

O rinovírus C foi descoberto mais recentemente, mas já circula há 250 anos. Esta espécie foi descoberta através de novas técnicas de biologia molecular uma vez que esta espécie não cresce nas linhas celulares padrão (Royston and Tapparel, 2016; Palmenberg, 2017).

O Rinovírus C não possui estirpes emergentes e está associado a patologias de baixa severidade. Assim como os outros RVH este também apresenta uma maior prevalência em crianças, contudo, apresenta-se de forma mais severa do que os outros rinovírus. Este vírus está mais associado a infeções do trato respiratório inferior (Lau *et al.*, 2010; Royston and Tapparel, 2016; Marcone *et al.*, 2017).

As espécies de rinovírus A e C são detetadas mais frequentemente que a B em amostras nasais (Lau *et al.*, 2010; Royston and Tapparel, 2016).

## **2.5. Infeção, Replicação e Tradução**

Após o contacto com o rinovírus, a infeção vai acontecer pela ligação do *canyon* da cápside do vírus a uma molécula da superfície da célula do hospedeiro que vai funcionar como recetor (Royston and Tapparel, 2016).

As espécies A e B pertencentes ao grupo maior usam ICAM-1 como recetores de entrada. Algumas estirpes do RVH A (grupo menor de 12 RVH) usam os Recetores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-R). A espécie C utiliza o CDHR3 (Abraham and Colonno, 1984; Greve *et al.*, 1989; Blaas and Fuchs, 2016; Royston and Tapparel, 2016; Casanova *et al.*, 2018).

A ligação ao recetor na superfície da célula vai desencadear mudanças conformacionais na cápside do vírus, originando a desestabilização da partícula viral que por sua vez leva à explosão da proteína VP4. Isto leva à formação de poros na cápside que vão levar à libertação do ARN viral no citoplasma da célula hospedeira (Cabeda *et al.*, 2014).

Depois desta primeira etapa o genoma viral vai ser traduzido de forma a fornecer proteínas essenciais à replicação e à produção de novas partículas virais. Numa primeira fase a poliproteína vai ser clivada em P1, P2 e P3 com o auxílio de proteinases (3A e

3C/3CD). Depois vai haver uma nova clivagem em que a P1 irá dar origem a proteínas estruturais, VP0, VP1 e VP3. A VP0 vai ainda sofrer nova clivagem de modo a origina a VP4 e VP2. A clivagem da P2 e P3 vai dar origem às proteínas necessárias à replicação e à síntese do RNA mensageiro (Blomqvist, 2004; Ms, Palmenberg and Gern, 2019).

Numa segunda etapa vai haver a formação de uma cadeia de RNA- complementar à cadeia de RNA+ genómico. A síntese desta cadeia vai ser iniciada no final da região 3'UTR e vai depois ser usada para sintetizar novas cópias do genoma viral, para originarem novas proteínas virais ou para sintetizar novas partículas virais. Os novos vírus são depois montados no citoplasma e libertados da célula por lise celular ou exocitose (Blomqvist, 2004; Cabeda *et al.*, 2014).

## **2.6.Epidemiologia**

O rinovírus está normalmente associado a infeções ligeiras, autolimitadas e de resolução espontânea no trato respiratório superior, sendo a constipação, a patologia mais comum (Oliveira *et al.*, 1993; Brownlee and Turner, 2008). Contudo, pode também estar associado a patologias mais graves do trato respiratório inferior como a pneumonia nos idosos e imunocomprometidos, a um aumento da DPOC, exacerbação da asma e ainda otites médias (Cabeda *et al.*, 2014; Royston and Tapparel, 2016).

Apesar deste vírus circular durante todo o ano, ele apresenta também alguma sazonalidade com picos no Outono (setembro a novembro) e Primavera (abril a maio). Durante estes picos o rinovírus está associado a cerca de 90% das constipações em adultos assim como à maior parte das doenças do trato respiratório nas crianças. Estudos mostram que o pico do Outono pode estar associado ao regresso às aulas, enquanto que para o pico da Primavera ainda não foram encontradas evidências de causalidade com algum acontecimento. Ainda que a sazonalidade tenha a sua contribuição, a infeção por rinovírus depende também de outros fatores, tais como a idade, o sexo, as condições socioeconómicas e as condições sanitárias (A S Monto, 2002; Arnold S. Monto, 2002; Gern, 2002; Peltola, Waris, Österback, Susi, Hyypiä, *et al.*, 2008; Cabeda *et al.*, 2014).

A sintomatologia associada a uma infeção por rinovírus pode variar bastante atingindo o seu pico 2 a 3 dias após a infeção. Normalmente o primeiro sintoma associado à infeção é obstrução nasal, posteriormente, os doentes costumam apresentar rinorreia e espirros. Em alguns casos mais graves pode ocorrer tosse, dores de cabeça, perda de

paladar e olfato, ardência dos olhos, mal-estar e febre (Hendley, 1999; Blomqvist, 2004; Cabeda *et al.*, 2014).

Quando a infecção por rinovírus está associada ao trato respiratório inferior assim como a outras patologias pré-existentes, a sintomatologia pode ser ainda mais grave, nomeadamente tosse, falta de ar, sensação de aperto no peito e pieira (Kennedy *et al.*, 2012).

Embora a infecção por rinovírus pareça afetar todas as classes etárias apresenta-se de forma mais agressiva e duradoura nos idosos e crianças, sendo que estes também apresentam uma maior probabilidade de reincidência. Enquanto que o tempo de duração da patologia nos adultos é de cerca de 7 dias, em alguns casos e nas classes etárias referidas anteriormente pode durar até duas semanas (Blomqvist, 2004; Peltola, Waris, Österback, Susi, Ruuskanen, *et al.*, 2008; Cabeda *et al.*, 2014).

O período de incubação deste vírus ainda não foi determinado com certeza, uma vez que esta é uma infecção muitas vezes assintomática e de resolução espontânea, não se conseguindo identificar o momento de contágio. Contudo, pensa-se que possa ser 2/3 dias até a um máximo de 5 dias. Ainda que, estudos experimentais indiquem que o tempo pode ser tão curto como entre 8/12 horas (Gwaltney, 2002; Blomqvist, 2004; Cabeda *et al.*, 2014).

## **2.7.Exacerbação de outras patologias**

### **2.7.1. Asma**

Através de estudos sobre este tema concluiu-se que a presença de infeção por rinovírus está muitas vezes associada a uma exacerbação da asma. Dentro das infeções no trato respiratório superior, 80 a 85% estão associadas a uma exacerbação desta patologia sendo que dentro destas 60 a 70% são associadas a infeção por RVH (Gern, 2002; Kennedy *et al.*, 2012).

Sabe-se também que em crianças com sibilo associado a infeção por RVH na infância tem maior probabilidade (10 vezes mais) de desenvolver asma do que crianças com sibilo associado a infeção por outros patógenos. O rinovírus está também associado a internamentos nos cuidados intensivos de crianças com bronquiolite, sendo o segundo vírus mais provável de estar associado a esta patologia. Crianças com bronquiolite associada a este vírus têm três vezes mais probabilidade de desenvolver asma (Peltola, Waris, Österback, Susi, Hyypiä, *et al.*, 2008; Mackay, 2010).

Apesar de estar comprovado que existe uma correlação entre a presença de RVH e uma exacerbação da asma ainda não são bem conhecidos os mecanismos que levam a isto. Sabe-se que os asmáticos não apresentam uma maior taxa de replicação do vírus mas sim sintomatologia mais frequente e mais severa (Mackay, 2010; Kennedy *et al.*, 2012).

Algumas teorias associadas a esta correlação são que: os asmáticos poderão ter uma deficiência na sua resposta imune inata baseada no facto de terem uma diminuição da expressão do IFN- $\alpha$  e da IL-15 o que levaria a um aumento da carga viral e sintomatologia mais duradoura. Outra possibilidade seria a existência de uma ligação entre a capacidade do RVH induzir a exacerbação e uma resposta alérgica. Ou seja, existiria uma reação sinérgica entre o modo do RVH atuar e uma reação alérgica mediada por IgE. Esta teoria é suportada pelo facto de que quando os pacientes são submetidos a terapia anti-IgE (omalizumab) é possível bloquear a sazonalidade associada a exacerbação da asma. Pensa-se que o RVH aumenta a reação alérgica pois tem a capacidade de alterar as ligações intracelulares o que permite que os alérgenos tenham acesso às mucosas (Gern, 2002; Kennedy *et al.*, 2012; Stone and Miller, 2016).

Para além disto, descobriu-se a presença de um polimorfismo de nucleótido único (SNP) no gene que dá origem ao recetor CDHR3 usado pelo RVH-C. Este polimorfismo estava associado previamente a uma exacerbação da asma. Mais tarde descobriu-se que

isso acontecia porque a presença do polimorfismo permitia uma maior ligação do RVH C e uma maior replicação deste intensificando a sintomatologia asmática (Royston and Tapparel, 2016; Palmenberg, 2017).

### **2.7.2. Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC)**

Nos últimos anos vários estudos demonstraram que existe uma associação significativa entre a exacerbação da DPOC e infeções respiratórias virais. Estudos com pacientes com e sem exacerbação desta patologia, mostram que pacientes com RVH apresentam quatro vezes mais probabilidade de exacerbação da DPOC. Nos pacientes com exacerbação da DPOC os vírus mais encontrados foram os picornavírus. Para esta avaliação foram recolhidos fluidos de lavagem nasal e colheitas nasofaríngeas. Esta descoberta vem apoiar a teoria de que o rinovírus está associado a uma exacerbação desta patologia (Mackay, 2010; Hershenson, 2013).

### **2.7.3. Fibrose cística**

Alguns estudos avaliaram o papel das infeções virais nas exacerbações respiratórias em pacientes com fibrose cística. Em pacientes com esta exacerbação, o rinovírus foi o vírus mais detetado por métodos moleculares. Outro estudo, mostrou que os efeitos do RVH nas vias respiratórias inferiores pode ser dependente da espécie ou estirpe presente uma vez que, o RVH-C foi associado a uma exacerbação respiratória mas o A e B não (Mackay, 2010).

### **2.7.4. Otite média aguda**

O rinovírus está muitas vezes associado a otites médias sendo que, estudos provam a sua presença em 41% das otites médias em crianças. Existem também estudos feitos com o tecido adenoide de crianças com otites médias recorrentes ou hipertrofia adenoide em que o RVH foi detetado em 45% das amostras. A otite média com presença de RVH está também muitas vezes associada a uma coinfeção com bactérias. Estudos mostraram que as bactérias mais recorrentes associadas a esta condição são *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* (Brownlee and Turner, 2008; Peltola, Waris, Österback, Susi, Hyypiä, *et al.*, 2008; Mackay, 2010).

### **2.7.5. Pneumonia**

Fazer um diagnóstico de pneumonia é sempre difícil uma vez que, a colheita de amostras do pulmão é complicada. Apesar disto, sabe-se que o rinovírus é capaz de se replicar no trato respiratório inferior e que este foi detetado em amostras de expectoração.

Os estudos sobre a influência do rinovírus no desenvolvimento de pneumonia são controversos pois apesar de este ser o patógeno mais comum em pacientes com pneumonia adquirida na comunidade, em crianças, a causa da pneumonia são normalmente outros vírus e não RVH (Larwood, 2000; Peltola, Waris, Österback, Susi, Hyypiä, *et al.*, 2008; Mackay, 2010).

A pneumonia associada ao rinovírus encontra-se normalmente associada também à coinfeção por bactérias como *S.pneumoniae*. O facto de ser uma infeção viral e bacteriana faz com que tenha uma resposta mais fraca aos tratamentos (Peltola, Waris, Österback, Susi, Hyypiä, *et al.*, 2008).

Os mecanismos envolvidos na pneumonia associada as infeções por rinovírus ainda não estão muito bem estudados, mas pensa-se que o facto do RVH infetar as células epiteliais leva a uma maior aderência dos pneumococos e que o RVH atua também por prejudicar a resposta imune dos macrófagos às bactérias. Contudo, são necessários mais estudos para suportar estas hipóteses (Peltola, Waris, Österback, Susi, Hyypiä, *et al.*, 2008).

## **2.8. Transmissão**

Desde o descobrimento do rinovírus que os investigadores tentam descobrir quais as vias de transmissão do mesmo. Contudo, ainda hoje permanece acesa a discussão de qual a via de transmissão mais eficaz e mais comum.

Vários estudos indicam que o vírus pode ser transmitido através de contacto direto, autoinoculação, aerossóis ou até mesmo por contacto indireto com objetos infetados (Huillier *et al.*, 2015).

Alguns dados são que a transmissão através de contacto entre uma pessoa infetada e uma pessoa saudável pode ser feita pelo simples contacto das mãos e posterior autoinoculação do vírus na mucosa nasal ou no saco conjuntival. A inoculação pelo saco conjuntival é feita através da passagem do vírus pelo ducto nasolacrimal (Hendley, 1973; Gwaltney and Hendley, 1978; Gwaltney, Moskalski and Hendley, 1978).

Quanto a transmissão por aerossóis, os dados são mais contraditórios pois na maioria dos casos conclui-se que não é eficiente enquanto que em outros conclui-se que poderá até ser a forma mais eficiente de transmissão do vírus. Sabe-se também que estes aerossóis podem ser facilmente formados através de espirros, tosse ou mesmo falar e que o seu tamanho poderá afetar a eficiência da transmissão (Dick *et al.*, 1987; Mackay and Arden, 2014).

Sabe-se também que o RVH consegue ser detetado numa sala/ambiente fechada por horas e até dias e que na pele humana consegue manter-se durante 2h. Outro dado existente é que o RVH sobrevive mais tempo em superfícies duras e tecidos não porosos. Apesar disto, existem estudos em que se conclui que a transmissão através de objetos/fomitos não é possível enquanto que em outros se conclui que esta é possível (Gwaltney and Hendley, 1982; Gwaltney, J. M. ; Hendley, 1988).

De seguida, apresenta-se uma tabela com os diversos estudos feitos e algumas conclusões.

**Tabela 2-** Estudos sobre a transmissão do RVH

<b>Investigador</b>	<b>Condições</b>	<b>Duração</b>	<b>Taxas de infeção</b>	<b>Modo transmissão</b>	<b>Conclusões</b>
<b>Couch</b>	Dador e recetor separados por uma barreira de arame	26 dias	0/20	Pequenos aerossóis	Como não houve infeção, prova que não é transmissível por aerossóis.
<b>D'Alessio et al.</b>	Dador e recetor dentro de uma sala de pequenas dimensões	2-3 horas	0/9	Todas	Esta experiência não permite tirar conclusões uma vez que, não houve infeção. Nenhuma via de transmissão foi descartada ou provada.
	Dador e recetor partilham um dormitório	+12h/dia durante 3 dias	1/11	Todas	
	Dador e recetor beijam-se	1 min.	1/16	Contacto direto através de inoculação na mucosa oral	Provou que inoculação do vírus nesta mucosa é ineficiente em iniciar infeção.
	Casais em que um serve de dador e outro de recetor a viver na mesma casa	63-149h durante 7 dias	9/24	Todas	Não é possível concluir nada sobre o meio de transmissão porque todas as vias estavam disponíveis.
<b>Holmes et al.</b>	Dador, em espaço fechado e sobrelotado, com os recetores		7/8	Todas	Não se tiraram conclusões mas serviu de molde para o "Antartic hut model"

Investigador	Condições	Duração	Taxas de infeção	Modo transmissão	Conclusões
<b>Hendley and Gwalthey</b>	Dador contamina as mãos e toca nos dedos do recetor. Recetor toca depois na sua mucosa nasal ou conjuntiva	Duas vezes, durante 15 seg., nos dias do pico da infeção.	11/15 infetados 20/43 tinham mãos contaminadas 8/9 com mãos contaminadas ficaram infetados	Contacto direto com autoinoculação.  Dador usa máscara para eliminar os aerossóis.  Aerossóis grandes	Este método permitiu concluir que a transmissão por contacto direto/autoinoculação é muito eficiente. Já para os aerossóis grandes a transmissão é pouco eficiente podendo a taxa de infeção estar associada a um contato de um dador com um recetor antes do período de isolamento visto que este só começava 36h após primeira exposição. Para os aerossóis pequenos conclui-se que estes não são eficientes em transmitir o vírus.
	Dador contacta com recetores através de uma mesa pequena	15 min, dador tosse/espirra/fala de forma exagerada	1/12	Dador e recetor usam luvas para evitar outras transmissões	
	Dador contacta com recetor numa sala fechada, mas com uma barreira de arame dupla para evitar contacto	72h, três dias Sem entrada de ar exterior	0/10	Aerossóis pequenos	
<b>Hendley and Gwalthey</b>	Dadores sintomáticos contaminaram s suas mãos e pegaram depois numa chávena de cerâmica. Passados 10 min.		5/10 Vírus foi detetado em uma das chávenas	Fômites	Provou-se que a transmissão através de objetos é possível e é uma importante via de transmissão. Quanto à desinfeção

Investigador	Condições	Duração	Taxas de infeção	Modo transmissão	Conclusões
	<p>Algumas chávenas foram desinfetadas, outros não. 10 min depois, recetor pega na chávena como se estivesse a beber. Recetor toca depois na mucosa nasal ou conjuntiva.</p> <hr/> <p>Dadores sintomáticos contaminaram as suas mãos e pegaram depois num quadrado de plástico. Passados 10 min. Alguns azulejos foram desinfetados, outros não. 10 min depois, recetor toca no plástico com os dedos. Recetor toca depois na mucosa nasal ou conjuntiva.</p>		<p>Vírus detetado em 20/47 quadrados sem tratamento e 2/26 nos desinfetados.</p> <p>9/16 recetores que contactaram com os quadrados não tratados ficaram infetados</p> <p>7/20 recetores ficaram infetados após tocarem nos quadrados desinfetados</p>	Fomitos	<p>provou-se que esta é eficaz em diminuir a taxa e infeção, mas não em 100%.</p>
<b>Meschievitz et al.</b>	Dador e recetor fechados numa sala pequena, a jogar cartas/jogos de	Entre 5-79h	5/5 infetados em 585h exposição	Todas	Este estudo não permitiu tirar conclusões sobre a via de transmissão.

Investigador	Condições	Duração	Taxas de infeção	Modo transmissão	Conclusões
	tabuleiro. Ao longo do tempo os dadores vão sendo substituídos por outros com mais sintomatologia e infeção.		0/5 infetados em 45h exposição		Permitiu apenas concluir que existe uma correlação direta entre o tempo de exposição e a taxa de infeção.
Dick et al.	(A) Dadores e 12 recetores na mesma sala a jogar cartas/jogos. Restringidos por um colar cervical de plástico largo.		Apenas 6 recetores estavam presos. 11/12 infetados 5/11 por aerossol apenas	Aerossóis e fômite  As restrições impediam que os recetores conseguissem tocar nas suas caras.	Estes resultados mostram que a transmissão por aerossóis será a mais importante e que a transmissão por contacto indireto com objetos contaminados não será uma via de transmissão.
	(B e C) Dadores e recetores na mesma sala a jogar cartas/poker. Restringidos por braçadeiras.		Apenas 6 recetores estavam presos. (B) 6/12 infetados 1/6 por aerossol apenas (C) 5/12 infetados 4/5 infeções nos presos		
			Ambos: 12/18 infetados nos livres, ou seja, qualquer via de transmissão 10/18 infetados nos presos, via de		

<b>Investigador</b>	<b>Condições</b>	<b>Duração</b>	<b>Taxas de infeção</b>	<b>Modo transmissão</b>	<b>Conclusões</b>
	(D) é uma extensão da (C) em que o dador não contacta com o recetor. Recetor contacta com todos os materiais contaminados (armários/fichas de pôquer, entre outros) da sala da outra experiência.	12 horas com movimentos exagerados das mãos na cara	0/12	Fomitos	transmissão aerossóis.

## **2.9.Resposta Imunológica**

A resposta imunológica do hospedeiro ao vírus varia consoante as defesas do mesmo. Sendo assim, a resposta imunológica pode ser mediada pelo sistema imunológico inato ou adquirido.

- **Resposta Imunológica Inata**

O epitélio respiratório é a primeira defesa do hospedeiro contra a infeção uma vez que este quando intacto tem uma função de barreira. A resposta imunológica inata é induzida após o rinovírus conseguir infetar o epitélio e inicia-se com a deteção do mesmo. Esta deteção acontece rapidamente (24h) e desencadeia a produção de Interferões do tipo I (IFN-I) que vai levar a um estado antiviral à volta das células infetadas (Royston and Tapparel, 2016).

Quando o rinovírus se liga às ICAM's vai ativar a cascata de sinalização. As células infetadas vão reconhecer o rinovírus através dos recetores de reconhecimento genérico de vírus (TLR e RLR) (Kennedy *et al.*, 2012; Royston and Tapparel, 2016).

