

49



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

TIPIFICACION DE ADENOVIRUS EN MEXICO
DURANTE EL BROTE DE CONJUNTIVITIS
HEMORRAGICA DE 1998

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

VERA PEÑA ALVARADO

ASESORES: BIOL. IRMA LOPEZ MARTINEZ
M. EN C. HIRAM OLIVERA DIAZ

2000

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2000.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Tipificación de adenovirus en México durante el brote de
conjuntivitis hemorrágica de 1998.

que presenta la pasante: Vera Peña Alvarado
con número de cuenta: 9452152-2 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 05 de Mayo de 2000

PRESIDENTE M. V. Z. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Q. F. I. Andrea Becerril Osnaya *Andrea A. Becerril Osnaya*

SECRETARIO Biol. Irma López Martínez

PRIMER SUPLENTE Q. B. P. Judith Martínez Zamitiz

SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Alberto Natahliel Soto Guevara

A DIOS.
Por permitirme vivir cada día
Y darme una familia excepcional



A MIS PADRES
Por darme el don de la vida, por su apoyo incondicional
Porque gracias a ustedes he alcanzado la dicha de este momento
Porque este éxito también es suyo
Los quiero mucho

A M I PAPA †

Este trabajo te lo dedico porque es el mejor premio a tus enseñanzas
y a tu esfuerzo por hacerme una mujer de bien
Por haber sido siempre el mejor de los Padres
Gracias por darme las fuerzas día a día para salir adelante
Gracias por enseñarme a alcanzar mis retos, aceptar mis derrotas
aprender de los errores y levantarme de los tropiezos.
Gracias por dejarme la herencia más valiosa, tu ejemplo
Y por todo lo que las palabras no pueden expresar mil gracias

A M I MAMA.
Gracias por todo tu apoyo paciencia y dedicación.
Que siempre me has dado



A ERIKA. Porque más que mi hermana eres
Mi mejor amiga, gracias por todo el apoyo
que siempre me has demostrado

A M I TIO LUIS: Por ser el mejor tío del mundo.
Gracias estar siempre con nosotros, por todo tu apoyo
Consejos y cariño y porque no existen palabras para
Agradecerte todo tu apoyo.
GRACIAS Te quiero mucho.

Tia Chela, tia Silvia, tio Pancho y mamá
Esperanza, Alma y Guicho.
Por formar parte de mi familia.

VICTOR. Gracias por enseñarme lo hermoso que puede ser el amor,
Por todos los momentos que hemos compartido juntos
y formar parte de mi vida.



PEDRO por ser mi mejor amigo de toda la vida, gracias
Por estar conmigo en todo momento, por
Todo tu apoyo y cariño.
Te quiero mucho

FAM. HERNÁNDEZ TRUJILLO.
Por ser grandes amigos y consejeros.

KATHIA. Por que sigamos siendo tan buenas
Amigas como hasta ahora.

PATY: Por demostrarme que la amistad existe
Eres una gran amiga

Sr. TILO TOEGEL por el gran apoyo
Y amistad que siempre nos ha demostrado



Prof. ANGEL. Por ser más que mi profesor
Por contribuir a mi formación profesional dandome un poco
De sus conocimientos

ANA porque no tengo palabras para agradecerte
Todo tu apoyo, no te voy a fallar.
GRACIAS

FRED PLANTEVIN Por su apoyo y ser un excelente jefe
Y siendo un ejemplo a seguir como ser humano

CHARLIE Y DR. HIRAM. Por toda su orientación técnica
Para la realización de este trabajo.

Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
Irma López por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo.

INDICE

	PÁG
INDICE DE FIGURAS	I
INDICE DE TABLAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMEN	IV
INTRODUCCIÓN	V
MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	
Capítulo 1. Generalidades del Adenovirus.	1
1.1. Historia del Adenovirus.	1
1.2. Taxonomía.	2
1.3. Morfología	4
1.4. Genética.	5
1.5. Ciclo de replicación.	7
1.6. Patologías.	8
1.7. Epidemiología de conjuntivitis hemorrágica	10
1.8. Diagnóstico.	11
1.9. Terapia y profilaxis.	12
Capítulo 2. Hipotesis y Objetivos	13
Capítulo 3. MATERIAL Y METODOS	
3.1. Delimitación del lote	15
3.2. Inmunofluorescencia directa.	15
3.3. Propagación viral.	15
3.4. Titulación viral.	16
3.4.1. Conteo celular	16
3.4.2. Titulación viral por Efecto Citopatico	16

3.5. Prueba de tipificación	17
3.5.1. Prueba de Hemaglutinación.	17
3.5.2. Tipificación por enzimas de restricción.	19
3.5.2.1 Extracción de DNAv.	19
3.5.2.2 Electroforesis.	19
3.5.2.3 Digestión enzimática	19
Capítulo 4. RESULTADOS.	
4.1. Identificación de adenovirus	21
4.2. Tipificación	24
4.2.1. Grupo y subgrupo.	24
4.2.2 Tipo	24
Capítulo 5. Discusión de resultados.	31
Capítulo 6. Conclusiones y recomendaciones.	
6.1. Conclusiones.	34
6.2. Recomendaciones.	35
Anexo I Preparación de soluciones	36
Bibliografía	37

INDICE DE FIGURAS

FIG.	Pág
1. Estructura del Adenovirus	4
2. Ciclo de replicación del Adenovirus	7
3. Diagrama de flujo para la tipificación de adenovirus	14
4. Esquema de diluciones	17
5. Prueba de hemaglutinación	18
6. Fragmentos de restricción con Hind III	20
7. Monocapa normal de células Hep-2	26
8. Monocapa de células Hep-2 con efecto citopático	26
9. Control positivo de adenovirus para IFAd	27
10. Control negativo células Hp-2 para IFAd	27
11. Muestra positiva de adenovirus en IFAd	27
12. Patron de bandas obtenido con Hind III	28
13. DNAv y DNAv como control positivo	28
14. Control de DNA 23,000pb con banda de 7000pb	29
15. Digestion con RNAsa	29
16. DNAv de 23,000 pb	30

INDICE DE TABLAS

TABLA		Pág
1.	Clasificación de adenovirus	3
2.	Proteínas constituyentes del cápsomero	5
3.	Enfermedades causadas por adenovirus	9
4.	Pruebas diagnósticas de adenovirus	12
5.	Tipificación por hemaglutinación	18
6.	Fragmentos de restricción con Hind III	20
7.	Resultados generales	24

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ad	Adenovirus
Ag	Antígeno
CC	Cultivo celular
CMEM	Medio mínimo esencial complementado
CHA	Conjuntivitis hemorrágica aguda
DGV	Dextrosa - gelatina - Veronal
DNA2c	DNA de doble cadena
DNAv	DNA viral
Dx	Diagnóstico
ECP	Efecto citopático
EKC	Epidemia Kerato Conjuntivitis
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FICT	Isotiocianato de fluoresceína
G-C	Guanina- citocina
HA	Hemaglutinación
HEK	Células embrionarias humanas
HeLa	Carcinoma de cervix humana
Hep-2	Carcinoma de laringe humana
Hind III	Enzima de restricción <i>Haemophilus influenza</i> III
IFA	Inmunofluorescencia
IFAd	Inmunofluorescencia directa
IFAi	Inmunofluorescencia indirecta
IHA	Inhibición de la hemaglutinación
kb	kilobases
MEM	Medio mínimo esencial
mg	microgramos
ml	microlitros
nm	nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
R.F.	Fragmentos de restricción
REH	Células de riñón embrionario humano
RFLP	Fragmentos de restricción polimórficos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
TBE	Tris- boratos- EDTA
TCID50	Dosis infectiva en cultivo de tejido 50
U.V.	Ultravioleta
VERO	Células de riñón de mono verde

RESUMEN

El adenovirus (Ad) es uno de los agentes etiologicos más importantes de la conjuntivitis hemorrágica aguda (CHA) en la población, desde apariciones esporádicas hasta brotes epidemiológicos. En el mundo se han identificado diversos tipos de adenovirus que afectan a la conjuntiva, Ad3, 4 y 7 para CHA y Ad8, 19 y 37 para EKC.

El brote de 1998 en México fue causado por Ad pero se desconoce el tipo presente en el país. La técnica de inmunofluorescencia directa (IFAd) o la indirecta (IFAi), la última se utilizó para el diagnóstico de Ad aunque la IFAd se utilizó también para muestras de lavados oftálmicos porque se terminó el reactivo, observándose una fluorescencia verde en las células epiteliales infectadas por Ad para la IFAi y en cultivo celular (células Hep-2) con pases de 99-120, las células positivas presentaron la fluorescencia verdosa y las negativas se tiñieron de color rojo, los resultados de las muestras dieron el 94% positivas para cultivo celular y el 64% para muestras clínicas.

Existen diferentes técnicas para poder clasificar y tipificar al Ad presente en una muestra, dentro de este trabajo se utilizaron dos pruebas de tipificación viral para Ad, la primera fue la tipificación por grupo viral por la prueba de hemaglutinación de glóbulos rojos de rata y mono Rhesus al 0.8% en DGV y por digestiones enzimáticas con Hind III. En la hemaglutinaciones se detectó la presencia de los grupos B, C, D y E en ellos se encuentran tipos de Ad presentes en otros brotes de conjuntivitis en el mundo.

Antes de realizar una digestión enzimática se realizó una titulación viral, por la técnica de Efecto citopático (ECP) para conocer la cantidad aproximada de virus presente en la muestra y poder estimar la cantidad de material genético, la cantidad mínima para realizar una digestión visible en geles de agarosa es de 2mg/ml, además del título viral después de realizar la extracción de DNA por la técnica fenólica se cuantificaba el material genético obtenido con un espectro de luz ultravioleta, la cantidad reportada por el aparato fue de $1.9 \cdot 10^{-3}$ - $3.4 \cdot 10^{-2}$ mg/ml.

En los geles de agarosa al 1.2% se observó bandas que coincidían con los 23,000 pb que corresponde al peso molecular (PM) del Ad, posteriormente se realizaron las digestiones enzimáticas con Hin III y el patrón de bandas observado en geles de agarosa al 1.2% fue de cinco bandas con PM que van desde 6557 a 2027 pb; de acuerdo a estos datos y comparando con la literatura es posible que el tipo de Ad encontrado sea el Ad7 ya que es el que corresponde con los datos epidemiológicos registrados durante el brote.

Para confirmar estos resultados se necesita realizar cinco cortes con diferentes enzimas para poder definir con exactitud el tipo de Ad de las muestras, en este caso fue imposible por la poca cantidad de material genético con que se contaba siendo posible sólo un corte por muestra.

En este trabajo se muestran las bases para poder concluir la Epidemiología Molecular del brote de conjuntivitis de 1998.

INTRODUCCION

La conjuntivitis hemorrágica aguda (CHA) es un infección ocular contagiosa, caracterizada por inicio repentino con eritema, sensación de cuerpo extraño y quemadura, hinchazón de párpados y dolor, a menudo en ambos ojos y suele durar de 4 a 12 días (incluso puede acortarse a 12 hrs en el caso de infecciones por enterovirus 70), apareciendo hemorragias subconjuntivales, en forma de ptequias que se agrandan para formar equimosis, es una enfermedad autoimitante que dura hasta tres semanas^{38,41,43,46}. Las infecciones por adenovirus (Ad) pueden ser transmisibles incluso 14 días después del inicio de la enfermedad, en picornavirus el período mínimo es de 4 días⁴⁹. Las conjuntivitis se clasifican de acuerdo al agente etiológico en: Bacteriana (*Haemophilus aegypticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* entre otras...) ^{51,42}, *Chlamydia*, Viral, Alérgica e Irritativas^{46,47,49}. En el caso de las conjuntivitis virales son causada por Enterovirus 70, Coxsakie A24, B2, echovirus 7, 11 y Ad 8,19,37 principalmente aunque se han detectado casos de conjuntivitis causada por Adenovirus (Ad) 3, 7, 11, 16, 21, 5 o 4; los cuales se pueden encontrar involucrados como infecciones mixtas en brotes conjuntivales^{14,10,1}. Otros virus que también pueden estar involucrados en estas patologías son el Herpes simple tipo 1 (HSV-1) y Herpes simples tipo 2 (HSV-2) siendo el más frecuente el HSV-1 produciendo una conjuntivitis muy agresiva y puede llegar hasta la ceguera, es muy frecuente encontrarla en personas que sufren infecciones genitales por dicho virus ^{3,5,10,21,42,44,48,50,51}.

Los brotes de conjuntivitis se pueden reportar en cualquier época del año y afectar a la población en general. Desde la aparición de CHA como una enfermedad nueva en 1969 en Ghana e Indonesia, se expandió en forma epidémica en Asia, Africa, América Central y del Sur, las islas del Pacífico, México y parte de Florida (E.U) ⁴⁹. En la última década se han reportado brotes en hospitales oftalmológicos de países como Japón, Inglaterra, Alemania, Australia, Estados Unidos, Hawaii, Francia entre otros y como epidemias en Costa Rica, Nicaragua, Honduras y México, por la presencia de huracanes en dichas zonas ^{4,6,14,16,22}.

Las técnicas más utilizadas para identificar al Ad en muestras de lavados oftálmicos son: el aislamiento viral y efecto citopático (ECP) en cultivos celulares(CC) de las líneas Hep-2, HeLa, HK y VERO, haciendo al diagnóstico tardado; inhibición de la hemaglutinación (IHA) y ensayos virales de neutralización para identificación de tipos virales, la inmunofluorescencia (IFA) en sedimento para la detección viral, su éxito depende de una buena toma de muestra y si no se tiene la idea de la presencia de algún virus es muy frecuente que la muestra sea inadecuada y por lo tanto el diagnóstico sea deficiente²⁰. Actualmente se utilizan técnicas moleculares identificando segmentos característicos de cada tipo viral; entre estas técnicas se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hidridización y análisis de fragmentos de restricción (R.F). Los cortes realizados

por las enzimas de restricción son característicos de cada genoma por lo tanto el patrón de bandas que ellas generan es una forma de diferenciar con especificidad el género, la especie y/o el tipo de microorganismo presente en una muestra determinada además nos da información sobre cambios en el genoma viral que las técnicas inmunológicas no podrían evidenciar y así se podría monitorear la evolución genética del virus, viéndose reflejado en el patrón de bandas obtenido ^{10,12,13,20,23}

Las técnicas de biología molecular actualmente son muy utilizadas en el campo diagnóstico y experimental; en el diagnóstico, pueden emplearse para obtener un resultado aún antes del aislamiento del microorganismo, además son pruebas capaces de evidenciar la presencia de un patógeno cuando ya no sea viable y no pueda ser aislado en el cultivo microbiano. Dentro del ámbito experimental sirven para aportar datos relevantes sobre la evolución de un microorganismo determinado, si ha sufrido alguna modificación importante y sobre todo para identificar con gran especificidad el tipo de microorganismo presente en un tipo de brote, para la clasificación del mismo y ver su distribución mundial (epidemiología molecular). Gracias al análisis del material genético se han podido descubrir subtipos de Ad en diferentes partes del mundo, prevaleciendo en Estados Unidos los subtipos Ad8C y 8D en la costa este de dicho país²², prototipos Ad8, Ad8A y Ad8B se localizaron en Sapporo, Japón en los años de 1975 a 1981^{8,22} y Ad8C al Ad8F se encuentran en las poblaciones de Taiwan en la década de los ochenta²², en México no se conocen los tipos de Ad circulantes en la población asociados con infecciones respiratorias, o en brotes de conjuntivitis hemorrágica.

La conjuntivitis viral, por ser una entidad nosológica autolimitante, no ha recibido la atención debida, y los casos aislados de la enfermedad no son reportados, es hasta la presencia de un brote epidémico cuando cobra interés, teniendo prioridad la identificación del agente causal de la enfermedad, ya que en el país no es frecuente el reporte de infecciones oculares de origen viral.

En las conjuntivitis virales es muy importante identificar el tipo viral que se encuentra en el país, para establecer medidas epidemiológicas y las pruebas idóneas de laboratorio para su diagnóstico y se contemple el tratamiento correcto, ya que el uso de antibióticos y corticoles es inútil ^{35,36,40,41,43,50}.

Para la tipificación genética de los Ad que se presentan en los brotes de CHA se puede utilizar técnicas moleculares como el análisis de los fragmentos de DNA de Ad, usando enzimas de restricción. Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen y cortan secuencias específicas del material genético, obtenidas mayoritariamente de cepas bacterianas, el nombre de la enzima esta determinado por la primera letra del género bacteriana, en mayúscula, de donde se obtuvo la enzima, las dos siguientes letras que corresponde a la especie en

minúsculas, con número romano o letra minúscula se indica el orden en el que ha sido descubierta, en caso de existir un serotipo se indica con una cuarta letra. Los cortes realizados por las enzimas de restricción son característicos de cada genoma por lo tanto el patrón de bandas que ellas generan es una forma de diferenciar con especificidad el género, y la especie o el tipo de microorganismo presente en una muestra determinada además nos da información sobre los cambios en el genoma viral que las técnicas inmunológicas no podrían evidenciar y así se podría monitorear la evolución genética del virus, viéndose reflejado en el patrón de bandas obtenido.