Os TLR são recetores transmembranares que se encontram desde a membrana celular aos endossomas. O TLR-2 deteta moléculas específicas da cápside na superfície do epitélio. Os outros reconhecem o genoma viral, o TLR-3 deteta o dsRNA que se forma durante a replicação e o TLR-7 e TLR-8 o ssRNA. Esta deteção vai levar à ativação de fatores de transcrição, IRF-3, IRF-7 e NF- $\kappa$ B que posteriormente vão levar à expressão de IFN-I e citocinas inflamatórias (Mackay, 2010; Kennedy *et al.*, 2012).

O RLR é um recetor que reconhece o genoma viral e se encontra no citosol. O MDA-5 e o RIG-1 reconhecem e ligam-se ao dsRNA. Este reconhecimento vai levar à ativação da molécula de adaptação mitocondrial (MAVS) e levar à expressão de IFN-I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) que vão restringir a replicação do vírus (Kennedy *et al.*, 2012; Royston and Tapparel, 2016).

A infeção por rinovírus vai levar também a ativação de outros fatores antivirais como: interferão tipo III (IL-28/29 também conhecido como IFN- $\lambda$ ), TNF- $\alpha$ , IL-1B,IL-6, IL-12 e IL-15. A IL-12 e IL-15 que tem um papel importante na diferenciação/sobrevivência e recrutamento das células NK. Vão ser também atraídos para o local de infeção granulócitos, células dendríticas e monócitos (Kennedy *et al.*, 2012; Royston and Tapparel, 2016).

A diferenciação e recrutamento dos granulócitos está associada à expressão de G-CSF, GM-CSF e quimiocinas (IL-8, ENA-78, IP-10 e RANTES). Os neutrófilos refletem a atividade das IL-8 e IP-10 (CXCL10) e aparecem normalmente nos fluidos de lavagens nasais. Os eosinófilos apesar de piorarem os sintomas conseguem secretar RNAses potentes que auxiliam na erradicação do rinovírus (Kennedy *et al.*, 2012).

- **Resposta Imunológica adquirida humoral**

A resposta imunológica humoral é mediada por anticorpos que são produzidos pelas células B. No caso de infeção por rinovírus, vai haver a produção de anticorpos secretórios (IgA) e anticorpos específicos do serotipo (IgG). Estes anticorpos são produzidos no terceiro e no sétimo dia respetivamente e podem manter-se até um ano ou mais após a infeção. O facto destes anticorpos conseguirem ser detetados mesmo após a clearance viral confere ao hospedeiro uma proteção contra uma reinfeção (Kennedy *et al.*, 2012; Royston and Tapparel, 2016).

Existem várias formas dos anticorpos contribuírem para a clearance viral. Algumas delas são: bloquear os sítios de ligação celular, por opsonização através da apresentação do vírus às células fagocitárias e por indução da citotoxicidade celular que é mediada pelas células NK (Kennedy *et al.*, 2012).

A resposta humoral parece ser principalmente dependente dos anticorpos específicos do serotipo uma vez que, pacientes com uma falha na resposta humoral apresentam formas da doença mais severas e mais sintomáticas. Isto leva à conclusão de que são necessários anticorpos específicos do serotipo para que haja a erradicação da doença (Kennedy *et al.*, 2012).

O facto de existirem poucos anticorpos com reatividade cruzada entre serotipos, de haver mais de 100 serotipos e destes terem antigénios dominantes muito variáveis faz com que a proteção imunológica seja reduzida e com que o desenvolvimento de uma vacina seja complicado. A proteção imunológica mais forte é a que é passada através dos anticorpos da mãe para o filho, contudo estes são eliminados muito rapidamente (Mackay, 2010; Cabeda *et al.*, 2014).

- **Resposta Imunológica adquirida Celular**

A resposta imune celular é mediada pelas células T. Esta resposta é particularmente importante quando não temos uma resposta imunitária inata correta e quando não temos

anticorpos neutralizantes. Em caso de infecção por rinovírus, os títulos virais começam normalmente a baixar após 72h. Este intervalo é consistente com o tempo de ativação das células T efectoras e as de memória pré-existentes que respondem a epítopes compartilhados dos diferentes serotipos de rinovírus (Kennedy *et al.*, 2012). Assim, os linfócitos T CD4+ que respondem ao RVH são normalmente Th1-like e produzem IFN- $\gamma$  que promove a resposta antiviral e facilita o desenvolvimento da resposta imunitária humoral (Kennedy *et al.*, 2012).

As CD8+ são importantes na resposta imunitária adaptativa que conduz à erradicação do rinovírus contudo, o seu papel ainda não foi muito estudado (Kennedy *et al.*, 2012).

## **2.10. Diagnóstico Laboratorial**

- **Colheita de amostras**

O isolamento do rinovírus pode ser feito antes um dia ou até seis após o início da sintomatologia, sendo que, os títulos estarão mais elevados nos primeiros dois dias. No caso das infeções do trato respiratório superior, as amostras normalmente usadas são zaragatoas ou aspirações nasofaríngeas e amostras de lavagens nasais. Para as infeções do trato respiratório inferior usam-se aspirações da traqueia e brônquios, fluidos de lavagem bronco-alveolar ou, mais raramente, amostras de biópsias pulmonares (Mackay, 2010).

Todas as amostras devem ser acondicionadas em meio de transporte apropriado e refrigeradas. Em caso de transporte ou análise mais tardia (+2dias) as amostras devem ser acondicionadas em ultra-congelador (-70°C) ou gelo seco (Mackay, 2010).

- **Culturas celulares**

Como foi dito anteriormente, o rinovírus tem várias espécies e também vários serotipos, isso faz com que a suscetibilidade às linhas celulares varie com a estirpe. As linhas celulares mais usadas para as culturas de amostras são as derivadas de tecidos humanos ou outros primatas, linhas de células embrionárias dos pulmões e células HeLa (Blomqvist, 2004).

Estas culturas tem normalmente um pH neutro (7-7,2) e a temperatura ótima de crescimento é 33°C. Para alguns serotipos a temperatura ótima pode variar para 37°C. As culturas podem também ter um suplemento de iões Mg<sup>2+</sup> para um melhor crescimento de alguns serotipos. Uma rotação lenta e constante é também ideal para otimizar o processo, sendo que o tempo de incubação pode ir até 14 dias (Blomqvist, 2004; Mackay, 2010).

Apesar de toda esta informação sobre as culturas celulares, este continua a ser um método com pouca sensibilidade para diferenciar os rinovírus de enterovirus. Assim, para ultrapassar esta dificuldade fazem-se testes de sensibilidade aos ácidos para diferenciar uma da outra, visto que o RVH é sensível ao meio ácido (Blomqvist, 2004).

- **Deteção de antigénios**

Como existem vários serotipos de RVH, não existe um antigénio comum a todos eles, isto torna-se num obstáculo ao uso desta técnica para o diagnóstico de rotina (Blomqvist, 2004; Cabeda *et al.*, 2014).

- **Deteção de anticorpos**

Este método usa a pesquisa de anticorpos específicos para o RVH no soro e secreções nasais. Esta avaliação pode ser feita por neutralização, fixação do complemento, redução de placas e ELISA. Contudo, é uma estratégia pouco útil em diagnóstico pois os anticorpos só se conseguem detetar 1 a 3 semanas após a infeção (Mackay, 2010).

- **Técnicas de Genética Molecular**

Atualmente o RT-PCR e o qPCR são os métodos mais usados para a deteção de RVH pois apresentam grande sensibilidade e especificidade. Para além disto são métodos de largo espetro o que resolve os problemas associados as outras técnicas que não conseguem distinguir rinovírus de enterovírus devido às suas semelhanças, assim como, os problemas associados aos diversos serotipos. Tem como desvantagens os elevados custos e a necessidade de técnicos especializados (Cabeda *et al.*, 2014).

Esta técnica baseia-se na amplificação de ácidos nucleicos usando pequenos fragmentos da região 5'UTR do RVH. Uma vez que esta região é semelhante aos enterovirus torna-se necessário o uso de primers e/ou sondas que garantam a especificidade para o RVH.

Adicionalmente ao PCR é também comum a sequenciação dos produtos de RT-PCR o que permite a genotipagem viral. (Blomqvist, 2004; Mackay, 2010).

Como alternativa a estas técnicas de amplificação temos também o NASBA que amplifica diretamente o RNA e que tal como no caso do PCR apresenta elevada especificidade que lhe é conferida pelos primers e/ou sondas utilizados (Blomqvist, 2004; Mackay, 2010).

## **2.11. Tratamento**

### **• Tratamento Sintomático**

Uma vez que o rinovírus causa essencialmente infeções de resolução espontânea, o tratamento baseia-se maioritariamente no alívio dos sintomas. Assim sendo, como primeira linha de tratamento usam-se os anti-histamínicos de 1<sup>a</sup> geração, descongestionantes e antitússicos. Como alternativa aos anti-histamínicos usam-se os anticolinérgicos tópicos e o brometo de ipratrópio pois estes causam uma diminuição da rinorreia (20%) (Anzueto and Niederman, 2003; Cabeda *et al.*, 2014).

Em alguns casos, está também aconselhado o uso de Anti-inflamatórios não esteroides (AINE), esteroides tópicos e sprays de sódio cromoglicado pois estes diminuem os sintomas gripais, a rinorreia e obstrução nasal da rinite alérgica, assim como alguns dos sintomas respiratórios (tosse, dor de garganta) (Anzueto and Niederman, 2003; Winther, 2011).

Os anti-histamínicos de 2<sup>a</sup> geração e corticoides estão desaconselhados pois na maioria dos casos não demonstram efeito ou são mais prejudiciais que benéficos. Foi também estudado como alternativa o zinco, pois este inibe a protease 3C do rinovírus que é essencial na replicação. Contudo, nos testes *in vivo* não se conseguiu detetar nenhum efeito antiviral significativo ou os testes foram considerados pouco significativos devido a baixa amostragem ou baixa dosagem de zinco (Turner, 2001; Winther, 2011).

Foi também estudada a ecinácia devido à sua atividade imunoestimuladora e anti-inflamatória, o que poderia levar a que esta pudesse potencialmente afetar a sintomatologia por modulação da resposta imune. Estudos demonstraram que a ecinácia tem efeito, contudo não um efeito significativo nos sintomas (Turner, 2001).

Recentemente, descobriu-se que o itraconazol (antifúngico) apresenta também atividade antiviral *in vitro* e *in vivo* contra a infeção por RVH. Pensa-se que esta ação esteja relacionada com alterações no comportamento do colesterol celular o que iria influenciar diretamente a replicação do vírus (Casanova *et al.*, 2018).

Os antibióticos estão desaconselhados exceto em casos de coinfeção por *S.pneumoniae*, *H.influenzae* ou *M.catarrhalis* (Cabeda *et al.*, 2014).

- **Tratamento específico**

Tem como objetivo impedir a infeção ou impedir a transmissão e proliferação do vírus e pode atuar de várias formas, tais como:

- 1. Afetar a suscetibilidade celular**

O sistema imunológico do corpo humano produz interferões. Estes têm um efeito antiviral e anti-proliferativo que interfere com a suscetibilidade da célula à infeção. Assim foi desenvolvido um interferão intranasal alfa2 com atividade anti-proliferativa contra as infeções por rinovírus. Este interferão parece apresentar vantagens na diminuição das complicações de infeção por rinovírus (sinusites e otite média) quando associado a anti-inflamatórios. Contudo, apresenta limitações devido aos efeitos secundários (irritação nasal e sangramento) (Anzueto and Niederman, 2003; Patick, 2006).

- 2. Afetar a ligação do vírus**

Como foi descrito anteriormente, a maioria dos rinovírus usam a ICAM-1 para se ligarem aos recetores da célula do hospedeiro. Assim, desenvolveu-se uma ICAM-1 solúvel que teria como função ligar-se ao vírus e impedir que este se ligue à ICAM da superfície celular impedindo a replicação e proliferação da infeção. Este composto foi designado de BIRR-4 e todos os estudos demonstraram a sua eficácia a prevenir a infeção e diminuir a sintomatologia (quando tomado até 12h apos a infeção) (Staunton *et al.*, 1989; Turner, 2001; Anzueto and Niederman, 2003; Patick, 2006). Foi também criada uma versão solúvel do recetor LDL.

Outra técnica estudada foi o uso de anticorpos monoclonais como forma de profilaxia. Apesar dos sintomas e a propagação viral serem diminuídos, quando o paciente pára a toma da medicação há um aumento na severidade dos sintomas.

- 3. Impedir a descapsidação do vírus**

Este tratamento tem como objetivo o uso de compostos que se ligam à cápside do vírus, fazendo com que esta fique estável e não haja a descapsidação do RNA. Isto leva a uma paragem no ciclo de replicação pois o RNA viral não consegue atingir a célula hospedeira. Em vírus que usam as ICAM's isto significa uma modificação na conformação espacial e a prevenção da infeção.

Existem várias moléculas deste grupo a serem estudadas, algumas são:

- Pleconaril (WIN 63843) – este composto apresentou uma diminuição significativa da severidade dos sintomas e da duração da infecção. É um composto que apresentou uma grande biodisponibilidade oral, mas também bastantes interações medicamentosas. Assim, apesar de ser o primeiro composto a ser submetido a FDA, este não foi aprovado (Turner, 2001; Anzueto and Niederman, 2003).

- Disoxaril (WIN 51711) – nos ensaios in-vitro demonstrou atividade contra enterovirus contudo causava, como efeito secundário, cristalúria. O seu estudo e desenvolvimento foi então interrompido (Patick, 2006).

- WIN 54954 – foi estudado como um medicamento para a prevenção da infecção, uma vez que, não apresentou efeitos antivirais. Como profilático, causava uma diminuição da severidade da infecção. Foi também descontinuado devido aos efeitos secundários, como erupções cutâneas (Patick, 2006).

- Pirodavir – durante os ensaios não apresentou uma diferença significativa nos sintomas respiratórios nem na duração da infecção. Apresentava como vantagem uma diminuição da frequência de propagação do vírus. Os estudos demonstraram que este composto era eficaz para algumas estirpes de RVH contudo, outras eram completamente resistentes (Patick, 2006; Casanova *et al.*, 2018).

- Vapendavir (BTA798) – este composto foi desenvolvido a partir do pirodavir e apresentou ser eficaz contra algumas estirpes de RVH. Estão agora a ser feitos os ensaios clínicos de fase II (Casanova *et al.*, 2018).

#### **4. Inibidores do RNA**

Os compostos desta classe são potentes antivirais com atividade in vitro comprovada. Atuam por impedimento da replicação viral por inibição da região codificante 3' do RNA.

O “enviroxame” foi o composto mais estudado. O seu desenvolvimento clínico foi interrompido devido às intolerâncias à dose oral e à baixa atividade antiviral quando administrado em humanos. Atualmente estão a ser estudados derivados deste composto (Anzueto and Niederman, 2003).

#### **5. Inibidores da síntese da proteína viral**

Para que haja replicação e formação de um novo virião é necessária a presença da protease 3C que tem como função clivar as poliproteínas em proteínas virais. Assim

foram sintetizadas várias drogas de baixo peso molecular com o objetivo de inibir esta enzima.

Dentro desta categoria o candidato mais promissor foi o rupintrivir (AG7088) que demonstrou excelente atividade *in vitro* contra picornavírus e uma boa tolerância. Este composto está agora a ser melhorado para que haja uma otimização da entrega da substância ativa na cavidade nasal. Nos ensaios clínicos este medicamento foi capaz de diminuir a severidade da doença e reduzir a carga viral. Os novos estudos tinham como objetivo encontrar uma nova forma oral do inibidor o que levou ao composto 1 (Turner, 2001; Anzueto and Niederman, 2003; Patick, 2006; Casanova *et al.*, 2018).

## **6. Vacinas**

Desde a descoberta do rinovírus que se tenta desenvolver uma vacina contra o mesmo. Ao longo dos anos foram feitos vários estudos e foram estudados vários tipos de abordagens. Algumas das conclusões foram:

- Ter níveis altos de anticorpos neutralizantes séricos específicos para RVH está associado a proteção contra infeção (Glanville and Johnston, 2015);
- Vacinas que usam um reforço de RVH inativado com formalina levam a uma diminuição dos sintomas de constipação (Glanville and Johnston, 2015);
- Existe uma variedade antigénica imensa associada as várias estirpes de RVH. Esta variedade associada as recombinações intra e inter espécies tornam ainda mais difícil o desenvolvimento de uma vacina (Glanville and Johnston, 2015; Casanova *et al.*, 2018);
- Induzir células T de memória específicas para o RVH poderia conseguir gerar uma vacina amplamente reativa (Glanville and Johnston, 2015).

Apesar de já se ter mais informação sobre este vírus, os estudos para desenvolvimento de uma vacina já são antigos. Assim, é necessário que se realizem novos estudos na tentativa de que com as novas informações se conseguir desenvolver uma vacina que seja efetivamente eficaz. Pensa-se que o caminho para esta nova investigação poderá passar pelo uso das células T de memória, uma vacina que não tenha apenas um imunogénio mas sim vários ou mesmo uma que se foque no reconhecimento da cápside (Papi and Contoli, 2011; Glanville and Johnston, 2015).

### **3. Objetivos**

No presente trabalho pretendeu-se estudar a presença do vírus em narinas de voluntários e em amostras de ar, de modo a: caracterizar a sazonalidade do vírus e a estudar o papel da transmissão aérea para este vírus. Foram assim definidos os seguintes objetivos:

- ➔ Caracterizar a sazonalidade do rinovírus em Portugal tanto pela sua presença nas narinas de voluntários como pela sua presença no ar.
- ➔ Detetar e quantificar a presença de rinovírus em amostras semanais de ar interior e exterior e relacionar a deteção com a presença de rinovírus em indivíduos jovens saudáveis que frequentam habitualmente os locais de colheita de ar
- ➔ Estudar se os parâmetros meteorológicos e da qualidade do ar se relacionam ou influenciam de alguma forma a frequência de amostras positivas para rinovírus.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Amostras**

O projeto de investigação de que esta tese é parte integrante foi submetido à Comissão de Ética da Universidade Fernando Pessoa para aprovação. Tendo esta sido obtida (Anexo 1) procedeu-se ao recrutamento de 89 voluntários, todos eles estudantes da mesma universidade, mais especificamente da Faculdade de Ciências da Saúde. Todos os voluntários deram o seu consentimento informado (Anexo 2) após terem sido devidamente informados sobre o objetivo do estudo e qual a importância da sua participação no mesmo, bem como sobre toda a informação e amostras que teriam de ser recolhidas. A todos os voluntários foi facultada a possibilidade de abandonar o estudo a qualquer momento.

No início do estudo, os voluntários foram também submetidos a um questionário (Anexo 3) onde se recolheram dados sobre os seus estilos de vida, pré-condições de doença/alergias e aspetos sociodemográficos.

Mensalmente, durante um ano, os voluntários forneceram amostras nasais recolhidas através de zaragoas estéreis e preencheram um inquérito (Anexo 4) sobre possíveis sinais e sintomas observados no mês anterior à recolha.

Cada colheita envolveu a raspagem da mucosa nasal com uma zaragoa. As zaragoas de cada narina foram posteriormente armazenadas juntas num *ependorf*, que continha 200 µL de RNA Lateral (Invitrogen) e guardadas durante 24 horas a 4°C. Após isto, eram congeladas a -80°C até à extração de RNA viral.

Durante o projeto, foram feitas também colheitas semanais de amostras de ar interior e exterior na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa. As amostras de ar foram colhidas sempre nos mesmos pontos. As amostras de ar exterior foram recolhidas do lado de fora de uma janela do laboratório do terceiro andar, em instalações não utilizadas para qualquer outra manipulação das amostras do projeto. As amostras de ar interno foram recolhidas na cantina da universidade, um ponto de encontro comum para estudantes e funcionários, em cima de uma vitrine geralmente não manipulada pela equipa ou clientes da cantina.

Esta colheita foi feita através da filtração do ar durante uma hora a uma velocidade de 4L/min. Para esta colheita usaram-se cassetes fechadas com filtros de teflon (37mm

2.0µm) e uma bomba de ar (Leland legacy single pump). Os filtros foram posteriormente cortados em pequenos pedaços, em ambiente esteril, usando bisturis cirúrgicos estéreis de utilização única, sendo depois tratadas de modo igual às zaragoas nasais

Para além disto, diariamente, foram recolhidos os parâmetros meteorológicos a partir da estação meteorológica FP-ENAS e da infraestrutura pública de monitorização da qualidade do ar. Os dados utilizados foram os da estação mais próxima das instalações da universidade visto que era onde os voluntários passavam a maioria do seu tempo. Os parâmetros meteorológicos analisados foram velocidade do vento, temperatura, radiação, umidade e pressão do ar. Os parâmetros de qualidade do ar analisados foram ozono, óxidos de nitrogênio, monóxido de carbono, dióxido de enxofre e níveis de benzeno.

#### **4.2. Controlos**

Para obter os controlos utilizou-se uma amostra comprovadamente positiva de RHV 2 gentilmente cedida pela Dra. Carita Savolainen-Kopra, do Instituto Nacional de Saúde e Assistência Social (THL) de Helsínquia, Finlândia.

Os controlos positivos foram preparados na sala de culturas após a câmara de fluxo laminar estar com a luz Ultra Violeta (UV) ligada certa de 30 minutos. Utilizou-se controlos positivos com diluições de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  da amostra original. O controlo negativo consistiu apenas em água.

Todos os controlos positivos foram devidamente identificados e preservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.3.Extração de RNA viral a partir de zaragoas nasais**

Este protocolo decorreu sempre na sala de culturas, sendo que 30 minutos antes de se começar a desenvolver os protocolos ligava-se a luz UV da câmara de fluxo laminar.

A extração de RNA a partir das zaragoas nasais e das amostras de ar foi realizada a partir do mini kit Qiamp Viral RNA (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

Resumidamente, foi adicionado um reagente de lise ao *ependorf* que continha a amostra e após 10 minutos de incubação adicionou-se etanol absoluto (96-100%). Posteriormente a mistura obtida foi transferida para uma coluna e depois da eluição do lisado viral, esta foi lavada com duas soluções de lavagens diferentes, rejeitando-se sempre o eluído. No final, a amostra foi eluída em 60 µL de solução de eluição (AVE).

A conservação da amostra foi realizada a  $-80^{\circ}\text{C}$  até se proceder à deteção e quantificação do RNA viral.

#### **4.4. Deteção e quantificação do RNA viral**

A amplificação de RNA de RHV foi realizada por qPCR num Lightcycler 1.1 (Roche, Suíça) como anteriormente descrito (Myatt *et al.*, 2004), no entanto foi adaptado à utilização do Lightcycler 1.1 e do Kit BioRad Quantitec Probe RT-PCR (Qiagen, Alemanha).

Resumidamente, uma solução contendo a mistura principal de 1X Quantitec Probe RT-PCR,  $0,8\ \mu\text{M}$  de cada Primer (Tabela 2),  $0,2\ \mu\text{M}$  de sonda Rhino-Probe (Tabela 2) e  $0,2\ \mu\text{L}$  / reação da mistura de enzimas polimerase e transcriptase reversa fornecida pelo fabricante num volume final de  $20\ \mu\text{L}$  de reação contendo  $5\ \mu\text{L}$  de RNA. A mistura foi submetida ao seguinte perfil de temperatura: Inicialmente uma transcrição reversa a  $50^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos seguida de desnaturação da transcrição reversa e ativação da polimerase a  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. A amplificação por PCR foi então realizada por 45 ciclos consistindo num passo de desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  durante zero segundos, seguido de um passo de emparelhamento/polimerização a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto.

A semi-quantificação foi obtida em relação a uma série de diluições de uma amostra positiva.

**Tabela 3-** Primers e sondas utilizadas na deteção de RNA

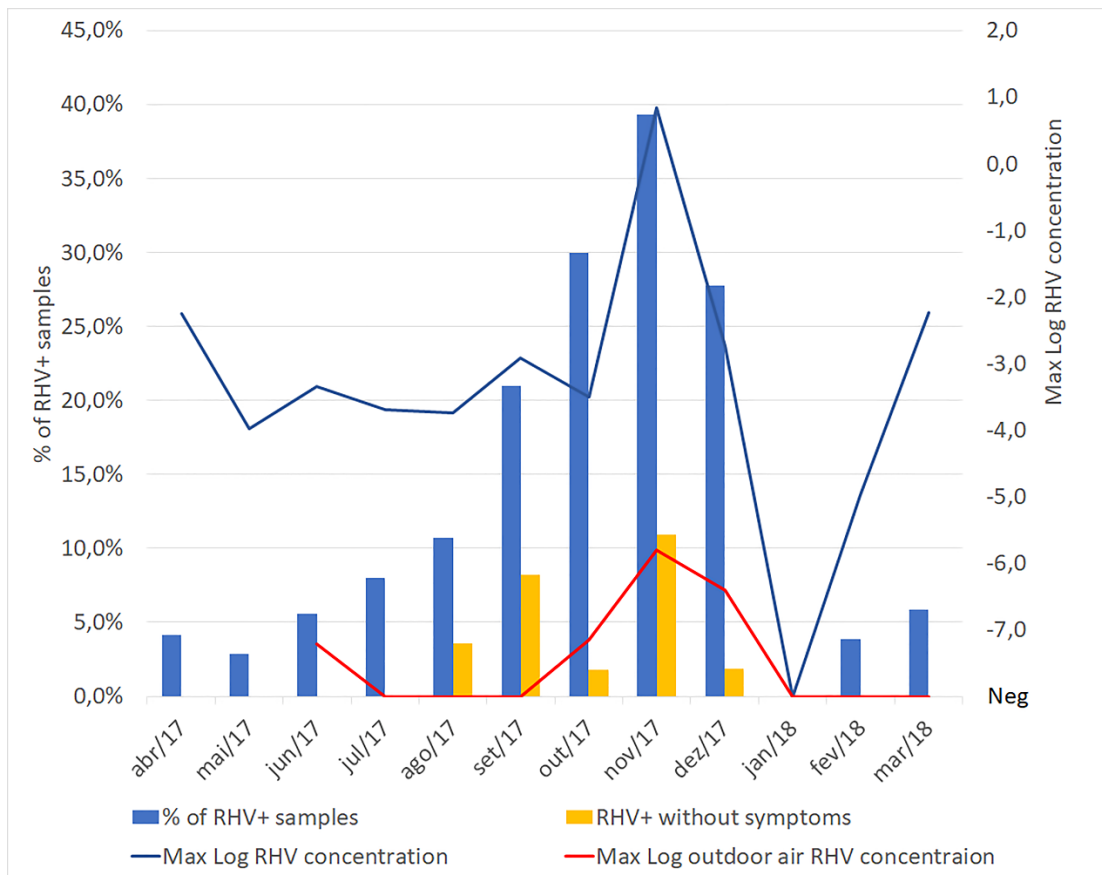
<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>Concentração final (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>RAF</b>	GAC AGT GTT CYA GCC TGC G	0,2
<b>RBF</b>	RAC HGT GTC YYA GCC TGC G	0,2
<b>LR</b>	GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA	0,2
<b>Rhino-Probe</b>	TCC TCC GGC CCC TGA ATG YGG C	0,4

## 5. Resultados

Entre abril 2017 e março de 2018 foram analisadas 640 amostras de zaragatoas nasais com o intuito de avaliar se os voluntários tinham infecção por RVH. Estas amostras foram recolhidas mensalmente e variaram entre um máximo de 73 em abril e um mínimo de 25 no mês de julho (média=  $53,7 \pm 15,8$  amostras / mês).

### 5.1. Deteção de RVH nas amostras das zaragatoas nasais

Após análise detalhada das amostras podemos ver que durante todo o período de observação ocorreram infecções por RVH, exceto em janeiro de 2018 (Figura 3). Sendo que a frequência de infecção variou entre um mínimo de 0% em janeiro e um máximo de 40% em novembro. Podemos também notar um pico de infecção no outono/inverno e outro menor na primavera (figura 3) sendo que o do inverno é antecedido por um aumento progressivo da frequência de RVH desde a primavera. Estes resultados coincidem também com os das quantificações realizadas.



**Figura 3-** Frequência de amostras de zaragatoas nasais positivas (barras azuis) versus Título de RNA de RVH nasal (linha azul) e Título de RNA de RVH nas amostras de ar exterior (linha vermelha).

É também observável que o RVH é mais frequentemente encontrado em indivíduos que reportaram sintomatologia do que naqueles sem a mesma (Figura3). Contudo, durante os meses em que começa a haver o pico de infecção (agosto a dezembro) podemos observar que se começam a encontrar mais casos de infecção por RVH sem sintomatologia. Isto poderá estar relacionado com uma deteção precoce, antes da infecção viral estar estabelecida, uma vez que o vírus se encontra no seu período de maior circulação.

### **5.2. Deteção de RHV nas amostras de ar**

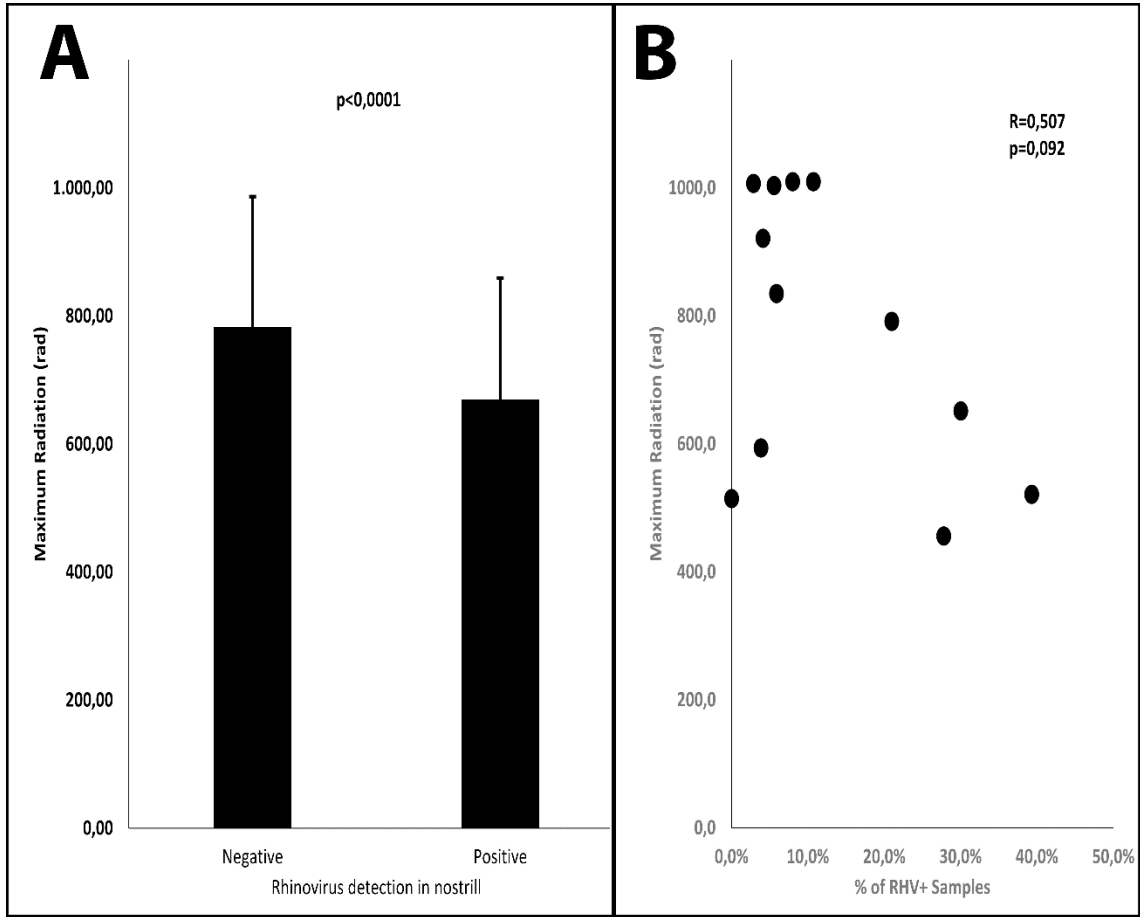
Ao contrário das expectativas, não foram encontradas amostras de ar interior positivas e foram encontradas várias amostras positivas de ar exterior. As amostras de ar exterior apresentaram também um pico em novembro, sendo que todas as amostras desse mês foram positivas.

Observou-se também que o período em que o RVH tem maior incidência nas narinas dos voluntários coincide com o período em que foram detetadas mais amostras positivas no ar exterior. Este padrão é também detetado nas quantificações (Figura 3) sendo que, quando as concentrações de RVH nas narinas são mais altas, as concentrações nas amostras de ar exterior também são, havendo assim uma correlação significativa entre estas.

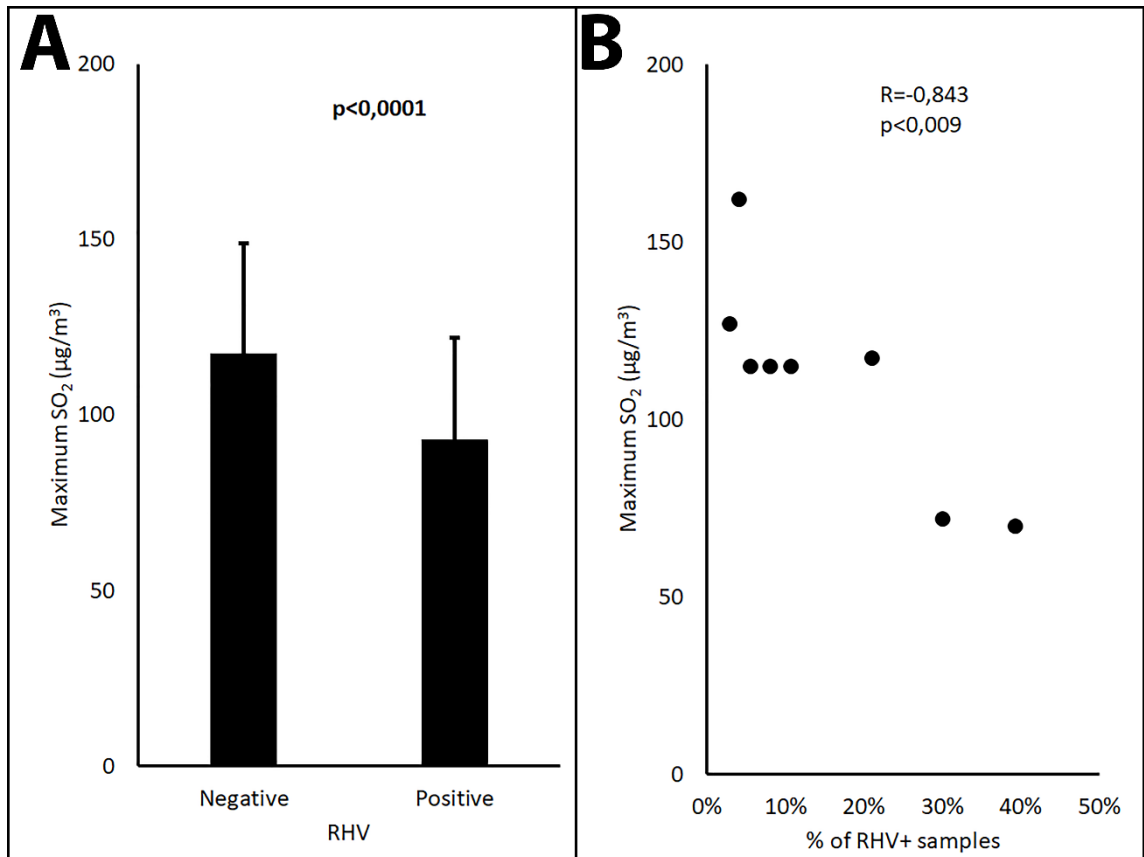
### **5.3. Parâmetros meteorológicos e qualidade do ar**

A partir dos resultados das estações observou-se que a radiação solar era significativamente mais baixa quando as amostras de RVH eram positivas (Figura 4). Observando-se assim uma correlação negativa (não estatisticamente significativa) entre a radiação e percentagem de amostras positivas.

Quanto ao estudo do dióxido de enxofre, observou-se que quanto menor este for, maior a percentagem de amostras positivas (Figura 5). Havendo assim, novamente, uma correlação negativa entre a concentração do dióxido de enxofre e as amostras positivas.

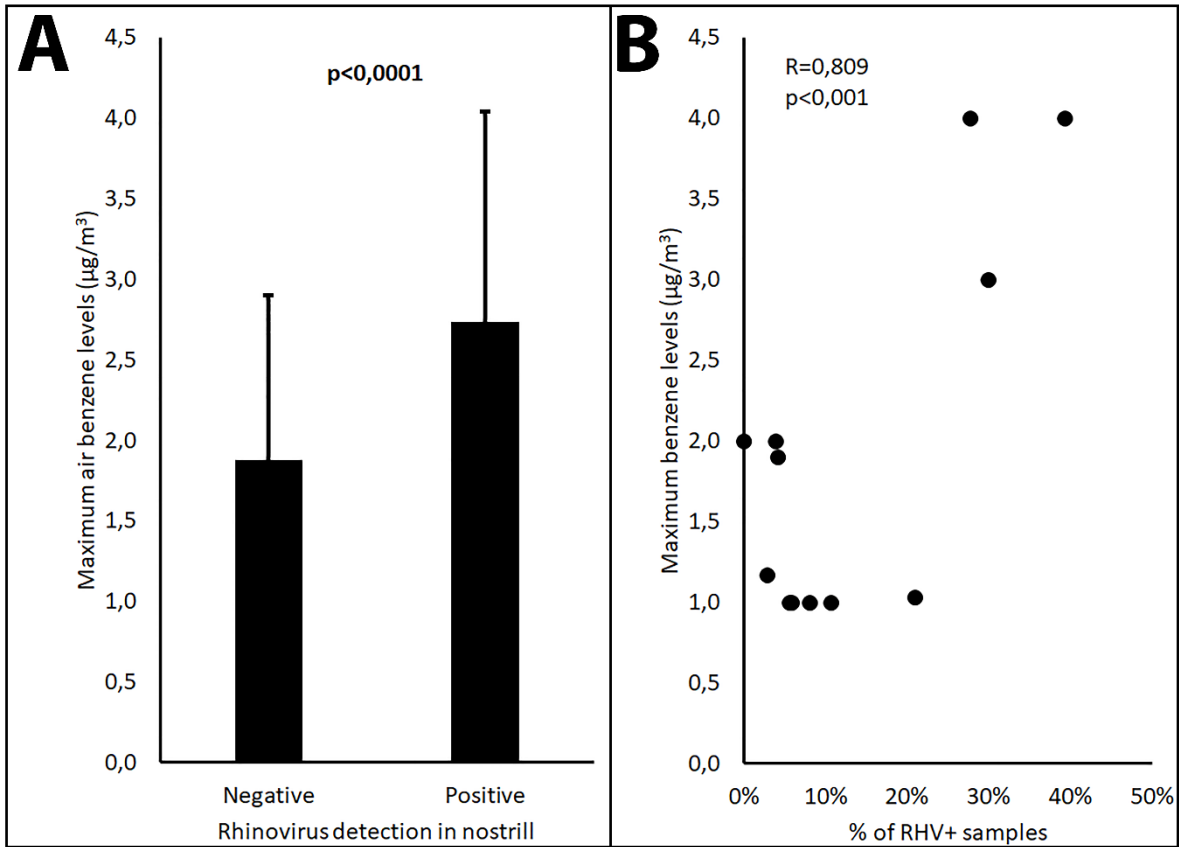


**Figura 4**-Máximo radiação mensal versus detecção de RVH nas narinas dos voluntários. **A.** Amostras negativas estão associadas com níveis mais elevados de radiação solar e amostras positivas com níveis mais baixos. **B.** Isto produz uma correlação negativa entre a radiação máxima mensal e a percentagem mensal de amostras positivas. Não atinge significância estatística (falta de significância pode estar associada a dois “outliers” com baixa percentagem de amostras positivas e baixo máximo de radiação solar, correspondendo as observações de janeiro e fevereiro 2018) (Dados obtidos através da estação meteorológica FP-ENAS e da infraestrutura pública de monitorização da qualidade do ar).



**Figura 5-** Níveis atmosféricos de dióxido de enxofre versus positividade de RVH nas amostras de zaragoas nasais. **A.** Níveis atmosféricos de SO<sub>2</sub> eram menores quando as amostras de zaragoas nasais eram positivas para RVH. **B.** isto produz uma correlação negativa entre os níveis máximos de SO<sub>2</sub> na atmosfera e a percentagem de zaragoas nasais positivas para RVH (Dados obtidos através da estação meteorológica FP-ENAS e da infraestrutura pública de monitorização da qualidade do ar).

No estudo dos níveis de benzeno observou-se uma correlação inversa, ou seja, uma correlação positiva (significativa) entre os níveis de benzeno e a percentagem de amostras positivas (Figura 6). Isto quer dizer que, valores altos de benzeno estão associados com um maior número de amostras positivas de RVH.



**Figura 6-** Níveis atmosféricos de benzeno versus positividade das amostras de zaragatoas nasais para RVH. **A.** Níveis atmosféricos de benzeno eram mais altos quando as amostras de zaragatoas nasais eram positivas para RVH. **B.** isto produz uma correlação positiva entre os níveis atmosféricos de benzeno e a percentagem de amostras de zaragatoas nasais positivas para RVH (Dados obtidos através da estação meteorológica FP-ENAS e da infraestrutura pública de monitorização da qualidade do ar).

## **6. Discussão**

Os resultados mostram que a circulação do rinovírus acontece durante todo o ano com um aumento da incidência do mesmo no outono/inverno. Observou-se também um pico menor na primavera.

Ao longo dos anos, o modo de transmissão do rinovírus tem sido alvo de vários estudos, mas como referido anteriormente, todos muito contraditórios quanto aos resultados. Contudo, este estudo veio claramente demonstrar que os aerossóis são provavelmente uma via de transmissão.