Conociendo el patrón de bandas de los Ad se pueden identificar otros virus presentes en la CHA que no podrían ser diagnosticados por técnicas inmunológicas. Si logramos identificar el tipo de Ad circulante en la población así como otros posibles agentes etiológicos dentro de una infección conjuntival, obtendremos datos epidemiológicos importantes para el país y se podrá dar a conocer la etiología de la conjuntivitis hemorrágica aguda en México durante el brote de 1998, se tendrá el antecedente para casos posteriores y permitir un correcto diagnóstico, tratamiento, profilaxis y control adecuado de brotes en el futuro evitando su expansión masiva en la población.

MARCO
TEORICO
CONCEPTUAL

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

1. GENERALIDADES

1.1 HISTORIA DEL ADENOVIRUS

En la década de los 50's, Rowe y colaboradores al tratar de obtener una línea celular de adenoides, encontraron anomalías en la morfología de las células. Por su parte en 1954 el grupo de investigadores que dirigía Hilleman detectaron problemas respiratorios en reclutas que se caracterizaban por fiebre en la mayoría de los casos, descartando un problema bacteriano. Al estudiar lo que ocasionaba degeneraciones en las células epiteliales y provocaba tal sintomatología se encontró un nuevo agente viral que en 1956 se reconoció como Ad debido a su aislamiento por primera vez de las adenoides aunque fue hasta 1976 cuando el Comité Internacional de Taxonomía de virus aceptó la aparición de la familia Adenoviridae conteniendo a todos los virus con las características descritas a continuación^{5, 10, 13}.

Por microscopía electrónica se determinó que el Ad es un virus sin envoltura (desnudo) de simetría icosaédrica con 20 caras triangulares y 12 vértices, cada virión presenta 240 hexones y 12 pentones, los hexones y los pentones son un conjunto de proteínas estructurales características a cada tipo de Ad y tienen propiedades inmunogénicas, mide entre 60-90nm y tiene un genoma de DNA doble cadena (DNA2c)^{3,5,10, 13, 33, 40}.

Entre las propiedades generales de los Ad se encuentran; la estabilidad a la inactivación por calor y ácidos; resistencia a solventes de lípidos incluyendo sales biliares, lo que le confiere la capacidad de poder pasar a tracto gastrointestinal con gran facilidad; resistencia al ataque del éter, cloroformo, fluoruro de carbono e hipoclorito de sodio. La inactivación del virus se logra por el uso de desinfectantes como el cloro en soluciones al 10%, fenol, formalina en concentraciones de 1:400-1:4000. El empleo del dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.25% también llega a ocasionar la inactivación viral¹³.

Dentro de sus propiedades fisicoquímicas se encuentra la capacidad para soportar liofilizaciones sin alterar su poder de infectividad, presenta un punto isoeléctrico de 7, su punto isopícnico en relación al cloruro de sodio es de 1.71g/cm³ este dato es de utilidad para realizar purificaciones virales para la extracción de ADN o para la aplicación de microscopía electrónica, su constante de sedimentación es de 795S. Estable a pH 6 y 9.0-9.5 a 24°C y presenta su máxima estabilidad a pH ácido más que en los medios alcalinos^{13, 40}.

Triman en 1962 descubre una característica particular del Ad, su capacidad de inducir neoplasias en hámsters recién nacidos. En la actualidad el Ad se utiliza como modelo de estudios oncogénicos, en clonación, para entender los mecanismos de infección de otros virus y como vectores para la terapia génica ^{5, 10, 15, 33}.

1.2. TAXONOMIA

La familia Adenoviridae esta constituida por aproximadamente 90 tipos de Ad, los cuales están agrupados en dos géneros de acuerdo a las especies animales que afectan. los aviadenovirus incluyen a todos los Ad capaces de infectar a las aves y los mastadenovirus, que infectan a los mamíferos (simios, bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caninos, marsupiales) en los cuales se incluye al hombre. En el presente trabajo se enfoca a los mastadenovirus, todos los Ad comparten un antígeno (Ag) en común, el epitopo esta localizado en la proteína del hexón ^{10, 32, 33}.

Los criterios utilizados para la clasificación de Ad son diversos; pero el criterio que hasta la fecha se sigue aplicando es en base a la hemaglutinación que presenta ante glóbulos rojos de rata y del mono Rhesus, esta clasificación la dio inicialmente Rosen a principios de siglo, quien los dividió en tres grupos (I, II, III), para la clasificación del Ad que infecta al humano se cuenta con siete subgrupos (A-G) constituidos de 49 serotipos los cuales fueron designados en base a pruebas de neutralización con sueros específicos; esta prueba identifica a la proteína del hexon y la parte terminal de la fibra ²⁶. Actualmente con los avances en biología molecular también se pueden agrupar los Ad en base a su homología genómica, porcentaje de Guanina-Citocina (G-C) presente en su ADN, capacidad oncogénica y a la movilidad electroforética de las proteínas del virión, entre otras ^{10, 20, 21, 32}.

Otro criterio es la capacidad oncogénica que presenta con el hámster recién nacido, así el subgrupo A es altamente oncogénico y el B lo es débilmente, los Ad no oncogénicos pueden transformar células de roedores in vitro (Subgrupos C y D) ³². En la Tabla 1 se muestra la clasificación.

TABLA 1
CLASIFICACIÓN DEL ADENOVIRUS^{18,33}

Grupo	Subgrupo	Tipos	Homología %DNA G-C	Potencial Oncogenico	Transformación en cultivo celular	PM del Polipéptido Mayor Interno Proteínas cápsidicas			Tejido que afecta
						V	VI	VII	
IV	A	12,18,31	47-49	alto	+	51-51.5	25.5-25	17.5-18	Gastrointestinal
I	B	3,7,11,14, 16,21,34,35	51	moderado	+	53.5- 54.5	24	17.8-18	Faringe Pulmón Conjuntiva A. Respiratorio
III	C	1,2,5,6	57-59	bajo negativo	+	48.5	24	18.5	Tracto Respiratorio
II	D	8-10, 13, 15 17,19,20,- 22-30,32,33 36-39,42-47	57-61	bajo o negativo	+	50-50.5	23.2	18.2	Ojos
III	E	4	57-61	bajo negativo	+	48	24.5	18	Tracto respiratorio
III	F	40,41	57-59	No se sabe	+	46	25.5	17.2	Gastrointestinal

1.3 MORFOLOGÍA VIRAL.

El Ad mide entre 60 y 90 nm de diámetro, presenta una simetría icosaédrica, con 20 caras triangulares, 12 vértices y 252 capsómeros. Cada virión consta de 240 hexones y 12 pentones. Las partículas virales presentan en su composición el 13% de su material genético que es de ADN de doble cadena (ADN2c) y el 87% en proteínas.

Cada pentón contiene una base que forma parte de la superficie de la cápside y las proyecciones denominadas fibras dan las características de los diferentes serotipos. La cápside básicamente está formada por 11 proteínas que fueron identificadas por electroforesis de geles de agarosa en la época de los 80's la Tabla 2 menciona las proteínas así como su función dentro de la estructura viral y en la figura 1 se muestra la distribución de los componentes.

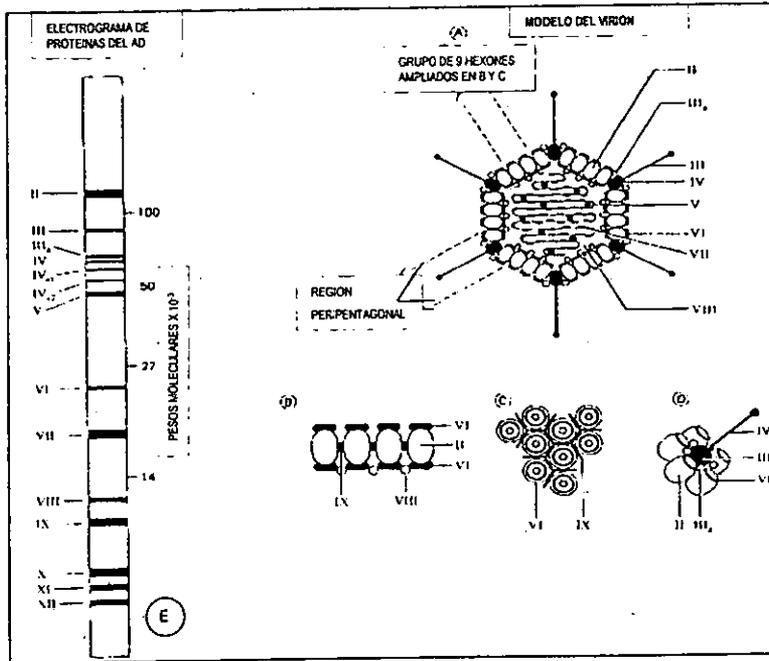


Fig. 1. ESTRUCTURA DEL ADENOVIRUS. A la derecha ; una electroforesis de separación de proteínas del virión, los moelos morfologicos del Ad. A) Se observan la morfología espacial del Ad, los números romanos indican los polipéptidos virales, los cuales se describen con mayor detalle en la tabla 2 del presente trabajo. B) Una sección vertical de un grupo de nueve hexones que muestran una localización tentativa de las proteínas VI, VIII y IX. C) Vista horizontal de la parte externa de un grupo de nueve hexones y una localización tentativa de las proteínas VI y IX. D) Amplificación de una region peripentonal que muestra a las protinas II, III, IIIa, IV y VI. E) Electrograma de las proteínas del virion que su localización se mestran en el fig.1. A.

TABLA 2
PROTEINAS CONSTITUYENTES DEL CAPSOMERO
DEL ADENOVIRUS ^{10, 40, 54}

NOMBRE	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN	Cant. aminoácido	Observaciones
II	Monómero del hexón	Estructural	967	Tipo específico familia
III	Base del pentón	Penetración	571	Tóxica para la célula
IIIa	Asociado base del pentón	Penetración	566	Ag tipo específico
IV	Fibra	Receptor	582	
V	Pentón de la base	Empaquetamiento tipo histona	368	
M	Core	Empaquetamiento DNA	19	
VI	Polipéptido menor del hexón	Estabilización Estructural	217	
VII	Core	Tipo Histona	174	Rica en Arginina
VIII	Polipéptido menor del hexón	Estabilización Estructural	134	
IX	Polipéptido menor del hexón	Estabilización Estructural	139	Proteína temprana
TP	Porción final del genoma	Replicación	671	

1.4 GENÉTICA VIRAL

La molécula de ADN_{2c} del Ad es de estructura lineal, no segmentado de PM de 23,000 kb. El genoma presenta características propias:

- Contiene aproximadamente 100pb que se repiten en orientación invertida en cada extremo del genoma.
- Cada cadena esta unida covalentemente en el extremo 5' con la proteína TP.
- Presentan genes agrupados con funciones relacionadas y son aquellas cuyos productos:
 - a) Interactúan con el Sistema inmune del hospedero.
 - b) Participan en sucesos posteriores a la transcripción en la expresión genética.
 - c) Son esenciales para la replicación del ADN.
 - d) Son componentes de viriones o están involucrados en su montaje ¹⁰
 - e)

Morfológicamente el genoma está organizado por una proteína llamada *core*, haciéndolo compacto cuando no se esta replicando para así protegerlo del ataque de enzimas como las DNAsas y su degradación, durante el proceso infeccioso le confiere la propiedad de una estructura relajada en la fase de replicación temprana ¹⁰.

Durante el proceso de transcripción, en sus inicios el core queda relajado permitiendo la transcripción de la porción final del cromosoma conduciendo a la apertura total del core, para así iniciar la transcripción de la unidad de replicación dentro del genoma que permiten la producción de las nuevas proteínas virales ^{10, 33}.

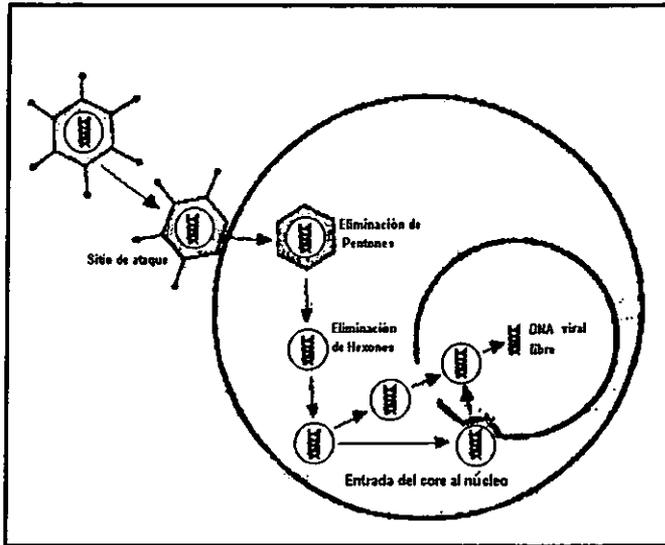
En el genoma se encuentra la información necesaria para poder elaborar sus proteínas. El genoma consta de dos regiones de replicación además de una secuencia de empaquetamiento cis localizada en las partes finales del cromosoma viral lo cual ayuda a la interacción del ADN con sus proteínas de empaquetamiento. La composición de la secuencia genómica es la siguiente ^{5, 10, 54}:

- ◆ 5 unidades de transcripción temprana:
 - E1A. Codifica para dos proteínas que activan la transcripción e induce a la célula a entrar en periodo S del ciclo celular.
 - E1B. Contiene la información para la elaboración de dos proteínas, colaboran con los productos de E1A para inducir a la célula a que crezca.
 - E2. Codifica para tres proteínas diferentes, intervienen directamente en la replicación del ADN.
 - E3. Sus productos modelan la respuesta de la célula infectada ante la infección por Ad y la familia de los RNAm participan en la producción y ensamblaje de los componentes de la cápside.
 - E4. Los productos obtenidos ayudan a la regulación y transporte del RNAm y a la replicación del ADN.
- ◆ 2 unidades de transcripción retardada temprana 1X y 1Va2
- ◆ 1 unidad tardía de transcripción, generando dos familias de ARNm (L1 - L5) ¹⁰.

Existe una característica particular del Ad con respecto a sus propiedades oncogénicas que lo diferencian de otros virus, la composición entre un 48% a un 58% en los contenidos de G+C en su secuencia, se ha observado que a mayores porciones de GC/AT, mayor es su poder oncogénico ³².

1.5. CICLO DE REPLICACIÓN del ADENOVIRUS

La replicación del Ad se divide en temprana y tardía, esto de acuerdo al orden de expresión del ADNv. (Fig. 2)

Fig. 2 Ciclo de replicación ⁵⁴**FASE TEMPRANA**

En la adsorción, se lleva a cabo el reconocimiento de las proteínas de la fibra viral y los heterodímeros celulares $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ pertenecientes a la familia de las integrinas ¹⁰, localizados en la membrana plasmática, las proteínas de la base del pentón y las secuencias de aminoácidos de las cadenas de las proteínas de la fibra varían entre los serotipos; lo cual hace selectivos los sitios donde va a infectar un determinado serotipo. El complejo formado por las integrinas y las proteínas del pentón es la señal para iniciar la **PENETRACIÓN** por fagocitosis, trayendo como consecuencia la formación de una vacuola de degradación proteica teniendo como finalidad dejar libre al genoma viral. Una vez liberado el ADNv entra al núcleo celular a través de poros; el genoma del Ad se acompleja con histonas celulares para dar inicio a la transcripción de genes tempranos denominados así por ser los primeros en expresarse durante la replicación viral, aquí se activan los genes E1A para desencadenar la expresión de los genes restantes que contienen la información que codifica las proteínas de la cápside e iniciar la producción de nuevas cadenas de ADNv para las nuevas partículas por formarse ^{3, 5, 10, 15, 54}.

FASE TARDÍA

La infección interfiere en la expresión de los genes del hospedero impidiendo la acumulación de RNAm celular en el citoplasma trayendo como consecuencia la baja de la síntesis de proteínas celulares. Durante toda esta fase se está llevando a la par la síntesis de ADNv y la síntesis de las proteínas que componen a la partícula viral y las proteínas necesarias para el montaje de los nuevos viriones^{10, 15, 54}.

El **ENSAMBLAJE** se inicia cuando existe suficiente cantidad de proteínas capsídicas en el citoplasma celular. Se montan primeramente tres cadenas polipeptídicas en los capsómeros de hexones y pentones, los pentómeros se ensamblan de forma espontánea y los hexones requieren de proteínas de ensamblaje (proteínas de andamio) que ya no aparecen en las partículas maduras; posteriormente la estructura ya montada se llena de ADNv y por último los pentones se asocian a la cápside y por procesos proteolíticos se convierte toda la estructura en una partícula madura. Los viriones ya formados se van acumulando en el citoplasma hasta ser son liberados debido a la autólisis celular o por la destrucción de la célula por el sistema inmune^{10, 15, 54}.