Os resultados mostram que a presença do RVH nas amostras de ar exterior e a sua concentração segue o mesmo padrão e incidência do encontrado nas amostras das zaragoas nasais. Isto apoia indiretamente a teoria da transmissão por aerossóis apesar de não provar uma relação causa-efeito. Um valioso contributo adicional seria a genotipagem do vírus em ambos os tipos de amostra. Esses resultados poderiam confirmar ou não a relação de causa efeito entre a presença dos vírus no ar e nas narinas dos voluntários. Estes resultados permitiriam ainda perceber se os indivíduos que apresentam amostras positivas consecutivas têm uma infeção persistente ou se se trata de casos de reinfeção.

Os resultados das amostras de ar interior não permitiram tirar muitas conclusões uma vez que foram todas negativas. Pensa-se que este resultado poderá ter sido causado por um eficiente ar condicionado perto do local de colheita. Num próximo estudo, dever-se-ia analisar os filtros uma vez que, se os resultados negativos forem mesmo devido a eficiência do ar condicionado esta poderia ser uma forma eficaz de purificar o ar em sítios em que a severidade e morbidade da infeção por RVH é mais preocupante.

Os parâmetros atmosféricos suportam também a teoria da transmissão por aerossóis visto que demonstraram que parâmetros como a radiação solar podem influenciar a estabilidade do vírus e a sua presença nas amostras. Estes parâmetros não demonstraram só que podem afetar a estabilidade do vírus mas também que podem afetar a resposta imunitária dos indivíduos ao mesmo, como é o caso do benzeno que quanto mais altos os valores, mais são as amostras positivas para RVH.

### **III. Conclusão**

Quanto à sazonalidade do RVH conclui-se que existe um pico no inverno e outro na primavera. Este segundo pico, apesar de menor poderá estar associado a uma possível alteração na sazonalidade do vírus. Esta alteração na sazonalidade deverá ser averiguada para descobrir quais as causas destas mudanças. Uma possível justificação poderá ser o aquecimento global.

A relação entre a presença do vírus no ar exterior e nas narinas dos voluntários sugere que a transmissão é feita por aerossóis uma vez que, os resultados das amostras de ar exterior seguem o mesmo padrão de incidência que os das amostras nasais. Os resultados dos parâmetros meteorológicos suportam também esta hipótese visto que diferentes poluentes modulam a resposta do vírus de forma diferente.

Os parâmetros meteorológicos e de qualidade do ar não só influenciam a circulação do vírus e a sua estabilidade mas podem também afetar a resposta imune dos indivíduos.

Visto que as amostras de ar interior foram todas negativas a única dedução possível é que o resultado poderá ter sido influenciado por um eficiente ar condicionado e que talvez esta seja uma forma eficiente de prevenção contra o vírus.

Em conclusão, apesar de com este estudo se terem respondido a algumas questões importantes, no futuro serão necessários mais estudo para resolver novas problemáticas. Alguns destes estudos poderão passar por ensaios controlados da transmissão do vírus e também ensaios em que os poluentes ambientais são controlados para que se possam tirar conclusões mais fidedignas e estabelecer-se correlações de causa-efeito.

#### **IV. Bibliografia**

Abraham, G. and Colonno, R. J. (1984) 'Many rhinovirus serotypes share the same cellular receptor.', *Journal of virology*, 51(2), pp. 340–345. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6086949><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC254443>.

Anzueto, A. and Niederman, M. S. (2003) 'Diagnosis and treatment of rhinovirus respiratory infections', *Chest*. The American College of Chest Physicians, 123(5), pp. 1664–1672. doi: 10.1378/chest.123.5.1664.

Blaas, D. and Fuchs, R. (2016) 'Mechanism of human rhinovirus infections', *Molecular and Cellular Pediatrics*. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3(1), p. 21. doi: 10.1186/s40348-016-0049-3.

Blomqvist, S. (2004) *Epidemiology of Human Rhinoviruses*, *Environmental Sciences*.

Brownlee, J. W. and Turner, R. B. (2008) 'New developments in the epidemiology and clinical spectrum of rhinovirus infections', *Current Opinion in Pediatrics*, 20(1), pp. 67–71. doi: 10.1097/MOP.0b013e3282f41cb6.

Cabeda, J. M. *et al.* (2014) 'Picornavirus', *Microbiologia Médica - vol.2*, pp. 116–128.

Casanova, V. *et al.* (2018) 'Antiviral therapeutic approaches for human rhinovirus infections', *Future Virology*, 13(7), pp. 505–518.

Cifuentes, J. O. and Moratorio, G. (2019) 'Evolutionary and Structural Overview of Human Picornavirus Capsid Antibody Evasion', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(August), pp. 1–11. doi: 10.3389/fcimb.2019.00283.

Dick, E. C. *et al.* (1987) 'Aerosol Transmission of Rhinovirus Colds', *The Journal of Infectious Diseases*, 156(3), pp. 442–448.

Dietzgen, R. G. *et al.* (2017) 'ICTV virus taxonomy profile: Nyamiviridae', *Journal of General Virology*, 98(12), pp. 2914–2915. doi: 10.1099/jgv.0.000973.

Ferreira, W. and Sousa, J. C. (2002) 'Picornavirus', in *Microbiologia - vol.3*, pp. 161–183.

Fuchs, R. and Blaas, D. (2010) 'Uncoating of human rhinoviruses', *Reviews in medical virology*, 20, pp. 281–297. doi: 10.1002/rmv.

- Gern, J. E. (2002) 'Rhinovirus Respiratory Infections and Asthma', *American Journal of Medicine*, 112(6), pp. 19–27.
- Glanville, N. and Johnston, S. L. (2015) 'ScienceDirect Challenges in developing a cross-serotype rhinovirus vaccine', *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V., 11, pp. 83–88. doi: 10.1016/j.coviro.2015.03.004.
- Greve, J. M. *et al.* (1989) 'The major human rhinovirus receptor is ICAM-1', *Cell*, 56(5), pp. 839–847. doi: 10.1016/0092-8674(89)90688-0.
- Group, P. S. (2019) 'Picornavirus Genera'. Disponível em: <http://www.picornastudygroup.com/taxa/species/species.htm> [Consultado em: 10 de Fevereiro 2019].
- Gwaltney, J. M.; Hendley, J. (1988) 'Mechanisms of transmission of rhinovirus infections', *Epidemiologic Reviews*, 10, pp. 242–258.
- Gwaltney, J. M. (1997) 'Rhinoviruses', in *Viral Infections of Humans*, pp. 815–837.
- Gwaltney, J. M. (2002) 'Clinical significance and pathogenesis of viral respiratory infections', *American Journal of Medicine*, 112(6 SUPPL. 1), pp. 13–18.
- Gwaltney, J. M. and Hendley, J. O. (1978) 'Rhinovirus transmission: one if by air, two if by hand', *American Clinical and Climatological Association*, pp. 194–200.
- Gwaltney, J. M. and Hendley, J. O. (1982) 'Transmission of experimental rhinovirus infection by contaminated surfaces', *American Journal of Epidemiology*, 116(5), pp. 828–833.
- Gwaltney, J. M., Moskalski, P. B. and Hendley, J. O. (1978) 'Hand-to-Hand Transmission of Rhinovirus Colds', *Annals of Internal Medicine*, (88), pp. 463–467.
- Hendley, J. O. (1973) 'Transmission of rhinovirus colds by self-inoculation', *the new england journal of medicine*, 288(26).
- Hendley, J. O. (1999) 'Clinical virology of rhinoviruses.', *Advances in virus research*, 54, pp. 453–466.
- Hershenson, M. B. (2013) 'Rhinovirus-Induced Exacerbations of Asthma and COPD', *Scientifica*, 2013, pp. 1–12. doi: 10.1155/2013/405876.
- Huillier, A. G. L. *et al.* (2015) 'Survival of rhinoviruses on human fingers', *Clinical*

*Microbiology and Infection*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.cmi.2014.12.002.

Kennedy, J. L. *et al.* (2012) 'Pathogenesis of rhinovirus infection', *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V., 2(3), pp. 287–293. doi: 10.1016/j.coviro.2012.03.008.

Larwood, T. R. (2000) 'Pneumonia Caused by Rhinovirus', *Clinical Infectious Diseases*, 30, pp. 611–613. doi: 10.1086/313724.

Lau, S. K. P. *et al.* (2010) 'Human rhinovirus C : a newly discovered human rhinovirus species Human rhinovirus C : a newly discovered human rhinovirus species', *Emerging Health Threats Journal*, 3(2). doi: 10.3134/ehthj.10.002.

Mackay, I. M. (2010) 'Human rhinoviruses', *PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective*, 26(1), pp. 299–301. doi: 10.1007/978-90-481-9039-3\_47.

Mackay, I. M. and Arden, K. E. (2014) 'Rhinoviruses', in *Viral Infections of Humans*, pp. 675–711. doi: 10.1007/978-1-4899-7448-8.

Marcone, D. N. *et al.* (2017) 'Nosocomial Transmission and Genetic Diversity of Rhinovirus in a Neonatal Intensive Care Unit', *The Journal of Pediatrics*. Elsevier Inc., pp. 1–5. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.09.013.

McErlean, P. *et al.* (2008) 'Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, Human rhinovirus C (HRV C)', *PLoS ONE*, 3(4). doi: 10.1371/journal.pone.0001847.

Miller, E. K. (2010) 'New Human Rhinovirus Species and Their Significance in Asthma Exacerbation and Airway Remodeling', *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 30(4), pp. 541–552. doi: 10.1016/j.iac.2010.08.007.

Monto, A. S. (2002) 'Epidemiology of viral respiratory infections', *Am J Med*, 112 Suppl, p. 4s–12s. doi: 10.1016/S0002-9343(01)01058-0.

Monto, A. S. (2002) 'The seasonality of rhinovirus infections and its implications for clinical recognition', *Clinical Therapeutics*, 24(12), pp. 1987–1997. doi: 10.1016/S0149-2918(02)80093-5.

Ms, S. B., Palmenberg, A. C. and Gern, J. E. (2019) 'Rhinoviruses and Their Receptors', *CHEST Journal*. Elsevier Inc, 18(February), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.chest.2018.12.012.

- Myatt, T. A. *et al.* (2004) 'Detection of Airborne Rhinovirus and Its Relation to Outdoor Air Supply in Office Environments', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 169(11), pp. 1187–1190. doi: 10.1164/rccm.200306-760OC.
- Oliveira, M. A. *et al.* (1993) 'The structure of human rhinovirus 16', *Structure*, 1, pp. 51–68. doi: 10.1016/0969-2126(93)90008-5.
- Palmenberg, A. C. (2017) 'Rhinovirus C, Asthma, and Cell Surface Expression of Virus Receptor CDHR3', *Journal of Virology*, 91(7). doi: 10.1128/jvi.00072-17.
- Papi, A. and Contoli, M. (2011) 'Rhinovirus vaccination: the case against', *European Respiratory Journal*, 37(1), pp. 5–7. doi: 10.1183/09031936.00145710.
- Patick, A. K. (2006) 'Rhinovirus chemotherapy', *Antiviral Research*, 71(2–3 SPEC. ISS.), pp. 391–396. doi: 10.1016/j.antiviral.2006.03.011.
- Peltola, V., Waris, M., Österback, R., Susi, P., Hyypiä, T., *et al.* (2008) 'Clinical effects of rhinovirus infections', *Journal of Clinical Virology*, 43(4), pp. 411–414. doi: 10.1016/j.jcv.2008.08.014.
- Peltola, V., Waris, M., Österback, R., Susi, P., Ruuskanen, O., *et al.* (2008) 'Rhinovirus Transmission within Families with Children: Incidence of Symptomatic and Asymptomatic Infections', *The Journal of Infectious Diseases*, 197(3), pp. 382–389. doi: 10.1086/525542.
- Royston, L. and Tapparel, C. (2016) 'Rhinoviruses and respiratory enteroviruses: Not as simple as ABC', *Viruses*, 8(1). doi: 10.3390/v8010016.
- Staunton, D. E. *et al.* (1989) 'A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses', *Cell*, 56(5), pp. 849–853. doi: 10.1016/0092-8674(89)90689-2.
- Stone, C. A. and Miller, E. K. (2016) 'Understanding the association of human rhinovirus with asthma', *Clinical and Vaccine Immunology*, 23(1), pp. 6–10. doi: 10.1128/CVI.00414-15.
- Stott, E. and Killington, R. (1972) 'Rhinoviruses', pp. 503–524.
- Turner, R. B. (2001) 'The treatment of rhinovirus infections : progress and potential', *Antiviral Research*, 49, pp. 1–14.

Tuthill, T. *et al.* (2010) 'Picornaviruses', *Curr Top Microbiol Immunol.*, (343), pp. 43–89. doi: 10.1007/82.

Tyrrell, D. and Chanock, R. (1963) 'Rhinoviruses: A Description', *Science*, 141(15).

Waman, V. P. *et al.* (2014) 'Population structure and evolution of rhinoviruses', *PLoS ONE*, 9(2). doi: 10.1371/journal.pone.0088981.

Winther, B. (2011) 'Rhinovirus infections in the upper airway', *Proceedings of the American Thoracic Society*, 8(1), pp. 79–89. doi: 10.1513/pats.201006-039RN.

Zell, R. (2018) 'Picornaviridae—the ever-growing virus family', *Archives of Virology*. Springer Vienna, 163(2), pp. 299–317. doi: 10.1007/s00705-017-3614-8.

**V. Anexos**

## 1. Autorização da comissão de ética



Universidade Fernando Pessoa  
www.ufp.pt

Exmo. Senhor  
Prof. Doutor Luis Martins  
Director da FCS

Porto, 06 de Março de 2017

Exmo. Senhor Prof. Doutor,

A Comissão de Ética, depois de apreciado o projeto de investigação dos Professores José Manuel Cabeda, Maria Gil Ribeiro, Conceição Manso, Esmeralda Barreira e Nelson Barros, intitulado "Rhinair: Epidemiologia e estudo de fatores de risco da infeção viral respiratória associada ao rinovirus", considera nada haver a opor ao mesmo, desde que os autores esclareçam quem irá financiar os gastos com o mesmo.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da  
Comissão de Ética da UFP

  
Teresa Martinho Toldy

  
20.3.2017



Fundação Ensino e Cultura "Fernando Pessoa"

www.ufp.pt  
REITORIA - | Faculdade de Ciências Humanas e Sociais | | Faculdade de Ciências e Tecnologia (Plaza 1 de Abril, 349 - 4203-004 Porto-Portugal - T +351 22 507 1300 - F +351 22 508 6269 - geral@ufp.pt  
| Faculdade de Ciências da Saúde | | Escola Superior de Saúde (R. Costa Da Maia, 296 - 4200-150 Porto - Portugal - T +351 22 507 4630 - F +351 22 507 4631 - R. Darden Maia, 334 - 4200-233 Porto - Portugal  
T +351 22 509 6377 - geral.saude@ufp.pt) UNIDADE de Ponte de Lima - Rua da Garrett - R. Conde de Bragança - 4990-072 Ponte de Lima- Portugal - T +351 258 741 626 - F +351 258 741 412 - geral@ufp.pt

## **2. Declaração de consentimento informado**

### **DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

#### **Para participação voluntária no projeto “RhinAir: Epidemiologia e estudo de fatores de risco da infeção viral respiratória associada ao Rinovírus”**

O Projeto acima designado, visa estudar mensalmente e pontualmente amostras nasais (colhida com uma cotonete introduzida no nariz). Nestas amostras nasais será pesquisada a presença de vírus causadores de infeções respiratórias ligeiras (constipações). Durante o estudo serão também recolhidos dados relevantes da poluição do ar a partir da rede nacional da qualidade do ar. Para tal será solicitado aos voluntários informação sobre os locais de residência. Cada voluntário doará ainda uma amostra de sangue no início e outra no fim do estudo, para estudo de variações genéticas.

**Eu, abaixo-assinado, (nome completo do participante no estudo)**

\_\_\_\_\_, compreendi a explicação que me foi fornecida acerca da participação na investigação que se tenciona realizar, bem como do estudo em que serei incluído. Foi-me dada oportunidade de fazer as perguntas que julguei necessárias, e de todas obtive resposta satisfatória.

Tomei conhecimento de que a informação ou explicação que me foi prestada versou os objetivos e os métodos. Além disso, foi-me afirmado que tenho o direito de recusar a todo o tempo a minha participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo pessoal. Entendo também, e aceito, que os responsáveis pelo projeto poderão em qualquer momento desistir da minha participação no projeto, por razões de ordem científica, logística, financeira ou outra, sem que tal constitua razão para me sentir lesado.

Foi-me ainda assegurado que os registos em suporte papel e/ou digital (sonoro e de imagem) serão confidenciais e utilizados única e exclusivamente para o estudo em causa, sendo guardados em local seguro durante a pesquisa e destruídos após a sua conclusão.

Por isso, consinto em participar no estudo em causa.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2017

**Assinatura do participante no projeto:** \_\_\_\_\_

**O Investigador responsável:**

**Nome:** José Manuel Baptista Cabeda

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

### 3. Questionário recenseamento voluntários



## Questionário/Inquérito Recenseamento de Voluntários

O presente questionário destina-se à inscrição de voluntários no âmbito do Projeto de Investigação "RhinAir: Epidemiologia e estudo de fatores de risco da infeção viral respiratória associada ao Rinovírus".

Desde já agradecemos o tempo que dedicou a este estudo.

#### Dados de Identificação Anónima:

1. Código do Voluntário \_\_\_\_\_ Código da Amostra: \_\_\_\_\_
2. Data da colheita: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Hora da colheita: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
3. Telemóvel para contacto: \_\_\_\_\_

#### Caracterização Geral:

4. Ano de Nascimento: \_\_\_\_\_
5. Profissão: \_\_\_\_\_
6. Sexo: Masculino .. Feminino....
7. Tem antecedentes não Portugueses? Sim .... Não ....  
Se sim de que nacionalidade? \_\_\_\_\_
7. Tem manifestações de alergia/hipersensibilidade:  
Asma brônquica Sim ..... Não ....  
Alergia medicamentosa Sim ..... Não ....  
Alergia de contacto/pele Sim ..... Não ....  
Alergia Alimentar Sim ..... Não ....  
Alergia picada Insetos Sim ..... Não ....  
Outra  Qual? \_\_\_\_\_
8. É fumador?: Sim .... Não ....  
Se sim, quantos cigarros fuma habitualmente por dia? \_\_\_\_\_
9. Se é portador de doenças crónicas indique-as: \_\_\_\_\_
10. Se Toma regularmente bebidas alcoólicas, chá ou suplementos alimentares indique quais e que quantidades: \_\_\_\_\_
11. Se Pratica habitualmente exercício físico indique qual e com que frequência: \_\_\_\_\_
12. Identifique no Computador os locais onde viveu nos últimos 10 anos, indicando quantos anos aí residiu e qual a percentagem diária aproximada de tempo que passava em cada local:

GPS: \_\_\_\_\_ Tempo Total (anos): \_\_\_\_\_ % tempo diário: \_\_\_\_\_

GPS: \_\_\_\_\_ Tempo Total (anos): \_\_\_\_\_ % tempo diário: \_\_\_\_\_

GPS: \_\_\_\_\_ Tempo Total (anos): \_\_\_\_\_ % tempo diário: \_\_\_\_\_

GPS: \_\_\_\_\_ Tempo Total (anos): \_\_\_\_\_ % tempo diário: \_\_\_\_\_

#### 4. Inquérito mensal para colheita de amostras



## Questionário/Inquérito

O presente questionário destina-se a recolha dos dados sintomatológicos no âmbito do Projeto de Investigação "RhinAir: Epidemiologia e estudo de fatores de risco da infeção viral respiratória associada ao Rinovírus".

Antecipadamente agradecemos o tempo que dedicou a este estudo.

### Identificação da Amostra:

4. Código do Voluntário \_\_\_\_\_ Código da Amostra: \_\_\_\_\_
5. Data da colheita: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Hora da colheita: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Sintomas nos últimos 30 dias:

- .7. Durante os últimos 30 dias alguma vez teve:
- |                              |                                 |                                    |
|------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Espirros em série/frequentes | Sim .. <input type="checkbox"/> | Não ..... <input type="checkbox"/> |
| Nariz a pingar               | Sim... <input type="checkbox"/> | Não .... <input type="checkbox"/>  |
| Nariz entupido               | Sim .. <input type="checkbox"/> | Não .... <input type="checkbox"/>  |
| Dores de cabeça              | Sim .. <input type="checkbox"/> | Não .... <input type="checkbox"/>  |
| Lacrimação e prurido         | Sim... <input type="checkbox"/> | Não .... <input type="checkbox"/>  |
| Perda do olfato e sabor      | Sim .. <input type="checkbox"/> | Não .... <input type="checkbox"/>  |
| Comichão intensa no nariz    | Sim .. <input type="checkbox"/> | Não .... <input type="checkbox"/>  |
8. Durante os últimos 30 dias, os problemas de nariz foram acompanhados de estados lacrimais ou de "comichão" nos olhos?      Sim       Não
19. Durante os últimos 30 dias que fatores pensa que lhe provocaram os problemas nasais?
- |                                 |                          |
|---------------------------------|--------------------------|
| Pó da casa                      | <input type="checkbox"/> |
| Pólen de árvores e/ou plantas   | <input type="checkbox"/> |
| Animais Domésticos              | <input type="checkbox"/> |
| Produtos Irritativos (Químicos) | <input type="checkbox"/> |
| Constipação                     | <input type="checkbox"/> |
| Fatores não identificados       | <input type="checkbox"/> |

5. Poster Wurzburg – Alemanha

P 348

**Year-long detection of Rhinovirus on the nostrils of university students in Porto, Portugal**

Ana Filipa Rodrigues, Ana Mafalda Santos, Ana Maria Ferreira, José Manuel Cabeda

FP-EMAS Research Centre, CEBIMED Unit, Porto, Portugal  
Universidade Fernando Pessoa, Health Sciences Faculty, Porto, Portugal



**SUMMARY**

**INTRODUCTION**

- Rhinovirus is a common picornavirus with over 150 serotypes and 3 species<sup>1</sup>
- Responsible for 50% of common cold cases<sup>2</sup>
- Tropism to the upper respiratory tract, but can also infect the lower respiratory tract<sup>3,7</sup>
- Can be life threatening in people with chronic respiratory afflictions and elderly<sup>8</sup>
- Transmission routes are controversial but may involve:
  - Human-to-human
  - Indirect transmission (surfaces<sup>9,10</sup> and/or aerosols<sup>11</sup>)

**STUDY**

- Here we tested the year-long presence of rhinovirus in:
  - Monthly on nostrils of 89 healthy university students (893 nasal swab samples)
  - weekly on indoors and outdoors air at the university campus
- RNA was detected and semi-quantified by qPCR on a Lightcycler 1.1.
- Sampling varied (max=73 in April; min=25 in July (53.7±15.8 samples per month).

**RESULTS**

- Nasal samples showed an increasing frequency of rhinovirus from spring to Autumn
  - Minimum of 3% positive samples in May
  - Maximum of 60% positive samples in November
- No indoor air samples were found positive
- Several positive outdoor samples
  - Peak in November with all samples positive.
  - Similarly quantification showed highest values showing in November

**CONCLUSION:** Results show a clear relationship between the presence of viral RNA in the nostrils of volunteers and the presence of the viral RNA in outdoor air, supporting the possibility of airborne viral transmission. The absence of viral material in indoor air samples may indicate a possible efficiency of the air conditioning filtering in the University canteen where samples were collected.

**RESULTS**

**Rhinovirus presence in the Nostrils of volunteers**

- 893 Nasal swab samples collected from April to December 2017
- Samples/month varied (max=73 in April; min=25 July; 53.7±15.8 samples/month)
- Nasal samples:
  - Increasing frequency of rhinovirus from spring to Autumn (Fig. 1)
  - Minimum of 3% positive samples in May
  - Maximum of 60% positive samples in November
  - Similar trend for relative concentration of Rhinovirus in positive nasal swabs

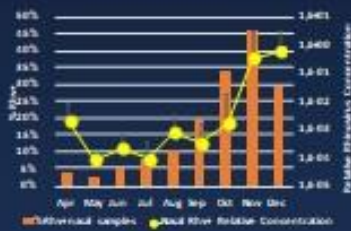


Fig. 1 – Frequency of Positive Nasal swab samples versus Rhinovirus RNA tier in positive nasal swab samples.

**Rhinovirus presence in Interior and Exterior Air Samples**

- All indoor air samples tested negative for rhinovirus.
- Several outdoor air samples showed Rhinovirus RNA
  - one in June, one in October, all in November and one in December
  - viral RNA relative quantification with highest values showing up at the end of the year (Fig. 2)
  - Nasal Rhinovirus relative concentration was also found to strongly correlate ( $R=0.985$ ;  $p<0.0001$ ) to the Outdoor air Rhinovirus relative concentration (Fig. 3).



Fig. 2 – Percentage of positive Nasal Samples and the relative concentration of Rhinovirus in Outdoor air samples

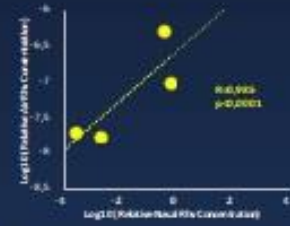


Fig. 3 – Correlation between Rhinovirus Relative concentration in the nostrils of volunteers and outdoor air samples

**MATERIALS AND METHODS**

**Recruitment of volunteers:** A total of 89 volunteers were recruited among students of Fernando Pessoa University. Students were required to read and sign an informed consent, and to fill in an admission inquiry. All procedures were approved by the University Ethics Committee. Database was registered to the National Personal Data Protection Organization.

**Nasal Sample collection:** Voluntary came in monthly for nasal swab collection. Samples were collected from each nostril using sterile cotton swabs. Swabs from left and right nostrils were stored together in 200 µL of RNAlater (Invitrogen) solution for 24h at 4°C and then transferred to a -80°C freezer until RNA extraction procedures.

**Air Sample Collection:** Exterior and interior air samples were collected essentially as previously described<sup>12</sup>. Briefly, Air was filtered for 1 hour at a 0.1/min rate using 37 mm 2.0um Tetra Filter (SKC) in closed cassettes with the help of an air pump (Leland legacy single pump). Filters were then cut in small pieces under sterile conditions using fresh sterile disposable scalpel and stored during 24 h at -80°C with 200 µL of RNAlater(Invitrogen). Filters were then stored at -80°C until viral RNA extraction.

**Viral RNA extraction:** Viral RNA extraction was performed using QiAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer instructions. Final elution volume was 50 µL. RNA samples were stored at -80°C.

**Rhinovirus RNA detection and quantification:** Rhinovirus RNA amplification was performed by qPCR on a Lightcycler 1.1 (Roche, Germany) as previously described<sup>13</sup>. Semi-quantification was obtained relative to a dilution series of a positive sample.

**CONCLUSION**

Taken together, the present results show a close relationship between the presence of viral RNA in the nostrils of volunteers and the presence of the viral RNA in outdoor air, supporting the possibility of airborne viral transmission.

**DISCUSSION**

Rhinovirus transmission by air has been controversial, with contradictory findings over the years. Nevertheless, although reported to be less frequent, aerosol transmission is surely an active transmission route<sup>14</sup>. The present results indirectly support the view as the outdoor air rhinovirus was not only found to be detectable (at a much lower concentration than in the nostrils, as expected), but to closely correlate to nasal rhinovirus presence and concentration. The absence of rhinovirus in all indoor samples tested may on one hand indicate that rhinovirus particles detected in outdoor air may be related to the cause rather than be a result of nasal rhinovirus presence. These results may also be explained by a more efficient filtering of rhinovirus by the indoor air conditioning. It would therefore be interesting to be able to test the presence of rhinovirus in the air conditioning filters in future sample collection campaigns.

**ACKNOWLEDGMENTS**

This work was funded by Portuguese Science Foundation (FCT) grants UIDB/04546/2016 and UIDP/04546/2013.

**BIBLIOGRAPHY**

- Palumbo, J. C. et al. *Science* 234, 99-102 (1989).
- Blaze, D. A. *Fields, B. Med. Clin. Pediatr.* 2, 31-34 (1989).
- Cabada, M. *Revista de Microbiologia, Imunologia, and Infect. Assoc. M.*, 14(1) 10-14 (2014).
- Wright, T. F., Lamont, R. W., Hensley, G. & Schultz, T. J. *Cell Microbiol.* 10, 76-82 (2008).
- McIntyre, P. et al. *PLoS One* 5, 1-5 (2010).
- Wambsch, S. *Environmental Sciences* (2016).
- Carroll, J. P. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* (2003).
- Carroll, J. P., A. Davis, P. C. For. *J. Experimental. Med.* 179, 81 (1995).
- Wright, T. F., Johnson, S. J., Buchholz, S. & Schultz, T. J. *J. Virol.* 84, 1192-1196 (2010).
- Wright, T. F. et al. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 1187-1190 (2012).
- Christopherson, J. *Revista de Microbiologia, Imunologia Infect. M.* 14, 10-14 (2014).

## 6. Poster V encontro da Sociedade Portuguesa de Virologia



### Rhinovirus Infection is influenced by outdoor-air virus presence and polymorphisms in TOLLIP and IL6 genes

Rodrigues A.E.<sup>1,2</sup>, Santos A.M.<sup>1,2</sup>, Marino R.<sup>1,2,3</sup>, Ferreira A.M.<sup>1,2</sup>, Barreira M.E.<sup>1,2</sup>, Cabedo JM.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>IPATRI, Instituto de Patologia e Imunologia, Porto, Portugal; <sup>2</sup>FEUP, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Portugal; <sup>3</sup>FEUP, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Portugal; <sup>4</sup>FEUP, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>5</sup>Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa, Portugal

<sup>6</sup>Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italy

#### SUMMARY

##### INTRODUCTION:

- Rhinovirus (RVV) is a common picornavirus with over 150 serotypes and 3 species<sup>1</sup>
- Responsible for 50% of common cold cases<sup>2</sup>
- Tropism to the upper respiratory tract, but can also infect the lower respiratory tract<sup>3-4</sup>
- Can be life threatening in people with chronic respiratory afflictions and elderly<sup>5</sup>
- Transmission routes are controversial but may involve:
  - human-to-human
  - indirect transmission (surface<sup>6,7</sup> and/or aerosol<sup>8,9</sup>)

AIM: Study the seasonality of rhinovirus in Portugal and the role of airborne virus and immune-system-related genetic variations.

##### STUDY DESIGN:

- Tested the year-long presence of rhinovirus in:
  - Monthly on nostrils of 80 healthy university students (5/10 nasal swab samples)
  - weekly on indoor and outdoor air at the university campus
  - RNA was detected and semi-quantified by qPCR on a Lightcycler 1.1.
- All individuals were genotyped for immune-system related genetic variations (TOLLIP rs740389, IL6 rs1800795, IL1B rs10944, TNFA rs1800629).

##### RESULTS:

- Nasal samples showed an increasing frequency of rhinovirus from Spring to Autumn
- No indoor air samples were found positive
- Several positive outdoor samples
  - Peak in November with all samples positive.
  - Similarly quantification showed highest values in November
- Both IL6 and TOLLIP gene polymorphisms, but not IL1B nor TNFA polymorphisms were found to influence Rhinovirus detection on the volunteers' nostrils
  - TOLLIP G+ individuals more frequently were found to be year-long RVV free
  - IL6 C+ individuals were found to show higher titres of RVV in positive nostril samples

##### CONCLUSION:

- Single peak of rhinovirus in late autumn, early winter, possibly due to a normally hot year. This may indicate the possibility of changing rhinovirus epidemiology.
- Close relationship between Rhinovirus in nostrils of volunteers and in outdoor air supporting the possibility of airborne viral transmission.
- Association between TOLLIP and IL6 alleles and Rhinovirus infection in healthy subjects
  - TOLLIP allele influences TLR2 mediated signaling (needed for capsid recognition)
  - IL6 mediated responses are important for viral clearing after infection

#### Results

##### Rhinovirus detection in nostrils and air

- Single peak of rhinovirus in nostrils (Fig. 1)
- Similar findings in terms of rhinovirus concentration in nostrils and in outdoor air (Fig. 1)
- Close correlation between Rhinovirus concentrations in nostrils and in outdoor air (Fig. 2)

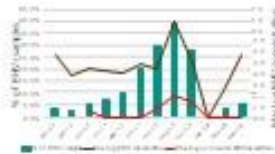


Fig. 1 - Number of positive nasal swab samples and outdoor air samples for Rhinovirus RNA from April to March.

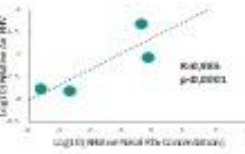


Fig. 2 - Correlation between Rhinovirus RNA concentration in the nostrils of volunteers and outdoor air samples.

##### Polymorphisms influence on year-long Rhinovirus detection

- TOLLIP G+ individuals showed more frequently a year-long absence of rhinovirus (Fig. 3)
- Among TOLLIP G- individuals, the IL6 C allele is associated with higher RVV concentrations (Fig. 4)

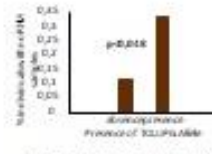


Fig. 3 - TOLLIP G+ individuals show more frequently a year-long absence of rhinovirus.

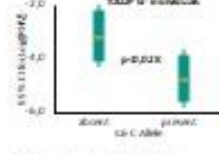


Fig. 4 - IL6 C+ individuals present higher RVV concentrations (if TOLLIP is not related).

#### DISCUSSION

Rhinovirus transmission by air has been controversial, with contradictory findings over the years. Nevertheless, although reported to be less frequent, aerosol transmission is surely an active transmission route<sup>10</sup>. The present results indirectly support this view as the outdoor air rhinovirus was found to closely correlate to nasal rhinovirus presence and concentration. Absence of rhinovirus in all indoor samples tested may result from efficient air conditioning filtering.

TOLLIP is a negative regulator of TLR2 (needed for RVV capsid recognition before cell entry). The G allele decreases TOLLIP and increases TLR2 leading to better RVV clearance before infection. IL6 is needed for RVV clearance after cell entry. TOLLIP sustains production of IL6 (needed for RVV clearance) which may explain why TOLLIP G+ makes the IL6 effect. After infection RVV reaction is mediated by TLR2, TLR8, not TLR2 making TOLLIP is less relevant but increasing the relevance of IL6 for effective infection clearance.

#### CONCLUSION

##### The present results:

- Shows a single peak of rhinovirus infection, possibly associated with warmer weather
  - Suggests the possibility of a changing rhinovirus epidemiology with global warming
- Show a close relationship between the presence of viral RNA in the nostrils of volunteers and the presence of the viral RNA in outdoor air
  - Suggests the possibility of airborne viral transmission;
- Show that TOLLIP G- allele is associated with better RVV clearance before infection, making TOLLIP G+ individuals more often year-long RVV free;
  - Indicates that interindividual susceptibility variance is genetically determined;
- IL6 C allele is associated with better response after infection
  - Indicates that interindividual resistance to infection is genetically determined.

#### MATERIALS AND METHODS

Recruitment of volunteers. 80 students received signed informed consent and filled an admission inquiry. All procedures approved by the University Ethics Committee. Database registered to the national Personal Data Protection Organization.

Nasal sample collection. Monthly for each month collection from volunteers. Samples were collected from each nostril using sterile cotton swabs. Swabs from left and right nostrils were stored together in 200µL of RNAlater (Invitrogen) for 24h at 4°C and then in -80°C. Freezer until RNA extraction procedures.

Air sample collection. Indoor and outdoor air samples collected as previously described<sup>11</sup>. Briefly, Air filtered for 1 hour at 24°C into 60 µm glass fibre 2 µm (Whatman Fibreglass) in closed system with the help of air pump (United Supply - single pump). RVV were then cut in small parts under sterile conditions using fresh sterile disposable syringe and stored as described for the nasal samples.

Viral RNA extraction. Viral RNA extraction was performed using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Following the manufacturer's instructions, total elution volume was 80µL. RNA samples were stored at -80°C.

Rhinovirus RNA detection and quantification. Rhinovirus RNA amplification was performed by qPCR on a Lightcycler 1.1 (Roche, Mannheim) as previously described<sup>12</sup>. Semi-quantification was obtained at relative abundance level of a positive sample.

SNP typing. SNPs were typed by PCR-RFLP exactly as previously described by others<sup>13-15</sup>.


#### BIBLIOGRAPHY

1. Fakhraei F, et al. *Journal of Virology* 2010; 84(12):6111-6118.
2. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.
3. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.
4. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.
5. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.
6. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.
7. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.
8. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.
9. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.
10. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.
11. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.
12. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.
13. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.
14. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.
15. Smith T, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6111-6118.


#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Portuguese Science Foundation (FCT) grants UIDB/Multi/04546/2016 and UIDB/Multi/04546/2013

7. Poster SPI 2018



**P 3**



## Tollip G allele (SNP rs5743899) is associated with a lower year-long incidence of Rhinovirus presence in the nostrils of healthy university students in Porto

Roberta Marino<sup>1,2,3</sup>, Ana Filipa Rodrigues<sup>1,2</sup>, Ana Mafalda Santos<sup>1,2</sup>, Ana Maria Ferreira<sup>1,2</sup>, Esmeralda Barreira<sup>1,2</sup> and José Manuel Cabeda<sup>1,2</sup>

1) FP-ENAS Research Centre, CEBIMED Unit, Porto, Portugal  
2) Universidade Fernando Pessoa, Health Sciences Faculty Porto, Portugal  
3) Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italy

### SUMMARY

**INTRODUCTION**

- Rhinovirus is a common picornavirus with over 150 serotypes and 3 species<sup>1</sup>
- Responsible for 50% of common cold cases<sup>2</sup>
- Can be life threatening in people with chronic respiratory afflictions and elderly<sup>3</sup>

**STUDY**

- Retrospective
- Tested the year-long presence of rhinovirus monthly in nostrils of 89 healthy university students (640 nasal swab samples) by RT-qPCR on a Lightcycler 1.1
- Genotyped volunteers for immune system related gene polymorphisms
  - TOLLIP (rs5743899)
  - IL18 (rs10286)
  - IL6 (-174G/C)
  - TNFA (-308)

**RESULTS**

- Nasal samples showed an increasing frequency of rhinovirus from spring to early winter
  - Minimum of 3% positive samples in May
  - Maximum of 39% positive samples in November
- Both IL6 and TOLLIP gene polymorphisms, but not IL18, nor TNFA polymorphisms were found to relate to the frequency of Rhinovirus detection on the volunteers' nostrils
  - TOLLIP-G individuals more frequently were found to be year-long RRV free
  - IL6-G individuals were found to more frequently show extreme frequencies of RRV
  - All individuals who were free of RRV during the entire one year observation period were either TOLLIP-G or IL6-G

**CONCLUSION:** This is the first description of an association between immune system related genetic polymorphisms and the year-long detection of Rhinovirus in the nostril of human subjects. The relevant polymorphisms impact on known Rhinovirus response immune mechanisms such as TLR2 mediated signaling (crucial for rhinovirus capsid recognition) and IFN- $\lambda$  mediated response, important for viral clearance after infection.

### RESULTS

**Rhinovirus presence in the Nostrils of volunteers**

- 640 Nasal swab samples analyzed from April 2017 to March 2018
- Samples/month varied (max=73 in April; min=25 July; 53.7±15.8 samples/month)
- Frequency of rhinovirus peaks at early winter (Fig. 1)

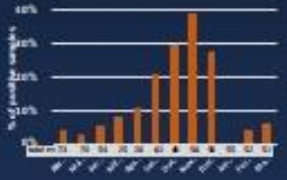


Fig. 1—Frequency of Rhinovirus Nasal swab samples for the duration of the study.

**Polymorphisms influence on year-long Rhinovirus detection**

- TOLLIP-G individuals showed more frequently a year-long absence of rhinovirus (Fig. 2 and 4)
- IL6-G individuals showed more extreme values of RRV samples (Fig. 3). If TOLLIP-G individuals are excluded the results shows essentially increased frequency of RRV (Fig. 4)
- All year-long rhinovirus free individuals have either the TOLLIP-G or the IL6-G allele (Fig. 4)

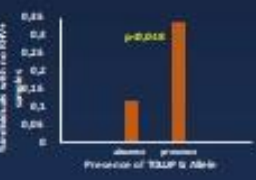


Fig. 2—TOLLIP-G individuals show more frequently a year-long absence of rhinovirus.

**IL6-G individuals show extreme frequencies (null or very high) of rhinovirus**

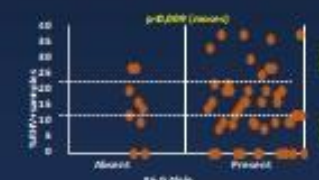


Fig. 3—IL6-G individuals show extreme frequencies (null or very high) of rhinovirus positivity.

**TOLLIP-G individuals show more frequently year-long absence of RRV whereas IL6-G individuals show higher frequency of RRV**

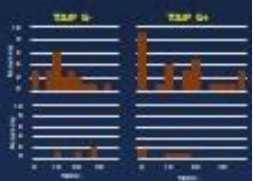


Fig. 4—TOLLIP-G individuals show more frequently year-long absence of RRV whereas IL6-G individuals show higher frequency of RRV.

### DISCUSSION

- TOLLIP is a negative regulator of TLR2 (needed for RRV capsid recognition)
- IL6 is needed for RRV clearance
  - G allele
    - decrease TOLLIP → increase TLR2 → better RRV clearance before infection
    - Sustains production of IL6 (needed for RRV clearance) → explains interaction with IL6-G
    - Decreases production of IFN- $\lambda$  (needed for RRV clearance)
  - After infection RRV reaction is mediated by TLR2, TLR2 → TOLLIP is less relevant.