1.6. PATOLOGÍA.

El Ad presenta características particulares, se han observado ciertos serotipos capaces de ocasionar alteraciones en diferentes órganos al mismo tiempo por ejemplo el Ad8, Ad19 y Ad37¹⁰ pueden llegar a ocasionar daño tanto en el tracto urinario como en la conjuntiva, este fenómeno no es común para todos los tipos de Ad ya que solo algunos de ellos son capaces de presentar tropismo. El tiempo de latencia viral es otro aspecto poco visto y presenta prevalencia en las células del hospedero hasta de 24 meses^{10,40}.

El virus puede estar presente en infecciones múltiples ya sea de tracto respiratorio y ojos, siendo estas últimas las más comunes, además de ocasionar alteraciones en tracto gastrointestinal, hígado, vejiga urinaria, poco frecuente en el páncreas y en el sistema nervioso central (SNC) aunque la presencia en dichos órganos es consecuencia de infecciones en vías respiratorias. En la tabla 3 se muestran las enfermedades más frecuentes causadas por los diferentes tipos de Ad.

TABLA 3
ENFERMEDADES CAUSADAS POR ADENOVIRUS ^{3, 6, 10}

PATOLOGÍA	POBLACIÓN DE ALTO RIESGO	SEROTIPOS
Faringitis febril aguda	Infantes	1-3, 5-7
Fiebre faringo conjuntival	Infantes	3,7,14
Desordenes respiratorios agudos	Reclutas	3,4,7, 14,21
Pneumonías	Infantes	1-3, 7
Neumonías	Reclutas militares	9,11,19,37
Epidemia Keratoconjuntivitis	Población en general	8,19,37
Síndrome parecido a Pertusi	Infantes	11,21
Cistitis hemorrágica aguda	Infantes	40,41
Gastroenteritis	Infantes	1,2,5
Hepatitis	Infantes y transplantados	34,35
Tracto urinario	AIDS, Inmunosuprimidos	

Las **Infecciones Oculares** de origen viral son muy frecuentes, el período de incubación para el Ad es de 6 - 9 días, aunque se han reportado casos en que aparece repentinamente en dos días después de la infección. Se le conoce también con el nombre de conjuntivitis de las albercas (atribuido a la forma de contagio, ya que es típica la adquisición de la enfermedad en albercas por contacto directo), para este caso existe una gran diversidad de tipos de Ad los cuales pueden ocasionar conjuntivitis siendo los más comunes los enlistados en la Tabla 3. Después del período de incubación la conjuntivitis se caracteriza por edema en párpados, dolor retroocular, lagrimeo y fotofobia, frecuentemente es unilateral con linfadenitis preauricular que acaba drenando generalmente ^{6, 10, 41, 43, 50, 51}.

Existe una variante de la conjuntivitis mencionada anteriormente y es la **fiebre faringo conjuntival** este tipo de conjuntivitis es conocida también como enfermedad de las albercas, a diferencia de la anterior esta patología presenta cuadros febriles y puede llegar a ocasionar malestar general como dolores musculares y articulares y se puede presentar uní o bilateralmente. Un caso mucho menos frecuente es la meningitis por Ad, la presencia del virus puede deberse a tratamientos de quimioterapia, con inmunosupresores, esto en pacientes que presentaron linfomas malignos, y por complicaciones de infecciones virales de Ad. Esta alteración al igual que la anterior es poco frecuente ¹⁰.

Se ha observado el tiempo de latencia viral es hasta de 24 meses después del inicio de la infección, aun se desconocen los mecanismos por los cuales el Ad puede estar tanto tiempo presente en el organismo. El tiempo de latencia es mas importante en casos de desordenes obstructivos pulmonares, son frecuentes en población de fumadores y pudiendose manifestar nuevamente ^{4,10}.

1.7. EPIDEMIOLOGÍA DE CONJUNTIVITIS HEMORRAGICA

El estudio epidemiológico es importante ya que afecta a la población en general y no presenta estacionalidad, su contagio es de persona a persona, uso de utensilios contaminados, aerosoles etc., Se puede presentar un aumento de casos en periodos vacacionales pues es muy fácil de contraerse en albercas y por ello se presenta más frecuentemente en personas que realizan deportes acuáticos . Debido a su vía de transmisión es posible observar con mayor frecuencia casos de conjuntivitis en hospitales donde se realizan servicios oftálmicos a la población, guarderías, campamentos y refugios. Cabe mencionar que la conjuntivitis causada por el Ad es la más contagiosa y severa, los tipos que se han reportado como agentes etiológicos más frecuentes son el 8, 19 y 37 ^{3, 5, 10, 20, 21}.

Los países con brotes de conjuntivitis más frecuentemente son Estados Unidos, Arabia Saudita, Israel, Alemania, Inglaterra, entre los más importantes ^{10, 14, 18}.

Los primeros casos de EKC (Epidemic keratoconjuntivitis) fueron descritos en 1880's por oftalmólogos australianos. En 1941 se presentan más de 10,000 casos en Pearl Harbor, Hawaii y en la costa este y oeste de Estados Unidos, el brote duro un año por lo que Hyogan y Crawford le dieron el termino de EKC, en 1955 se descubre el agente causal de los brotes presentados en épocas anteriores son el Ad8 ubicado en la población de Estados Unidos y principalmente en su costa Este. Los estudios epidemiológicos determinaron los tipos de Ad's presentes y además del Ad8 se encontraron los tipos Ad19 y Ad37 siendo el más frecuente el primero En casos esporádicos se han encontrado otros tipos de Ad como 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15 y 29 pero sus aislamientos son muy raros. En décadas recientes se han reportado brotes de este tipo de conjuntivitis en Gran Bretaña a inicios de 1998 el tipo principal fue el Ad37 Los Ad's encontrados en Estados Unidos son variables ya que en la parte este de la costa se encuentra el Ad8 y Ad19 siendo el último el más frecuente en la década de los 80's al igual que en Canadá; Francia e Inglaterra presentaron preferentemente el Ad8 en sus brotes de los años 90's ^{8, 10, 11, 14}.

18

Mediante el uso de enzimas de restricción, surge desde la década anterior el concepto de **Epidemiología Molecular**, se han podido detectar subtipos de Ad, en la década de los 70's y principios de los 80's se sabia que el Ad causaba epidemia keratoconjuntival (EKC) era el Ad8 preferentemente, posteriormente se descubre el Ad19 y Ad37 en este orden de aparición siendo el Ad37 más frecuentemente encontrado en Europa y Estados Unidos. Subtipos virales que han causado epidemias en Francia y Gran Bretaña de Ad8 son: Ad8/D, D8, D4 y D1 presentándose en el periodo de diciembre 1983 a Mayo de 1988 . El Ad8 es el que se estudia mas intensamente

ya que la mayoría de las epidemias han sido ocasionadas por dicho tipo viral. En la década de los 80's en Francia e Inglaterra se detectaron diferentes variantes de AD8 gracias a las enzimas de restricción y se encontraron cuatro subtipos virales (Ad8D7, D8, D9 D10), la aparición de cada subtipo corresponde cronológicamente al brote que causaron en los años de 1983/1984, 1984, 1987 y 1988 ^{6,8, 11, 14,16,17,25, 29}.

1.8. DIAGNOSTICO.

Las muestras utilizadas en el diagnóstico y/o aislamiento de Ad es variable, esto debido a los múltiples tropismos que presenta el Ad, el sitio de toma de muestra depende del cuadro clínico del paciente, además para el éxito de la identificación viral es importante una buena toma de muestra y obtenerla en el tiempo adecuado.

Una vez obtenida la muestra se puede utilizar para dos fines diferentes uno el diagnóstico viral y otro el aislamiento del virus. El aislamiento se realiza en CC, las líneas más utilizadas son: HEK(Células embrionarias humanas), REH (Células de riñón embrionario humano), HeLa (Carcinoma de cervix humano), Hep-2 (carcinoma de laringe humana) y VERO (células de riñón de mono verde) ^{12, 20}.

Una vez aislado el virus se pueden realizar diversas pruebas con la finalidad de tipificar al virus o simplemente de comprobar su presencia con fines de diagnóstico y/o investigación (Tabla 4).