### CONCLUSION

- TOLLIP-G allele is associated with better RRV clearance before infection
  - Thus TOLLIP-G individuals are more often year-long RRV free
- TOLLIP-G and IL6-G alleles are associated with poorer responses after infection
  - TOLLIP-G+ IL6-G+ individuals show more often both very high frequency of RRV and absence of RRV
- No effect of the tested IL18 and TNFA polymorphisms

### MATERIALS AND METHODS

**Subjects:** 89 young students were recruited. All agreed to an informed consent form. Procedure approved by the Ethics Committee. Database was registered to the National Personal Data Protection Organization. Volunteers who did not provide at least 5 samples were excluded from the Rhinovirus frequency analysis.

**Nasal Swab collection:** A monthly nasal cotton swab was collected from each nostril of each voluntary, submerged in 200  $\mu$ l of RNALater (Invitrogen) solution for 2 hrs at 4°C and then transferred to a -80°C freezer until RNA extraction procedures.

**Viral RNA extraction:** Viral RNA extraction was performed using QiAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer instructions. Final elution volume was 50  $\mu$ l. RNA samples were stored at -80°C.

**Rhinovirus RNA detection:** Rhinovirus RNA amplification was performed by RT-qPCR on a Lightcycler 1.1 (Roche, Germany) as previously described<sup>4</sup>.

**SNP typing:** SNPs were typed by PCR-RFLP as previously described by others.

### BIBLIOGRAPHY

1. Rotenberg, J. et al. Science 324, 99-103 (2008)
2. Ryan, D. & Potho, S. Biol. 266, 100-103 (2016)
3. Cabeda, J. et al. in Rhinovirus: Molecular and Clinical Aspects, 2nd ed. (eds. Rotenberg, J., Rotenberg, S., & Rotenberg, S.) 111-129 (2012)
4. Cabeda, J. et al. J. Virol. Methods 154, 1-7 (2012)
5. Rotenberg, J. et al. J. Virol. Methods 154, 1-7 (2012)
6. Rotenberg, J. et al. J. Virol. Methods 154, 1-7 (2012)
7. Rotenberg, J. et al. J. Virol. Methods 154, 1-7 (2012)
8. Rotenberg, J. et al. J. Virol. Methods 154, 1-7 (2012)
9. Rotenberg, J. et al. J. Virol. Methods 154, 1-7 (2012)
10. Rotenberg, J. et al. J. Virol. Methods 154, 1-7 (2012)

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Portuguese Science Foundation (FCT) grants UIDB/Multi/04546/2016 and UIDB/Multi/04546/2013

8. Poster Euro Public Health 2018



Rhinovirus infection is influenced by atmospheric conditions and outdoor-air virus



Santos A.M.<sup>1,2</sup>, Rodrigues A.F.<sup>1,2</sup>, Ferreira A.M.<sup>1,2</sup>, Cabeda J.M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> FP-ENAS Research Centre, CEBIMED Unit, Porto, Portugal (cabeda@fp.up.edu.pt)  
<sup>2</sup> Universidade Fernando Pessoa, Health Sciences Faculty, Porto, Portugal

SUMMARY

INTRODUCTION:

- Rhinovirus (RV) is a common picornavirus with over 150 serotypes and 3 species<sup>1</sup>
- Responsible for 50% of common cold cases<sup>2</sup>
- Tropism to the upper respiratory tract, but can also infect the lower respiratory tract<sup>3,4</sup>
- Can be life threatening in people with chronic respiratory afflictions and elders<sup>5</sup>
- Transmission routes are controversial but may involve:
  - human to human
  - indirect transmission (surfaces<sup>6,7</sup> and/or aerosols<sup>8,9</sup>)

AIM: Study the role of airborne virus in RVH transmission.

STUDY DESIGN:

- Tested the year long presence of RVH in:
  - Monthly on nostrils of 89 healthy university students (640 nasal swab samples)
  - weekly on indoor and outdoor air at the university campus
- RNA was detected and semi quantified by qPCR on a Lightcycler 1.1.
- Daily meteorological and air quality parameters were recorded.

RESULTS:

- No indoor air samples were found positive
  - Several positive outdoor samples, closely resembling nostril detection distribution
    - Peak in November with all samples positive.
    - Similarly quantification showed highest values in November.
  - Meteorological and air quality parameters correlated with RVH nostril presence:
    - Sun Radiation (p<0.0001)
    - atmospheric SO<sub>2</sub> (R= -0.843; p<0.009)
    - benzene levels (R=0.809; p<0.001)
- CONCLUSION:
- Viral presence and stability in outdoor air may influence human transmission;
  - Close relationship between RVH in nostril of volunteers and in outdoor air
  - Sun Radiation and Atmospheric SO<sub>2</sub> may inactivate air borne viral particles
  - Benzene air levels may negatively influence immune system, increasing chance of viral transmission

RVH detection in nostrils and air

- Similar findings in terms of RVH concentration in nostrils and in outdoor air (Fig.1)
- Close correlation between RVH concentrations in nostrils and in outdoor air (Fig.2)

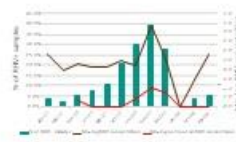


Fig.1-Frequency of Positive Nasal swab samples versus RVH RNA titre in positive nasal swab samples and in outdoor air samples.

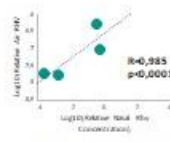


Fig. 2-Correlation between RVH Relative concentration in the nostrils of volunteers and outdoor air samples.

Results

Atmospheric and Air quality parameters influence RVH infection

- Sun radiation is significantly higher (p<0.0001) when negative samples are found (Fig.3)
- SO<sub>2</sub> levels negatively correlate (Person R= -0.843; p<0.009) with the percentage of RVH+ samples (Fig.4)
- SO<sub>2</sub> levels are significantly higher (p<0.0001) when negative samples are detected (Fig.4)
- Benzene levels positively correlate (Person R= -0.809; p<0.001) with the percentage of RVH+ samples (Fig.5)
- Benzene levels are significantly lower (p<0.0001) when negative samples are detected

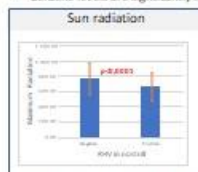


Fig. 3-Sun radiation is significantly higher when negative samples are found

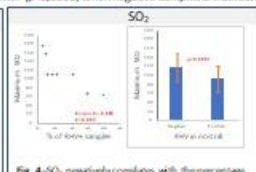


Fig. 4-SO<sub>2</sub> negatively correlates with the percentage of RVH+ samples and SO<sub>2</sub> levels are significantly higher when negative samples are detected

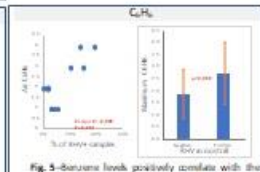


Fig. 5-Benzene levels positively correlate with the percentage of RVH+ samples and Benzene levels are significantly lower when negative samples are detected

DISCUSSION

- Although reported to be less frequent, aerosol transmission is surely an active transmission route<sup>10</sup>, but is usually interpreted as only impacting on direct person person transmissions.
- The present results support an outdoor air RVH transmission route as:
  - Outdoor air RVH closely correlated to nasal RVH presence and concentration.
  - Parameters (sun radiation and SO<sub>2</sub>) potentially decreasing RVH air stability negatively influence RVH nostril detection.
  - Air quality parameters (benzene level) potentially conditioning immune system status positively correlate with RVH detection in nostril.
- Absence of RVH in all indoor samples tested may result from efficient air conditioning filtering, but this requires further testing.

CONCLUSION

The present results suggest that:

- outdoor-air as an important RVH transmission route
- Atmospheric parameters may impact on RVH transmission by:
  - Modulating viral stability in aerosols (SO<sub>2</sub> and sun radiation)
  - Modulating Immune System status (Benzene)

BIBLIOGRAPHY

- Fukushima, A.C. et al. *Journal of Virology* 82, 99-107 (2008)
- Wang, D. et al. *Journal of Virology* 82, 101-107 (2008)
- Wang, D. et al. *Journal of Virology* 82, 101-107 (2008)
- Wang, D. et al. *Journal of Virology* 82, 101-107 (2008)
- Wang, D. et al. *Journal of Virology* 82, 101-107 (2008)
- Wang, D. et al. *Journal of Virology* 82, 101-107 (2008)
- Wang, D. et al. *Journal of Virology* 82, 101-107 (2008)
- Wang, D. et al. *Journal of Virology* 82, 101-107 (2008)
- Wang, D. et al. *Journal of Virology* 82, 101-107 (2008)
- Wang, D. et al. *Journal of Virology* 82, 101-107 (2008)

MATERIALS AND METHODS

Results of which are the students received signed informed consent and filled an admission enquiry. A procedure approved by the University Ethics Committee. It also is registered to the National Personal Data Protection Commission.

Nasal sample collection: Monthly for nasal swab collection from volunteers, samples were collected from nasal nostrils using sterile cotton swabs, swabs from left and right nostrils were stored together in 200µL of RNA lysis buffer (Qiagen) for RNA extraction and then in RNAlater (Qiagen) until RNA extraction procedure.

Air Sample Collection: Indoor and outdoor air samples collected as a single flow of air in a room for 1 hour at 1 m/s flow rate using a TSP-2000 (TSI) for indoor air and a TSP-2000 (TSI) for outdoor air. The air was collected in a 100 µm filter (Whatman) and then in a 200 µL of RNA lysis buffer (Qiagen) for RNA extraction and then in RNAlater (Qiagen) until RNA extraction procedure.

RNA extraction: Total RNA extraction was performed using RNeasy spin kit (Qiagen) following the manufacturer instructions. Total RNA extraction was performed on 100 µL of RNA lysis buffer (Qiagen) for indoor air and 100 µL of RNA lysis buffer (Qiagen) for outdoor air. The RNA was stored at -80°C.

RVH detection and semi quantification: RVH detection was performed by qPCR on a Lightcycler 1.1 (Roche), following the manufacturer instructions. Semi-quantification was obtained relative to a dilution series of a positive sample.

Meteorological and air quality data: Daily meteorological parameters were collected from the FP-ENAS meteorological station and the public air quality monitoring infrastructure.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Portuguese Science Foundation (FCT) grants UID/Multi/04546/2016 and UID/Multi/04546/2013





**10. Artigo Food and Environmental Virology**



# Year-Long Rhinovirus Infection is Influenced by Atmospheric Conditions, Outdoor Air Virus Presence, and Immune System-Related Genetic Polymorphisms

Ana Filipa Rodrigues<sup>1,2</sup> · Ana Mafalda Santos<sup>1,2</sup> · Ana Maria Ferreira<sup>1,2</sup> · Roberta Marino<sup>1,2</sup> · Maria Esmeralda Barreira<sup>1,2</sup> · José Manuel Cabeda<sup>1,2,3</sup> 

Received: 23 April 2019 / Accepted: 12 July 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

## Abstract

Rhinovirus is a common picornavirus with over 150 serotypes and three species, which is responsible for half of the human common cold cases. In people with chronic respiratory conditions and elders, it may also cause life-threatening diseases. Transmission routes are not definitively established but may involve direct human-to-human and indirect transmission (surfaces and aerosols based). In the present study, year-long presence of virus was tested by qPCR in the nostrils of young healthy volunteers and indoor and outdoor air samples. Results were correlated to atmospheric conditions (meteorological and air quality parameters) and voluntaries immune system-related genetic polymorphisms (TOLLIP rs5743899, IL6 rs1800795, IL1B rs16944, TNFA rs1800629) typed by PCR–RFLP. Nasal samples showed increased frequency and viral titers of Rhinovirus in spring and autumn. No indoor air samples tested positive for Rhinovirus, whereas outdoor air samples tested positive in late autumn. Sun radiation, atmospheric SO<sub>2</sub>, and benzene levels correlated with nostrils Rhinovirus detection. Both IL6 and TOLLIP polymorphisms but not TNFA or IL1B influenced Rhinovirus detection in the nostrils of voluntaries. Taken together, the results indicate that Rhinovirus circulation is determined by environmental conditions (weather, air-borne virus, and air pollution) and genetically encoded individual variation in immunity.

**Keywords** Rhinovirus · Environment · Polymorphism · Air-borne virus · Viral susceptibility

## Abbreviation

RHV Rhinovirus

## Introduction

Human Rhinovirus (RHV) is a very common human virus with over 150 different serotypes and three species (Basnet et al. 2019; Palmenberg et al. 2009), causing more than half of the common cold cases (Blaas and Fuchs 2016). In addition to its involvement in this mild, naturally resolving

infection, development of molecular-based multiplex detection has allowed the identification of its role among more severe acute respiratory infections (To et al. 2017). Indeed, it is now recognized as a frequent finding in acute respiratory infections (Jeon et al. 2019) leading to a significant risk (OR = 7.1) for this pathology in older adults (Shi et al. 2019). It is also involved in life-threatening disease in elders and individuals with chronic respiratory diseases (asthma, pulmonary obstructive disease, and cystic fibrosis) (Blaas and Fuchs 2016; Linden et al. 2019), and has even been found in association with at least one case of encephalopathy (Hazama et al. 2019). Rhinovirus has also been a frequent finding among hospitalized patients, in particular among young babies (Leotte et al. 2017; Wildenbeest et al. 2016) and patients undergoing chemotherapy (Aydin-Köker et al. 2019) or hematopoietic stem-cell transplantation (Pochon and Voigt 2019). Additionally, even if only common cold cases are taken into account, the abundance of these RHV-induced cases presents a social and economic burden including school and work absenteeism that should not be

✉ José Manuel Cabeda  
jcabeda@ufp.edu.pt

<sup>1</sup> Fernando Pessoa Energy, Environment and Health Research Unit (FP-ENAS), Porto, Portugal

<sup>2</sup> Health Sciences Faculty, Fernando Pessoa University, Porto, Portugal

<sup>3</sup> Universidade Fernando Pessoa, Gabinete B, Rua Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal

disregarded (Bertino 2002; Fendrick et al. 2003; Nichol et al. 2005; Roelen et al. 2011).

RHV is among the smallest RNA viruses (picornavirus = Pico RNA virus) and infects the upper and sometimes lower respiratory apparatus (Berrajah et al. 2018; Gern 2002; Jacobs et al. 2013; McErlean et al. 2008) via its cellular receptors (ICAM-1, LDLR, or CDHR3) (Basnet et al. 2019; Blaas and Fuchs 2016; Bochkov and Gern 2016). The large frequency of infection may be related to the large serological diversity and the low immune response cross-reactivity (Blaas and Fuchs 2016). Additionally, interindividual variation in the susceptibility to RHV infection may be related to genetically encoded immunological variation (Drysdale et al. 2016), but this has not been clearly demonstrated.

Rhinovirus inoculation usually occurs via the nose, mouth, or eyes (Blaas and Fuchs 2016). An important susceptibility factor may be environmental temperature as it impacts on the viral activity, which could favor its infection during the cold season and in the upper respiratory tract (Blaas and Fuchs 2016). Rhinovirus transmission has been the subject of some controversy but there is direct evidence of person-to-person and indirect transmission (via surfaces or aerosols). RHV is clearly stable for hours in objects (Ikonen et al. 2018) but aerosol transmission is certainly also a transmission route (La-Rosa et al. 2013; Myatt et al. 2003, 2004). RHV infection seasonality may be even related with viral stability in objects and aerosols which may be affected by meteorological conditions (temperature, humidity, UV index) (Du-Prel et al. 2009) or the chemical stability/reactivity of the transmission route (air pollution) (Myatt et al. 2003). However, a recent study has failed to detect significant association between RHV positivity and temperature, humidity, or dew point (Price et al. 2019) clearly indicating that more studies are needed to clarify this point. Pollutants such as ozone and nitrogen oxides and even air-borne particles may also impact on the respiratory tract immunology (Kaan and Hegele 2003; Miller and Peden 2014; Peden and Bush 2015; Romero et al. 2011; Spannhake et al. 2002; Yang and Marr 2011), making air parameters a double sword affecting not only viral stability and activity but also potentially modulating immune system responses.

In the last decades, polymorphisms in several cytokine genes (soluble modulators of immune system activity) have been described, indicating the genetically encoded immunological variation is not just MHC encoded. Thus, interindividual viral susceptibility may also be affected by these gene variations. Indeed, several studies have indicated polymorphisms in TOLLIP, lambda interferon, IL1B, IL8, IL6, and TNFA among others to influence immunological response to viral infections (Doyle et al. 2010; Huang et al. 2016; Noah et al. 1995; Russell et al. 2014; Wine and Alper 2012). Since the immune response to viral agents is significantly different before and after viral cell entry, different

polymorphisms impacting on different components of the immune system could have a different effect on viral infectivity. In particular, TLR and TOLLIP polymorphisms can be expected to impact on the detection of free viral particles by TLR2 (Huang et al. 2016; Shah et al. 2012). Immune System response after infection may be more dependent on viral RNA recognition by TLR7 and TLR8, which is dependent on stress signals induced via IL6, making polymorphisms in these genes more relevant for viral clearance after infection (Doyle et al. 2007; O'Neill and Bowie 2007).

In the present work, we have searched for environment and genetic factors influencing the presence of RHV in the nostrils of young healthy volunteers. For that purpose, we tested by qPCR the year-long presence of RHV in the nostrils of a group of young volunteers. Concomitantly indoor and outdoor air samples were tested for the presence of RHV by the same method, and meteorological and air quality parameters have been recorded. Also, voluntaries were genotyped by PCR-RFLP for polymorphisms in 4 immune system-related genes (TOLLIP rs5743899, IL6 rs1800795, IL1B rs16944, TNFA rs1800629).

## Materials and Methods

### Population Studied

In this study, a total of 89 healthy young volunteers were enrolled, recruited from among the student population of the Faculty of Health Sciences of the Fernando Pessoa University in Porto, Portugal. The volunteers were aged between 20 and 41 years with females accounting for 2/3 of the volunteers. Each student provided a monthly swab sample collected for the characterization of the year-long presence of rhinovirus in the nostrils, and once during the observation period a blood sample or mouth endothelial cell cotton swab (if unwilling to donate blood) for DNA extraction and purification. At first appointment, voluntaries were asked to fill in a questionnaire characterizing themselves on socio-demographic aspects, health living style, and known disease/allergy preconditions.

### Nasal Sample Collection

Voluntaries came monthly for nasal swab collection. Samples were collected from each nostril using sterile cotton swabs. Swabs from left and right nostrils were stored together in 200 µL of RNALater (Invitrogen, USA) solution for 24 h at 4 °C as recommended by the manufacturer to allow the RNA stabilizer to embed the sample and prevent RNA decay, and then transferred to a deep freezer (−70 °C) until RNA extraction procedures. At each appointment,

voluntaries were asked to fill in a questionnaire about symptoms experienced in the last 30 days.

### Viral RNA Extraction

No viral elution from swabs or filters was performed as viral lysis was performed in the collection material. Viral RNA extraction was performed using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. Final elution volume was 60  $\mu$ L. RNA samples were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### Rhinovirus RNA Detection and Quantification

Rhinovirus RNA amplification was performed by qPCR on a Lightcycler 1.1 (Roche, Switzerland) as previously described (Myatt et al. 2004). Briefly, the primers RAF (5'-GACAGTGTTCYAGCCTGCG-3'), RBF (5'-RACHGTGTCYYAGCCTGCG-3'), and LR (5'-GAAACACGGACA CCCAAAGTA-3') were used at a final concentration of 800 nM together with the Taqman Probe (6-FAM-5'-TCC TCCGGCCCCTGAATGYGGC-3'-BHQ1) at 160 nM in a Quantitec Probe RT-PCR Master Mix (Qiagen, Germany). The reaction then took place on a Lightcycler 1.1 thermocycler (Roche, Switzerland). First a reverse transcription step was performed at  $50^{\circ}\text{C}$  for 20 min followed by the RT enzyme inactivation and polymerase activation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 min. Real-time PCR was then performed using 45 cycles consisting of a denaturation step at  $95^{\circ}\text{C}$  for zero seconds, and an annealing/polymerization step at  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min. Fluorescence reading was done at the end of the amplification step. Semi-quantification was obtained relative to a dilution series of a positive sample.

### Air Sample Collection

Indoor and outdoor air samples were collected as previously described (Myatt et al. 2004). Briefly, air was filtered for 1 h at a 4 L/min rate using 37 mm 2.0  $\mu$ m Teflon filters (SKC,

UK) in closed cassettes with the help of an air pump (Leland legacy single pump, SKC, UK). Filters were then cut in small pieces under sterile conditions using fresh sterile disposable scalpels and treated as described for the nasal samples. Air samples were always collected at the same spots. Outdoor air samples were collected outside a third-floor lab window at facilities not used for any other manipulation of the project samples. Indoor air samples were collected at a university cafeteria, a common meeting point for students and staff, on top of a balcony not usually manipulated by the cafeteria staff or clients.