TABLA 4
PRUEBAS DIAGNÓSTICAS
DE ADENOVIRUS. ^{3, 5, 20, 13, 19, 20, 23, 27}

PRUEBA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Inmunofluorescencia (IFA)	Rápida	Tipificación general no existe el Ac anti tipo, solo el Ad8 de forma comercial
ELISA	Específica	Laboriosa
Neutralización Hemaglutinación Inhibición de la Hemaglutinación	Pueden detectar Ac circulantes, permiten la tipificación viral.	Dan reacciones cruzadas y no permiten detectar recombinaciones virales.
Fijación de complemento Aglutinación en látex	Pueden detectar tanto Ag como Ac circulante	Ya no se utiliza
Hibridación (RFLP) Dot-blot	Específica para llevar acabo la tipificación, detecta recombinaciones y cambios genéticos virales, se utiliza en investigación en Epidemiología molecular.	Costosa, no existen todavía la secuenciación completa de todos los Ad para realizar sondas altamente específicas de todos los tipos virales.
Microscopia electrónica	Prueba directa, rápida y específica, se aplica para muestras fecales.	Costosa, no se puede utilizar de rutina para el Dx.
Tinción por giemsa	General, detecta cuerpos de inclusión y por ello es muy inespecífica, pero es capaz de detectar células infectadas.	Ya no se utiliza

1.9 TERAPIA Y PROFILAXIS.

En realidad no existe en el mercado un medicamento eficaz contra infecciones causadas por Ad; la herramienta utilizada como forma de prevención es la vacunación y solamente se aplica a reclutas que los protege del Ad7. Para el caso de conjuntivitis no existe un tratamiento eficaz, lo más recomendable es la utilización de cloranfenicol para prevenir infecciones posteriores de tipo bacteriano y la aplicación de enjuagues de agua de manzanilla con la finalidad de tener al ojo hidratado, la infección causada por Ad es autolimitante y por ello se aplica lo mencionado anteriormente como apoyo a la recuperación. Otra opción es recetar trifluorotimidina en gotas aplicandose de 4 o 5 veces al día y 3-4 días después de haber desaparecidos los síntomas. La literatura maneja el uso de antivirales como el aciclovir prescrito específicamente para el caso de herpes simples. Datos recientes proponen el uso de inhibidores de proteasas como una alternativa para la elaboración de un principio activo nuevo pero esto aun esta en proceso de investigación. ^{10, 37, 41, 46, 47.}

La mejor estrategia para controlar la diseminación de la enfermedad, es la prevención, evitando los contagios masivos y con ello la aparición de brotes, evitando el uso de objetos de personas infectadas, aislamiento de personas enfermas y así controlar la diseminación viral ^{36,42, 43, 45, 46.}

CAPITULO II

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS:

La digestión del DNAv con diferentes enzimas de restricción originará un patrón electroforético útil para la identificación del tipo de adenovirus presente en las muestras clínicas de pacientes con conjuntivitis hemorrágica.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVO GENERAL:

Tipificar adenovirus aislados de muestras clínicas de pacientes que presentaron conjuntivitis hemorrágica.

2.2.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

2.2.2.1. Aislar los adenovirus provenientes de muestras clínicas diagnosticadas previamente como positivas para Ad, en la República Mexicana en 1998 con casos de conjuntivitis.

2.2.2.2. Propagar el adenovirus en la línea celular Hep-2.

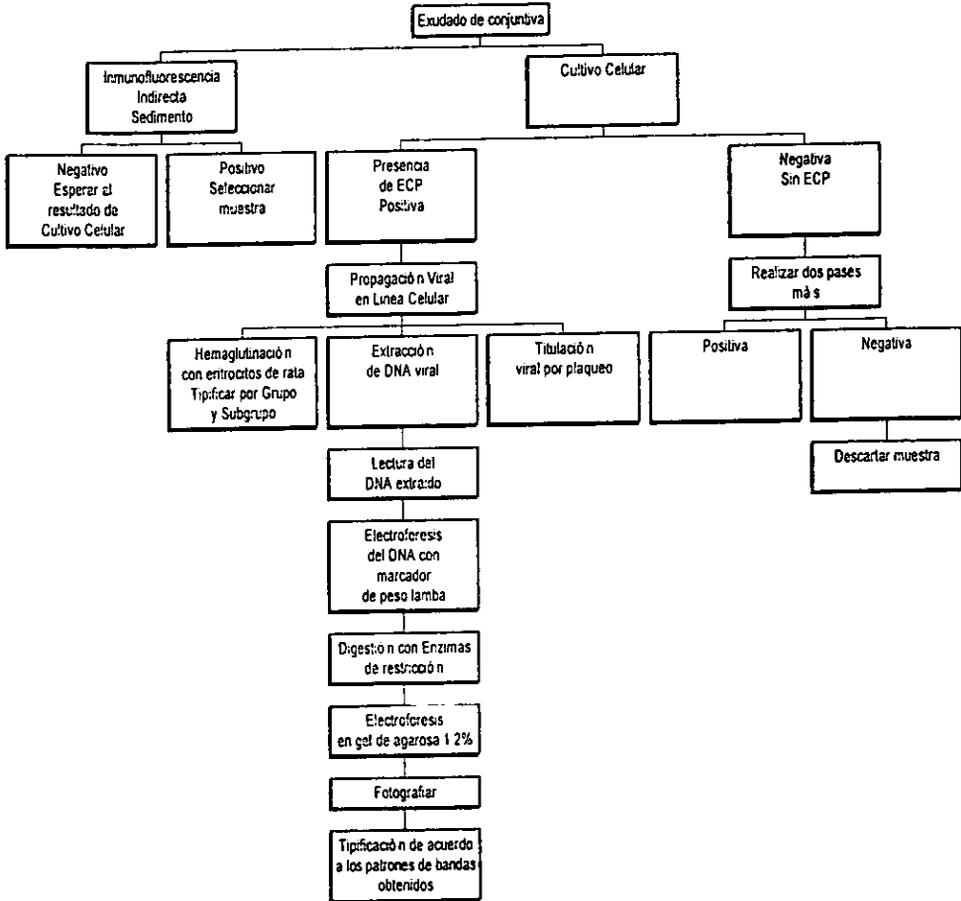
2.2.2.3. Realizar la titulación viral de la muestra propagada.

2.2.2.4. Tipificar a los Adenovirus aislados.

2.2.2.4.1 Tipificar por grupo de Adenovirus.

2.2.2.4.2 Tipificar por tipo.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA TIPIFICACION DE ADENOVIRUS



MATERIAL
Y
METODOS

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

3.1 DELIMITACIÓN DEL LOTE

Se seleccionaron 25 muestras positivas por cualquiera de las pruebas diagnósticas: 17 muestras por IFAd en las células epiteliales del paciente, 8 muestras positivas en cultivo celular replicadas en línea VERO de primer pase, llevadas a cabo en el Laboratorio de IRA's virales del INDRE de acuerdo al protocolo de tratamiento de muestra de exudados de conjuntiva provenientes de diferentes estados de la República Mexicana donde se presentaron brotes de conjuntivitis.

3.2 INMUNOFLOURESCENCIA DIRECTA

La IFA es una técnica inmunológica basada en la reacción Ag-Ac, en el paso inicial de la reacción se utiliza un Ac monoclonal anti hexón, marcado con un fluorocromo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), al ser observado al microscopio de fluorescencia se hace evidente la presencia del Ag reconocido, si existe unión Ag-Ac se presenta al microscopio una fluorescencia verde como resultado del contacto con la luz ultravioleta (U.V) y la muestra pues el FITC da un espectro de fluorescencia en los 525nm de emisión y 495nm de excitación.; se seleccionaron las muestras positivas y se siguió con la metodología para su tipificación³.

3.3. PROPAGACION VIRAL

Se utilizó la línea celular Hep-2 por su mayor susceptibilidad y fácil permisibilidad al ataque del Ad lo cual facilitó la observación del ECP. Posteriormente se confirmó la presencia viral por el ensayo de IFAd y poder ser seleccionadas para la tipificación^{10,12}.

En la propagación se utilizaron cajas para cultivo celular Corning de 75cm² con un 90% de confluencia, la inoculación se realizó de acuerdo a lo siguiente:

Una vez comprobada la presencia de Adenovirus en cultivo celular:

1. La muestra se almacena a -70°C y posteriormente se descongela. Tratando de romper las células para liberar la mayor cantidad de partículas virales.
2. Se centrifuga la muestra a 300 g 10min. para obtener en el sobrenadante las partículas virales y en el sedimento los restos celulares.
3. Se retira el medio de la caja que se va a inocular (por decantación del lado contrario a donde se encuentra la monocapa).
4. Se inocula 1ml del sobrenadante de la muestra. Se dejó una caja testigo como referencia para comparar al momento de realizar las lecturas. La caja inoculada se incubó 1hr a 37°C.
5. En la campana de flujo laminar se adicionó 1ml de medio de mantenimiento por cada caja inoculada.