### Meteorological and Air Quality Data

Daily meteorological parameters were collected from the FP-ENAS meteorological station and the public air quality monitoring infrastructure. Data were used from the station closest to the university facilities where voluntaries spend most of their time. Meteorological parameters analyzed were wind speed, temperature, radiation, humidity, and air pressure. Air quality parameters analyzed were ozone, nitrogen oxides, carbon monoxide, sulfur dioxide, and benzene levels.

### DNA Preparation

Genomic DNA was extracted from blood or epithelial mouth cells using Qiam mini Blood DNA kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instruction. Genomic DNA was eluted with 200  $\mu$ L of nuclease-free water and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Genotyping was performed by PCR-RFLP using previously described primers and enzymes as described in Table 1. Briefly 5  $\mu$ L of DNA were mixed with iProof High-Fidelity Master Mix (BioRad, USA), and 1  $\mu$ M of each primer in a total volume of 20  $\mu$ L and subjected to the thermal cycling conditions in Table 1. After PCR, 10  $\mu$ L of the amplicon was mixed with the manufacturer-provided enzyme buffer and respective restriction endonuclease (New England Biolabs, UK; Table 1) for 2 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . PCR

**Table 1** Experimental conditions used for genotyping

Gene/SNP	Primers	PCR thermal cycling	RE enzyme
TOLLIP (de Araujo et al. 2015) rs5743899	5'-GGCAATGGCAGTGGCCACCAGTGA-3' 5'-CCGATGCCCGCACACCTGTGTGAT-3'	3 min— $98^{\circ}\text{C}$ 35 $\times$ [30 s— $98^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $65^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $72^{\circ}\text{C}$ ]	HhaI
IL6 (Honsawek et al. 2011) rs1800795	5'-TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT-3' 5'-CTGATTGAAAACCTTATTAAG-3'	3 min— $98^{\circ}\text{C}$ 35 $\times$ [30 s— $98^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $55^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $72^{\circ}\text{C}$ ]	SFaNI
IL1B (Ishii et al. 2000) rs16944	5'-TGGCATTGATCTGGTTCATC-3' 5'-GTTTAGGAATCTTCCCACTT-3'	3 min— $98^{\circ}\text{C}$ 35 $\times$ [30 s— $98^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $60^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $72^{\circ}\text{C}$ ]	AvaI
TNFA (Sandhya et al. 2013) rs1800629	5'AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' 5'TCCTCCCTGCTCCGATTC-3'	3 min— $98^{\circ}\text{C}$ 35 $\times$ [30 s— $98^{\circ}\text{C}$ ; 15 s— $63^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $72^{\circ}\text{C}$ ]	NcoI

RE restriction endonuclease

restriction fragments were size separated by electrophoresis in 4% NuSieve 3:1 TAE agarose gel (FMC, USA).

## Statistical Analysis

Data were statistically analyzed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 22. Comparisons between RHV-positive and RHV-negative samples and between individuals with or without a specific allele were done by the Student's *t* test. Correlation between variables was analyzed using Pearson Correlation. All statistical analyses were performed at a significance level of 95%.

## Ethical and Legal Aspects

The study was approved by the Fernando Pessoa University Ethical Committee. All voluntaries were explained the study, signed an informed consent, and were given the possibility to drop the study at any moment. The database with the study results was authorized and registered by the Portuguese National Committee for Personal Data Protection.

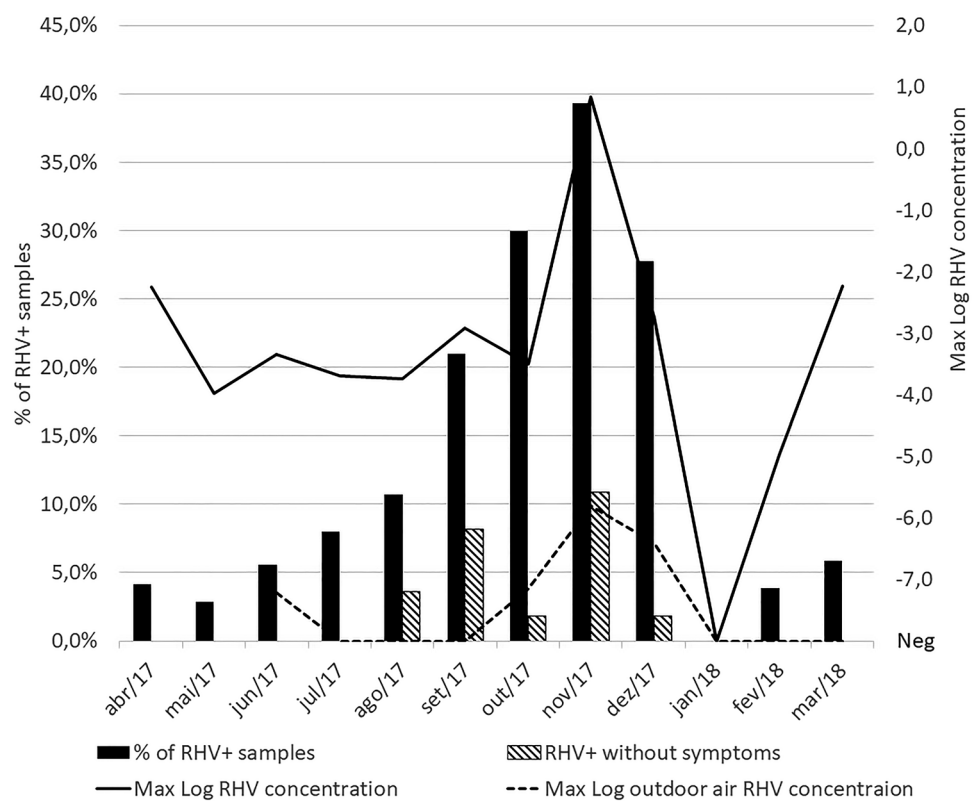
## Results

### RHV Detection in Nostrils of Voluntaries

As can be seen in Fig. 1, RHV was detected in the nostrils of voluntaries during the entire observation period with the exception of January 2018. The monthly frequency of positive samples showed a minimum of 0% in January and peaked to over 40% in November. A similar trend was observed for the RHV titers with a maximum RHV concentration in November but with a smaller peak in March/April.

Next, we tested the relation between detection of RHV in voluntaries and the self-reporting of common cold-associated symptoms. Results showed that RHV was more frequently found among individuals self-reporting the presence of common cold symptom (16%) than among individuals without them (6%). Interestingly, individuals with RHV in the nostrils but not reporting symptoms were very rare and only occurred from August to December, the period of increased RHV incidence, likely reflecting early RHV detection before symptoms arise which one would expect to be more likely in periods of high RHV circulation.

**Fig. 1** Frequency of positive nasal swab samples (filled bars) versus nasal RHV RNA titer (continuous line) and outdoor air RHV RNA titer (dotted line). Concentration was measured as relative to one positive control sample from which a tenfold series dilution was performed and tested. Slashed bars indicate the frequency of RHV-positive nasal samples in individuals not reporting common cold symptoms



## RHV Detection in Air Samples

Contrary to our expectations, no indoor air samples were found positive for RHV. However, during the period of higher nostril RHV incidence, positive outdoor air samples were found from October to December, thus coincident to the months of higher frequency of RHV in the nostrils of voluntaries (Fig. 1). Furthermore, the observed RHV concentrations in nostrils and in Air samples showed a similar pattern, although with clearly different scales (Fig. 1). In fact, a statistically significant correlation was found between nostril RHV concentration and outdoor air RHV concentration ( $R=0.985$ ;  $p<0.0001$ ).

## RHV Nostril Detection and Meteorological and Air Quality Parameters

Next, we investigated whether meteorological and air quality parameters were somehow related to the frequency of RHV-positive samples. As can be seen in Fig. 2, sun radiation was significantly lower when positive RHV samples were found. This is also reflected on a tendency for a negative correlation between radiation and the percentage of RHV-positive samples, but it does not reach statistical significance. Similarly, levels of sulfur dioxide were significantly lower when positive samples were detected ( $p<0.0001$ ) allowing a negative correlation between maximum  $SO_2$  levels and the percentage of RHV+ nasal swabs (Fig. 3;  $R=-0.843$ ;  $p<0.009$ ). Interestingly, the inverse association was found between

nasal swab RHV positivity and benzene atmospheric levels (Fig. 4). Higher benzene levels were associated with positive RHV samples, and a significant positive correlation was found (Fig. 4;  $R=0.809$ ;  $p<0.001$ ).

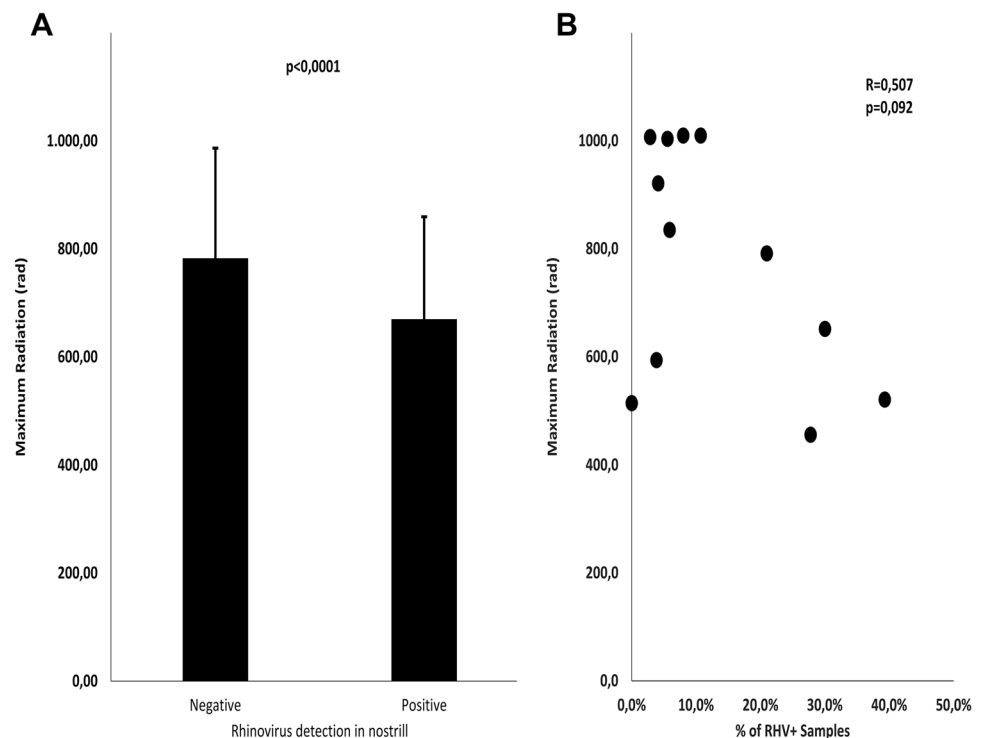
## Influence of Genetic Polymorphisms on RHV Nostril Detection

No difference was found between individuals carrying the various alleles of IL1B (rs16944) and TNFA (rs1800629). However, the presence of the G allele of the TOLLIP rs5743899 SNP significantly increased ( $p<0.048$ ) the likelihood of testing negative for RHV during the entire observation period (Fig. 5). Additionally, if this effect of the TOLLIP SNP is excluded by considering only individuals without the TOLLIC G allele, a statistically significant ( $p<0.028$ ) higher viral titer is found among individuals with the IL6 rs1800795 C allele (Fig. 6).

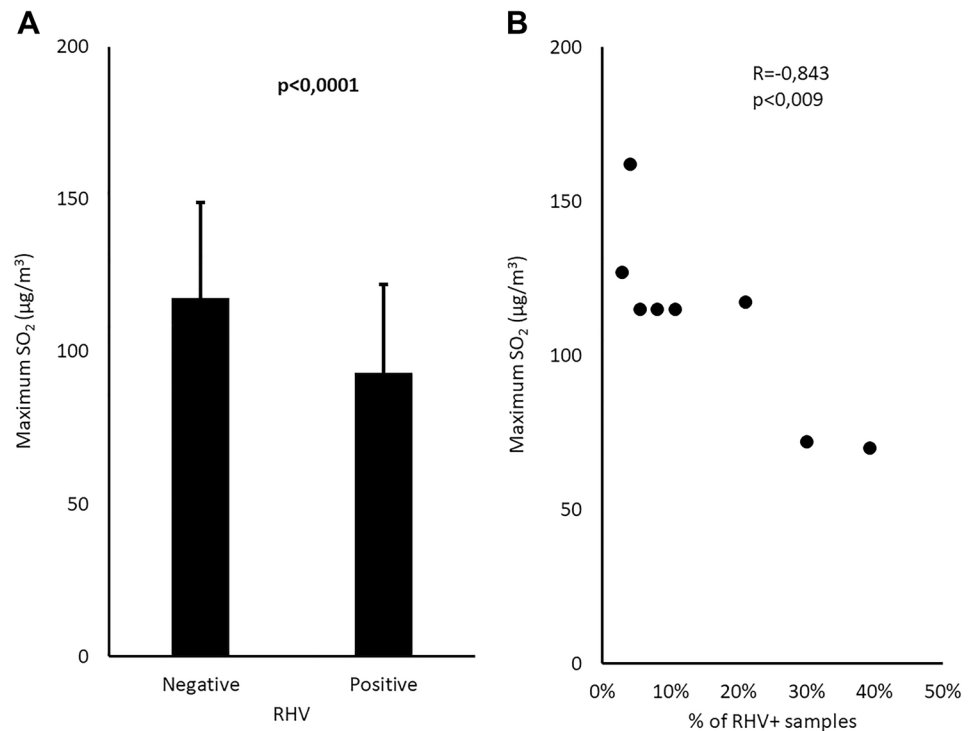
## Discussion

The present results indicate a year-long circulation of RHV, with an increase in incidence during late Autumn–early winter period. Additionally, an extra peak of RHV activity was found in spring when viral concentrations were taken into consideration which suggests a seasonal variation not only in viral infectivity but also in infection severity indicating that

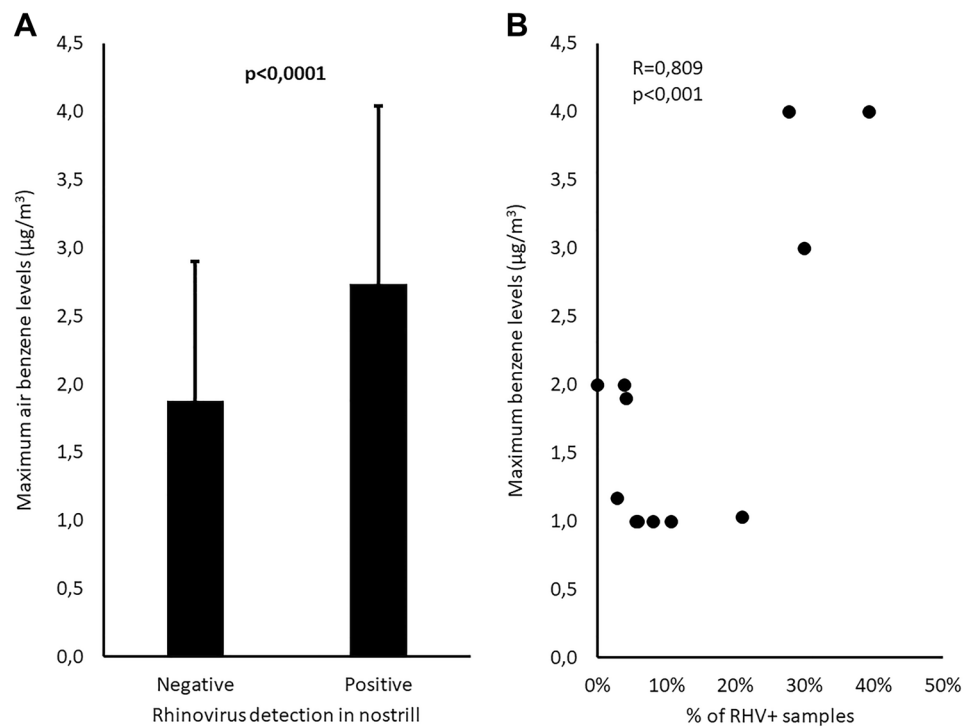
**Fig. 2** Maximum monthly radiation versus RHV detection in the nostril of voluntaries. **a** Negative samples are associated with higher levels of sun maximum radiation, and positive samples with lower levels. **b** This produces a negative correlation between maximum monthly radiation and the percentage of monthly positive samples, but it does not reach statistical significance (lack of significance can be attributed to two outliers with both low percentage of RHV+ samples and low maximum sun radiation corresponding to the observations of January and February 2018)



**Fig. 3** Levels of atmospheric Sulfur dioxide versus nasal swab RHV positivity. **a** Atmospheric  $\text{SO}_2$  levels were found to be lower when nasal swabs test positive for RHV. **b** This produces a negative correlation between maximum levels of  $\text{SO}_2$  in the atmosphere and the percentage of nasal swabs positive for RHV ( $R = -0.843$ ;  $p < 0.009$ )



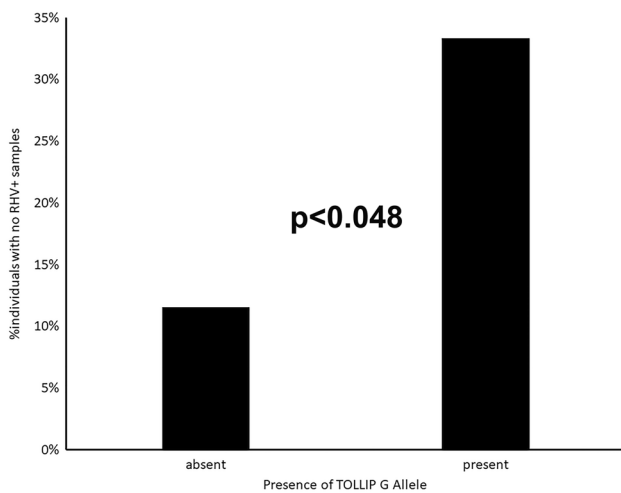
**Fig. 4** Levels of atmospheric benzene versus nasal swab RHV positivity. **a** Atmospheric benzene levels were found to be higher when nasal swabs test positive for RHV. **b** This produces a positive correlation between benzene atmospheric levels and the percentage of nasal swabs positive for RHV ( $R = -0.809$ ;  $p < 0.001$ )



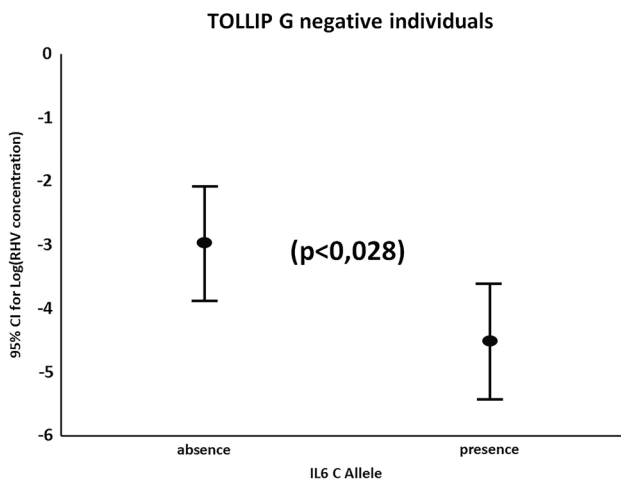
viral concentration should also be assayed when studying the epidemiology of RHV infection.

RHV aerosol transmission is surely an active transmission RHV route (La-Rosa et al. 2013; Myatt et al. 2003, 2004), but is usually interpreted as only impacting on direct

person–person transmissions. The present results support an outdoor air RHV transmission route as outdoor air RHV closely correlated to nasal RHV presence and concentration even if they do not allow to establish a definite causal effect. Confirmation of this would require the genotyping of



**Fig. 5** The percentage of individuals that test negative for nasal RHV during the entire observation period is significantly higher ( $p < 0.048$ ) among individuals with the TOLLIP rs5743899 G allele



**Fig. 6** When considering only individuals without the TOLLIP rs5743899 G allele, the nasal RHV concentration was found to be dependent on the presence of the IL6 rs1800795 C allele, with a significant ( $p < 0.028$ ) lower RHV concentration being found among individuals with the IL6 C allele

the viruses detected, something that should be addressed in follow-up studies. Furthermore, the availability of sequencing data would also help clarify whether volunteers with consecutive positive samples result from persistent infections or from reinfections.