Se revisaron las cajas diariamente hasta observar ECP típico de Ad, que son células redondas y gigantes, dentro de la monocapa celular. Los grados de ECP son los siguientes:²³

- * 1+ Equivalente al 25% o menos de células infectadas.
- * 2+ Equivalente al 25%-50% de células infectadas.
- * 3+ Equivalente al 50%-75% de células infectadas.
- * 4+ Equivalente al 75% al 100% de células infectadas .

Una vez observado un ECP del tipo 4+ se cosecho la muestra, de la siguiente manera: se retiro el contenido de la caja con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril y se deposito en dos tubos estériles, se rotularon hasta su uso, uno de ellos se utilizó para realizar la prueba de IFAd y el otro tubo para la extracción de DNAv. En caso de una prueba negativa, se realizó nuevamente la metodología anterior.

3.4. TITULACION VIRAL

3.4.1. Conteo celular: Para realizar la prueba se debe de conocer la cantidad de células por pozo. La técnica de conteo celular consiste primeramente en tomar una alícuota (100 µl) de células Hep-2 se obtienen de una caja de 75cm² tripsinizada y centrifugada a 300 g durante 10min, se resuspende el paquete celular obtenido en 2ml de CMEM, de ahí se toman 100 µl y se hace una dilución 1:10 con medio mínimo esencial complementado (CMEM) , la cual será teñida con 1 gota de azul de tripan. Se llena la cámara de Neubauer con la muestra anterior, la lectura al microscopio se realiza en las cuatro cuadrículas destinadas para conteo de glóbulos blancos, la cantidad total de células se calcula de la forma siguiente³:

Promedio de cél. contadas X 10,000X Factor de dilución

$$33 \text{ cél} \times 10,000 \times 10 = 3.3 \times 10^6 \text{ cél/ml}$$

3.4.2. Titulación viral por la formación de ECP: Con la finalidad de corroborar la carga viral en la muestra a utilizarse, se realiza la titulación viral mediante la técnica de formación de placas líticas, para conocer la cantidad viral en la muestra y así poder realizar la extracción de DNA²³.

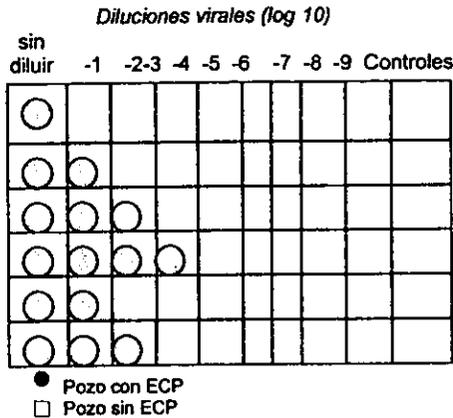
1. Sembrar placas de 96 pozos con una cantidad de 3.3×10^6 cél/ml de Hep-2 por pozo.
2. Preparar una serie de diluciones dobles de 1:10 (100 µl (del virus a ser titulado) + 900 µl de CMEM) 1:10¹⁰.
3. Remover el medio de las placas de células Hep-2 con 100% de confluencia y se inoculan 6 pozos con 25 µl de cada dilución, en los primeros pozos se inoculo, con muestra sin diluir para tener así nuestro control positivo y los últimos pozos de la placa no se inocularon siendo los controles negativos de la prueba.
4. Incubar las placas 1hr a 37°C.

5. Adicionar a todas las placas 100 µl de CMEM de mantenimiento.
6. Incubar las placas a 37°C por 7 días revisando diariamente las placas para observar la aparición de ECP. 4+.
7. Registrar el número de pozos positivos por dilución (Fig. 3).
8. Calcular el titulo viral de la muestra utilizando la formula de Reed-Muench ^{3, 23}.

$$TCID_{50} = \text{Dilución donde ECP} > 50\% + \frac{(\% \text{positivos arriba del } 50\%) - 50\%}{(\% \text{positivos arriba de } 50\%) - (\% \text{positivos debajo de } 50\%)} \times \log 10^{10}$$

$$TCID_{50} = 5 + \frac{66.66 - 50\%}{66.66 - 33.33} \times \log 10^{10} = 10^{8.32}$$

FIGURA 3. ESQUEMA DE DILUCIONES ²³



3.5. PRUEBAS DE TIPIFICACION

3.5.1 HEMAGLUTINACION.

La fibra del Ad tiene la capacidad de hemaglutinar eritrocitos de mono y rata, lo cual se puede utilizar para su tipificación, los eritrocitos de rata aglutinan completamente con los Ad del grupo D donde se encuentran los tipos Ad8, Ad19 y Ad37 causales de la EKC y el grupo B hemaglutinan los eritrocitos de mono, Ad 3,7,11,14 causales de CHA. La fibra se une con los fosfolípidos de la membrana del glóbulo rojo formando una especie de malla que se puede evidenciándose en el fondo de la placa, pero si no se observa la presencia de un botón el resultado será negativo ^{5, 23}. La técnica se lleva a cabo de la siguiente forma:

- ♦ Dividir la placa utilizando los primeros seis pozos para una muestra y los segundos seis pozos para otra muestra (se realizo por duplicado).
- ♦ En el primer pozo colocar 50 µl de la muestra.
- ♦ Del segundo al sexto pozo colocar 25 µl de solución DGV (gelatina- dextrosa- veronal).
- ♦ Realizar diluciones pasando 25 µl del primer pozo hasta el sexto pozo (diluciones dobles).

FIGURA 5.

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION

50 µl 25 µl de muestra
 muestra + 25 DGV

●														
○	MUESTRA NUMERO													
○														
○	MUESTRA NUMERO 2													
○														
○	MUESTRA NUMERO 3													

- HA COMPLETA
- HA INCOMPLETA
- NO HA

Hechas las diluciones, se agregan 25 µl de glóbulos rojos de rata al 0.8 % en DGV, se incuban 1hr a 37°C y se comparan los resultados con la siguiente tabla 5.

TABLA 5
TIPIFICACIÓN POR HEMAGLUTINACION ^{10, 20}

GRUPO	SUBGRUPO	HA rata	HA mono
A	IV	-	-
B	I	-	+
C	III	-	+/-
D	II	+	-
E*	III	+/-	-
F*	III	+/-	-

* Estos dos grupos no se pueden distinguir por pruebas de HA pues causan enfermedades gastrointestinales y presentan otro tipo de características morfológicas que los hacen diferentes a todos los demás grupos de Ad.

3.5.2. TIPIFICACION POR ENZIMAS DE RESTRICCION

3.5.2.1 EXTRACCIÓN DE DNA VIRAL:

- ◊ Observar el ECP 4+ en la monocapa de células Hep-2, se cosecharon las células por pipeteo continuo junto con el medio de mantenimiento y se recolectan, la muestra fue sometida a cuatro ciclos de descongelación a -70°C, con la finalidad de romper las células y dejar a las partículas virales libres en el sobrenadante.
- ◊ Centrifugar la muestra a 300 g por 10min.
- ◊ Tomar alícuotas de 500µl de sobrenadante para ser extraídos (mínimo 4 tubos ependorff por muestra)
- ◊ Adicionar RNAsa libre de DNAsa (Boehringer Mannheim) en una concentración final de 0.1 mg/ml y se incubo a 37°C por 30 min.
- ◊ Una vez obtenido el DNAv, hacer la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm, para conocer la concentración y la pureza, se elaboro un gel de agarosa al 1.2% para comprobar que se trata del material genético viral, poniendo la muestra y un marcador del PM, el utilizado es un bacteriófago lambda con un patrón de bandas en base a la enzima de restricción Hind III.

3.5.2.2. ELECTROFORESIS.

- 1.- Prepar 250 ml de amortiguador TBE (Tris-Boratos-EDTA) 1X .
- 2.- Pesar 0.36 gramos de agarosa (1.2%) y se disuelven en 30 ml del amortiguador anterior. Calentando en el horno de microondas en power 1:30 min.
- 3.- Agregar bromuro de etidio (10mg/ml) y se vacía en la placa de la cámara minisub.
- 4.- Mezclar 3 ml de muestra con 2 ml de azul de bromofenol y se cargo el gel.
- 5.- Correr el gel a 120 volts por 30min (hasta que el primer colorante este a 1cm de salir del gel)
- 6.- Revelar el gel corrido anteriormente con la ayuda de U V.