Another interesting evidence supporting the air RHV transmission was the finding that atmospheric parameters that may affect atmospheric viral stability such as sun radiation (Myatt et al. 2003) and  $\text{SO}_2$  levels were negatively correlated to RHV nostril detection. Interestingly, these are exactly the parameters long ago described to show virucidal effect in an experimental aerosol exposure of Venezuelan

Equine Encephalomyelitis Virus (Berendt et al. 1972) suggesting a direct environmental exposure effect on the virus particles. However, experimental exposure of animals to viruses also showed a collaborative effect of  $\text{SO}_2$  and influenza on short-term exposure (Lebowitz and Fairchild 1973), suggesting a dual role for  $\text{SO}_2$  (decreased viral stability but increased immune system susceptibility) that could complicate analysis. This is also suggested by Asian results indicating a positive correlation between  $\text{SO}_2$  and lower respiratory infections, but only during the dry season (Le et al. 2012), a period with also high radiation levels, thus making the  $\text{SO}_2$  virucidal effect redundant and potentiating the effect of  $\text{SO}_2$  on the immune system. Interestingly, benzene, an air pollutant previously described to potentially condition immune system status by decreasing immune system cells in blood and spleen and decrease immune system progenitor cells leaving the bone marrow (Wen et al. 2016; Zhang et al. 2010) showed a positive correlation with RHV detection in nostrils, further suggesting that air quality may affect not only virus stability and infectivity but also modulate immune system responses to virus. A similar effect has also been demonstrated by others for syncytial respiratory virus (Nenna et al. 2017) suggesting this to be an effect that may be relevant for several viral-associated pathologies.

The lack of detection of RHV in indoor air samples came as a surprising result. Previous work by others has shown the detection of RHV in closed environments reflecting virus shedding (Myatt et al. 2004). However, our results may reflect the unintended proximity of an air conditioning exhaust to the site of air collection, possibly indicating the efficiency of the air conditioning at clearing the air from viral particles. This result suggests that air conditioning filters should be examined in future experiments as it could indicate an easy to implement purification system during winter, especially in retirement houses where RHV infection severity and morbidity may be especially important.

TOLLIP is a negative regulator of TLR2 (Shah et al. 2012; Zhang and Ghosh 2002). In turn, TLR2 is an important immune system surveillance receptor needed for RHV capsid recognition before the virus enters the cells (Huang et al. 2016; Triantafilou et al. 2011). The TOLLIP rs5743899 G allele is known to decrease TOLLIP expression (Huang et al. 2016), therefore increasing TLR2 expression, which in turn contributes to better RHV detection and clearance by the immune system before viral cell entry (Bentley et al. 2019), effectively preventing infection. Additionally, a recent paper has shown that Tollip inhibits ST2 signaling in RHV-exposed airway epithelial cells, making the lower expression of TOLLIP a way of counteracting this inhibitory pathway, and achieving better RHV particle detection and clearance, even if it may lead to increased neutrophilic inflammation (Dakhama et al. 2019). After RHV enters cells, its recognition shifts from TLR2 to TLR7 and TLR8 which recognize

viral single-stranded RNA (O'Neill and Bowie 2007). These receptors are known to send an emergency signal via the induction of IL6 (Doyle et al. 2007) which is a critical anti-inflammatory regulator of viral-induced immunopathology in the respiratory tract (Pyle et al. 2017). This IL6 pathway is therefore likely only relevant after viral cell entry and is thus independent of the TLR2-related TOLLIP effect we propose above. IL6 rs1800795 has been associated with lower gene expression which may counteract the increased expression stimulated by some viral components (Tanaka et al. 2014). However, since TOLLIP has been shown to sustain production of IL6 in several inflammatory conditions (Humbert-Claude et al. 2016; Kowalski and Li 2017), the effect of the IL6 gene polymorphism may only be seen when TOLLIP-induced sustained IL6 production is not taking place, which may explain why, in our results, the presence of the TOLLIP G allele masks the IL6 C allele effect. In the absence of the TOLLIP G allele, the absence of the IL6 C allele decreases IL6 levels, thus decreasing the emergency response to RHV after infection is established leading to higher viral titers found.

## Conclusions

The present results confirm an autumn/winter increase in the frequency of RHV infections as reported by others (Jeon et al. 2019; Price et al. 2019; Reis and Shaman 2018; To et al. 2017), while also revealing an increase in the viral titers in positive cases in early spring, which is also in agreement with the previous reports (Leotte et al. 2017; Reis and Shaman 2018; To et al. 2017). A close association between the presence of RNA virus in the nostrils of voluntaries and the self-reporting of common cold symptoms was also found revealing that infection is usually associated with symptoms. The finding of air-borne RHV virus with a frequency and concentration closely resembling the nasal viral detection strongly suggests atmospheric air-carrying of virus as a potentially relevant transmission route. A similar conclusion may be drawn from the finding of environmental factors such as sun radiation and air pollution correlating with virus nostril detection. Interestingly, specific pollutants such as SO<sub>2</sub> or benzene showed differential effects, suggesting a dual-sword effect on virus stability in air and on immune system modulation effects. Both of these aspects deserve further clarification in controlled experimental conditions. Finally, two different polymorphisms have been found to differentially modulate the risk for RHV infection by two complementary mechanisms: TOLLIP rs5743899 G allele may increase resistance to infection, whereas IL6 rs1800795 C allele may decrease RHV titers when infection occurs.

Thus, the present results show that RHV infection is influenced by both environmental factors (meteorological factors,

RHV air-borne particles, and air quality determinants) and by genetic-based differential susceptibility to RHV infection.

**Acknowledgements** This work was supported by Portuguese Science Foundation (FCT) Grants UID/Multi/04546/2013, UID/Multi/04546/2016, and UID/Multi/04546/2019. The funding agency took no part in study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the paper or on the decision to publish it.

**Author Contributions** Conceptualization: JMC and MEB; Methodology: JMC, MEB, AFR, AMS, AMF, and RM; Software development, Validation, Formal analysis, Resources, Data curation, Supervision, Project administration, Funding acquisition, and Writing—original draft preparation: JMC; Investigation: JMC, MEB, AFR, AMS, AMF, and RM; Writing—review and editing: JMC, MEB, AFR, AMS, AMF, and RM.

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of interest** The authors declare no conflicts of interest.

**Research Involving Human Participants and/or Animals** The work was approved by the University Fernando Pessoa Ethics committee and done in accordance with the ethical standards as laid down by the 14964 Declaration of Helsinki and later amendments. All data acquisitions were done using a Individual ID code known only to the voluntary subject. Database was authorized and registered with the National Individual Data Protection committee and contains no data capable of identifying the subject under study.

**Informed Consent** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study, prior to any sample or data acquisition. Informed consent forms were approved by the University ethics committee. Voluntaries were allowed to drop the study at any time during the observation period.

## References

- Aydin-Köker, S., Demirağ, B., Tahta, N., Bayram, N., Oymak, Y., Karapinar, T. H., et al. (2019). A 3-year retrospective study of the epidemiology of acute respiratory viral infections in pediatric patients with cancer undergoing chemotherapy. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. <https://doi.org/10.1097/mpg.0000000000001418>.
- Basnet, S., Palmenberg, A. C., & Gern, J. E. (2019). Rhinoviruses and their receptors. *Chest*. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.12.012>.
- Bentley, J. K., Han, M., Jaipalli, S., Hinde, J., Lei, J., Ishikawa, T., et al. (2019). Myristoylated rhinovirus VP4 protein activates TLR2-dependent pro-inflammatory gene expression. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00365.2018>.
- Berendt, R. F., Dorsey, E. L., & Hearn, H. J. (1972). Virucidal properties of light and SO<sub>2</sub> I. Effect on aerosolized Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 139(1), 1–5. <https://doi.org/10.3181/00379727-139-36063>.
- Berrajah, L., Ben Slama, K. A., Khbou, I., Gargouri, S., Chtourou, A., Znazen, A., et al. (2018). Virus et bactéries atypiques détectés dans les infections respiratoires basses communautaires de l'enfant dans la région de Sfax en Tunisie. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 111(2), 90–98. <https://doi.org/10.3166/bspe-2018-0024>.

- Bertino, J. S. (2002). Cost burden of viral respiratory infections: issues for formulary decision makers. *The American Journal of Medicine*, 112 Suppl 6A, 42S–49S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11955459>. Accessed 5 April 2019.
- Blaas, D., & Fuchs, R. (2016). Mechanism of human rhinovirus infections. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3, 21–24. <https://doi.org/10.1186/s40348-016-0049-3>.
- Bochkov, Y. A., & Gern, J. E. (2016). Rhinoviruses and their receptors: implications for allergic disease. *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(4), 30. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0608-7>.
- Dakhama, A., Al Mubarak, R., Pavelka, N., Voelker, D., Seibold, M., Ledford, J. G., et al. (2019). Tollip inhibits ST2 signaling in airway epithelial cells exposed to type 2 cytokines and rhinovirus. *Journal of Innate Immunity*. <https://doi.org/10.1159/000497072>.
- de Araujo, F. J., da Silva, L. D. O., Mesquita, T. G., Pinheiro, S. K., de Seixas Vital, W., Chrusciak-Talhari, A., et al. (2015). Polymorphisms in the TOLLIP gene influence susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by leishmania guyanensis in the amazonas state of Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(6), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003875>.
- Doyle, W. J., Casselbrant, M. L., Li-Korotky, H., Cullen Doyle, A. P., Lo, C., Turner, R., et al. (2010). The interleukin 6–174 C/C genotype predicts greater rhinovirus illness. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(2), 199–206. <https://doi.org/10.1086/649559>.
- Doyle, S. L., Jefferies, C. A., Feighery, C., & O'Neill, L. A. J. (2007). Signaling by Toll-like receptors 8 and 9 requires Bruton's tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(51), 36953–36960. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707682200>.
- Drysdale, S. B., Alcazar, M., Wilson, T., Smith, M., Zuckerman, M., Hodemaekers, H. M., et al. (2016). Functional and genetic predisposition to rhinovirus lower respiratory tract infections in prematurely born infants. *European Journal of Pediatrics*, 175(12), 1943–1949. <https://doi.org/10.1007/s00431-016-2780-0>.
- Du-Prel, J., Puppe, W., Gröndahl, B., Knuf, M., Weigl, J. A. I., Schaaff, F., et al. (2009). Are meteorological parameters associated with acute respiratory tract infections? *Clinical Infectious Diseases*, 49(6), 861–868. <https://doi.org/10.1086/605435>.
- Fendrick, A. M., Monto, A. S., Nightengale, B., & Sarnes, M. (2003). The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Archives of Internal Medicine*, 163(4), 487–494. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12588210>. Accessed 5 April 2019.
- Gern, J. E. (2002). Rhinovirus respiratory infections and asthma. *The American Journal of Medicine*, 19S–27S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11955456>.
- Hazama, K., Shiihara, T., Tsukagoshi, H., Matsushige, T., Dowa, Y., & Watanabe, M. (2019). Rhinovirus-associated acute encephalitis/encephalopathy and cerebellitis. *Brain and Development*. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2019.02.014>.
- Honsawek, S., Deepaisarnsakul, B., Tanavalee, A., Yuktanandana, P., Bumrungrpanichthaworn, P., Malila, S., et al. (2011). Association of the IL-6 -174G/C gene polymorphism with knee osteoarthritis in a Thai population. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 1674–1680. <https://doi.org/10.4238/vol10-3gmr1161>.
- Huang, C., Jiang, D., Francisco, D., Berman, R., Wu, Q., Ledford, J. G., et al. (2016). Tollip SNP rs5743899 modulates human airway epithelial responses to rhinovirus infection. *Clinical & Experimental Allergy*. <https://doi.org/10.1111/cea.12793>.
- Humbert-Claude, M., Duc, D., Dwir, D., Thieren, L., Sandström von Tobel, J., Begka, C., et al. (2016). Tollip, an early regulator of the acute inflammatory response in the substantia nigra. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 303. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0766-5>.
- Ikonen, N., Savolainen-Kopra, C., Enstone, J. E., Kulmala, I., Pasanen, P., Salmela, A., et al. (2018). Deposition of respiratory virus pathogens on frequently touched surfaces at airports. *BMC Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3150-5>.
- Ishii, T., Matsuse, T., Teramoto, S., Matsui, H., Miyao, M., Hosoi, T., et al. (2000). Neither IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist, nor TNF- $\alpha$  polymorphisms are associated with susceptibility to COPD. *Respiratory Medicine*, 94(9), 847–851. <https://doi.org/10.1053/rmed.2000.0808>.
- Jacobs, S. E., Lamson, D. M., Kirsten, S., & Walsh, T. J. (2013). Human rhinoviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 135–162. <https://doi.org/10.1128/CMR.00077-12>.
- Jeon, J., Han, M., Chang, H., Park, S., Lee, J., Ahn, Y., et al. (2019). Incidence and seasonality of respiratory viruses causing acute respiratory infections in the Northern United Arab Emirates. *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.25464>.
- Kaan, P. M., & Hegele, R. G. (2003). Interaction between respiratory syncytial virus and particulate matter in guinea pig alveolar macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 28(6), 697–704. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0115OC>.
- Kowalski, E. J. A., & Li, L. (2017). Toll-interacting protein in resolving and non-resolving inflammation. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00511>.
- La-Rosa, G., Fratini, M., Della Libera, S., Iaconelli, M., & Muscillo, M. (2013). Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 49(2), 124–132. [https://doi.org/10.4415/ANN\\_13\\_02\\_03](https://doi.org/10.4415/ANN_13_02_03).
- Le, T. G., Ngo, L., Mehta, S., Do, V. D., Thach, T. Q., Vu, X. D., et al. (2012). Effects of short-term exposure to air pollution on hospital admissions of young children for acute lower respiratory infections in Ho Chi Minh City. *Vietnam. Research report (Health Effects Institute)*, 169, 5–83.
- Lebowitz, M. D., & Fairchild, G. A. (1973). The effects of sulfur dioxide and A2 influenza virus on pneumonia and weight reduction in mice: an analysis of stimulus-response relationships. *Chemico-Biological Interactions*, 7(5), 317–326.
- Leotte, J., Trombetta, H., Faggion, H. Z., Almeida, B. M., Nogueira, M. B., Vidal, L. R., et al. (2017). Impact and seasonality of human rhinovirus infection in hospitalized patients for two consecutive years. *Jornal de Pediatria*, 93(3), 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2016.07.004>.
- Linden, D., Guo-Parke, H., Coyle, P. V., Fairley, D., McAuley, D. F., Taggart, C. C., et al. (2019). Respiratory viral infection: a potential “missing link” in the pathogenesis of COPD. *European Respiratory Review*, 28(151), 180063. <https://doi.org/10.1183/1600617.0063-2018>.
- McErlean, P., Shackelton, L. A., Andrews, E., Webster, D. R., Lambert, S. B., Nissen, M. D., et al. (2008). Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, Human rhinovirus C (HRV C). *PLoS ONE*, 3(4), 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001847>.
- Miller, R. L., & Peden, D. B. (2014). Environmental effects on immune responses in patients with atopy and asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(5), 1001–1008. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.064>.
- Myatt, T. A., Johnston, S. L., Rudnick, S., & Milton, D. K. (2003). Airborne rhinovirus detection and effect of ultraviolet irradiation on detection by a semi-nested RT-PCR assay. *BMC Public Health*, 3, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-3-5>.
- Myatt, T. A., Johnston, S. L., Zuo, Z., Wand, M., Keadze, T., Rudnick, S., et al. (2004). Detection of airborne rhinovirus and its relation to outdoor air supply in office environments. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 169(11), 1187–1190. <https://doi.org/10.1164/rccm.200306-760oc>.
- Nenna, R., Evangelisti, M., Frassanito, A., Scagnolari, C., Pierangeli, A., Antonelli, G., et al. (2017). Respiratory syncytial virus bronchiolitis, weather conditions and air pollution in an Italian urban

- area: an observational study. *Environmental Research*, 158, 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.06.014>.
- Nichol, K. L., Heilly, S. D., & Ehlinger, E. (2005). Colds and influenza-like illnesses in university students: impact on health, academic and work performance, and health care use. *Clinical Infectious Diseases*, 40(9), 1263–1270. <https://doi.org/10.1086/429237>.
- Noah, T. L., Henderson, F. W., Wortman, I. A., Devlin, R. B., Handy, J., Koren, H. S., et al. (1995). Nasal cytokine production in viral acute upper respiratory infection of childhood. *Journal of Infectious Diseases*, 171(3), 584–592. <https://doi.org/10.1093/infdis/171.3.584>.
- O'Neill, L. A. J., & Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*, 7(5), 353–364. <https://doi.org/10.1038/nri2079>.
- Palmenberg, A. C., Spiro, D., Kuzmickas, R., Wang, S., Djikeng, A., Rathe, J. A., et al. (2009). Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science*, 324(5923), 55–59. <https://doi.org/10.1126/science.1165557>.
- Peden, D. B., & Bush, R. K. (2015). Advances in environmental and occupational disorders in 2014. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(4), 866–871. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.008>.
- Pochon, C., & Voigt, S. (2019). Respiratory virus infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3294. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03294>.
- Price, R. H. M., Graham, C., & Ramalingam, S. (2019). Association between viral seasonality and meteorological factors. *Scientific Reports*, 9(1), 929. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37481-y>.
- Pyle, C. J., Uwadiae, F. I., Swieboda, D. P., & Harker, J. A. (2017). Early IL-6 signalling promotes IL-27 dependent maturation of regulatory T cells in the lungs and resolution of viral immunopathology. *PLoS Pathogens*, 13(9), e1006640. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006640>.
- Reis, J., & Shaman, J. (2018). Simulation of four respiratory viruses and inference of epidemiological parameters. *Infectious Disease Modelling*, 3, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.idm.2018.03.006>.
- Roelen, C. A. M., Koopmans, P. C., Notenbomer, A., & Groothoff, J. W. (2011). Job satisfaction and short sickness absence due to the common cold. *Work (Reading, Mass)*, 39(3), 305–313. <https://doi.org/10.3233/wor-2011-1178>.
- Romero, O. C., Straub, A. P., Kohn, T., & Nguyen, T. H. (2011). Role of temperature and suwannee river natural organic matter on inactivation kinetics of rotavirus and bacteriophage MS2 by solar irradiation. *Environmental Science and Technology*, 45(24), 10385–10393. <https://doi.org/10.1021/es202067f>.
- Russell, C. D., Griffiths, S. J., & Haas, J. (2014). Interferon lambda genetic polymorphisms and viral infection: the tip of the iceberg? *DNA and Cell Biology*, 33(2), 60–63. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2261>.
- Sandhya, P., Danda, S., Danda, D., Lonarkar, S., Luke, S. S., Sinha, S., et al. (2013). Tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -308 gene polymorphism in Indian patients with Takayasu's arteritis—a pilot study. *The Indian journal of Medical Research*, 137(4), 749–752.
- Shah, J. A., Vary, J. C., Chau, T. T. H., Bang, N. D., Yen, N. T. B., Farrar, J. J., et al. (2012). Human TOLLIP regulates TLR2 and TLR4 signaling and its polymorphisms are associated with susceptibility to tuberculosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(4), 1737–1746. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103541>.
- Shi, T., Arnott, A., Semogas, I., Falsey, A. R., Openshaw, P., Wedzicha, J. A., et al. (2019). The etiological role of common respiratory viruses in acute respiratory infections in older adults: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy662>.
- Spannhake, E. W., Reddy, S. P. M., Jacoby, D. B., Yu, X.-Y., Saatian, B., & Tian, J. (2002). Synergism between rhinovirus infection and oxidant pollutant exposure enhances airway epithelial cell cytokine production. *Environmental Health Perspectives*, 110(7), 665–670. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110665>.
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>.
- To, K. K. W., Yip, C. C. Y., & Yuen, K.-Y. (2017). Rhinovirus—from bench to bedside. *Journal of the Formosan Medical Association*, 116(7), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2017.04.009>.
- Triantafilou, K., Vakakis, E., Richer, E. A. J., Evans, G. L., Villiers, J. P., & Triantafilou, M. (2011). Human rhinovirus recognition in non-immune cells is mediated by toll-like receptors and MDA-5, which trigger a synergetic pro-inflammatory immune response. *Virulence*, 2(1), 22–29. <https://doi.org/10.4161/viru.2.1.13807>.
- Wen, H., Yuan, L., Wei, C., Zhao, Y., Qian, Y., Ma, P., et al. (2016). Effects of combined exposure to formaldehyde and benzene on immune cells in the blood and spleen in Balb/c mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.007>.
- Wildenbeest, J. G., van der Schee, M. P., Hashimoto, S., Benschop, K. S. M., Minnaar, R. P., Sprikkelman, A. B., et al. (2016). Prevalence of rhinoviruses in young children of an unselected birth cohort from the Netherlands. *Clinical Microbiology & Infection*, 22(8), 736.e9–736.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.022>.
- Wine, T. M., & Alper, C. M. (2012). Cytokine responses in the common cold and otitis media. *Current Allergy and Asthma Reports*, 12(6), 574–581. <https://doi.org/10.1007/s11882-012-0306-z>.
- Yang, W., & Marr, L. C. (2011). Dynamics of airborne influenza A viruses indoors and dependence on humidity. *PLoS ONE*, 6(6), e21481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021481>.
- Zhang, G., & Ghosh, S. (2002). Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7059–7065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109537200>.
- Zhang, L., McHale, C. M., Rothman, N., Li, G., Ji, Z., Vermeulen, R., et al. (2010). Systems biology of human benzene exposure. *Chemico-Biological Interactions*, 184(1–2), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.12.011>.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.