3.5.2.3 DIGESTIONES ENZIMATICAS

La enzima que se utilizó para elaborar las digestiones enzimáticas sobre el ADN del Ad fue la Hind III (*Haemophilus influenza*) de los laboratorios Promega, la cual corta en los sitios:



Colocar aproximadamente 5 μ l de DNAv. en un tubo ependorff de 0.8 ml, adicionando previamente las cantidades de amortiguador Hind III 1 μ l y agua destilada estéril 12 μ l. Se deja incubar por 1 hr toda la mezcla de reacción deteniendo la digestión enzimática agregando 1ml de EDTA 1M pH 8, y se procede a la elaboración de la electroforesis de acuerdo al protocolo descrito en el punto 3.3.5.2.2. Los patrones obtenidos son comparados con los pesos moleculares reportados en diferentes literaturas mencionados en la tabla 6.

Tabla 6. Fragmentos de restricción con Hind III de Adenovirus^{6, 17, 18}

Ad 8.	Ad8C	Ad8D	Ad10	Ad19	Ad19A	Ad37
4.34	3.65	5.22	8.4	8.4	8.4	8.4
3.95	3.07	4.74	5.75	5.75	5.75	5.75
3.19	2.56	4.23	4.86	4.34	4.34	4.34
2.15	2.28	3.07	4.34	2.15	2.15	2.49
1.55	2.1	1.59	1.35	1.35	1.35	2.15
1.44	1.44	1.50	1.10	1.10	1.10	1.35
1.01	1.06	1.44				1.10
0.95	0.99	1.06				
0.75	0.50	0.99				
		0.7				

RESULTADOS

CAPITULO IV RESULTADOS

4.1. IDENTIFICACION DE ADENOVIRUS.

De 25 muestras seleccionadas por IFAd en células epiteliales, se obtuvieron 64% de positividad (16/25). Al total de muestras se les realizó CC para obtener el aislamiento de los virus, los resultados muestran un 94% de positividad (23/25) a la prueba de IFAd en cultivo celular Hep-2 (Fig. 5).

En la figura 6 se observa el ECP del Ad como células redondas en células Hep-2 que no presentaron agregación celular, el tiempo promedio en el cual se observó la presencia del ECP 4+ fue de 24-48 hrs. El desprendimiento de la monocapa era evidente, lo cual indicaba que la muestra podía ser cosechada, para realizar las pruebas de IFAd para células de CC y HA.

Una vez comprobada la presencia del Ad en la muestra se realiza la titulación viral, obteniendo un título de mínimo de $10^{6.32}$ y un máximo de $10^{7.5}$ TCID₅₀ (cálculo obtenido de la fórmula reportada en la sección de metodología), dentro de la bibliografía se establecen títulos de 10^4 - 10^7 TCID₅₀ en células HEK a los 14 días ¹⁷.

4.2. TIPIFICACIÓN

4.2.1. Los resultados obtenidos en la tipificación por grupo y subgrupo obtenidos de la prueba de hemaglutinación se resumen en la tabla 7 .

TABLA 7 RESULTADOS GENERALES

ESTADO	GRUPO	SUBGRUPO
Chiapas	II	B D
Hidalgo	II	D
Jalisco	II	D
México	III	C E
Nayarit	II	D
Nuevo León	II	D
Oaxaca	II	B C D E
Pueblas	II	D
Querétaro	II	D
Tamaulipas	II	B C D E
Veracruz	II	D

En los resultados anteriores se obtuvieron grupos que se descartan por ser agentes etiologicos de infecciones en tracto respiratorio (grupo A) o que son característicos de otras patologías como son el caso de transplantes o como agentes causales de enfermedades entéricas (grupo F), los demás grupos reportados son los posibles grupos involucrados como agentes causales de conjuntivitis adenovírica reportados hasta la fecha.

4.2.2 Para obtener un buen patron de digestión enzimática se recomienda en la literatura manejar de 3 a 5 mg de DNA para cada digestión. Con la técnica utilizada se obtenía 2ml de muestra con una concentración de DNAv de 1.9 a 34.1 mg/ml (1.9×10^{-3} - 3.41×10^{-2} mg/ml) con una pureza del 62 al 80%, para poder corroborar la cantidad de DNA presente se elaboró un gel donde la intensidad de la banda obtenida es proporcional a la concentración de la muestra^{1,17}.

El PM del DNA del adenovirus se sitúa en el rango de 23,000 pb (Fig. 9). Esta banda está sólo en las extracciones de las muestras inoculadas y que dieron positivas para las pruebas descritas anteriormente, el DNA celular se ubica en la parte superior del gel cercano al origen ya que por ser un DNA de alto peso molecular no puede migrar (Fig 10) tan fácilmente, por eso se puede confirmar la presencia del virus ya que el peso de la banda corresponde al reportado en la literatura que es de 23,000 pb^{5, 10, 15, 32, 39, 51, 53}. En ocho de las 25 muestras totales se omitió el uso de RNAsa por la falta de dicho reactivo, pero se siguió elaborando la extracción con forme al protocolo ya establecido, en esas ocho muestras se encontraron dos que presentan una banda bien definida localizada en el rango de 6557 a 9416 pb (Fig. 11), el peso molecular de esas bandas es similar al descrito para el material genético de los virus pertenecientes a la familia de los picomavirus como los enterovirus 70, coxsakie y echovirus¹, el PM de los materiales genéticos de los enterovirus es de 7400 pb, que pueden ser agentes causales de conjuntivitis

hemorrágica y pueden presentarse en conjunto con el adenovirus en tal patología. La presencia simultánea de los dos virus se observa en la Fig. 15 donde se aprecian dos bandas una de 23,000 pb y otra de aproximadamente 7000 pb, la banda de 23,000 pb que correspondería al Ad se muestra muy tenue, con ello se puede intuir que hay muy poca cantidad de DNA del Ad y el material genético más abundante sería el de 7000 pb que en este caso correspondería a un RNA. que al ser tratadas con ribonucleasa 1mg/ml las bandas son eliminadas. Dentro de los geles de agarosa de DNA total (fig.16) se pueden observar dentro de los carriles, estos barridos pueden corresponder a degradaciones del material genético depositado en los carriles, tales degradaciones pueden deberse a que el material genético no es estable en esas condiciones y por tanto tiende a degradarse. Esto no se puede afirmar con tan sólo observar una banda en un gel sino que debe respaldarse con las pruebas inmunológicas, serológicas o de PCR para poder confirmar la presencia de otro virus además de Ad dentro de la infección. La intensidad de bandas que se nota en un gel es proporcional a la cantidad de DNA presente en la muestra por tanto es un patrón cualitativo para determinar aproximadamente la cantidad de material genético presente.

Al obtener DNA celular (Fig.13) se comprobó que la técnica funcionaba de manera adecuada. El DNA celular se utilizó como control negativo ya que la banda observada de 23,000 pb corresponde al peso molecular del material genético del Ad, ya que hasta la fecha no contamos con la cepa tipo para poder utilizarla como control positivo.

La utilización de Hind III permitió observar un patrón de bandas constante para todas las muestras que se pudieron tipificar (2 muestras) ya que la concentración de DNA presente en la muestra era el mínimo necesario para poder llevar a cabo una digestión enzimática, los resultados obtenidos fueron comparados con los PM de la tabla 6.

La técnica de Biología Molecular es utilizada por la epidemiología molecular para obtener datos más certeros del tipo de Ad que afecta a una determinada población así como detectar cambios en el genoma viral a través del tiempo. La técnica de hibridación y digestión enzimáticas es muy costosa y requiere de mucho tiempo para su elaboración por tanto su uso en el diagnóstico es muy difícil para ello se utiliza mejor la IFA, que es rápida y de un costo menor a la digestión enzimática.

EFFECTO CITOPÁTICO EN CÉLULAS Hep-2

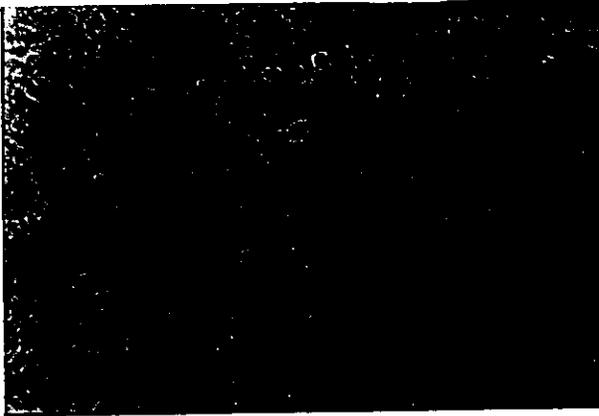


Fig 7. Monocapa normal de células Hep2

Con 24hrs de crecimiento pase 94, las células fueron crecidas en medio CMEM al 10% de suero fetal bovino, observadas en microscopio óptico con 10X de aumento y 10X de lente

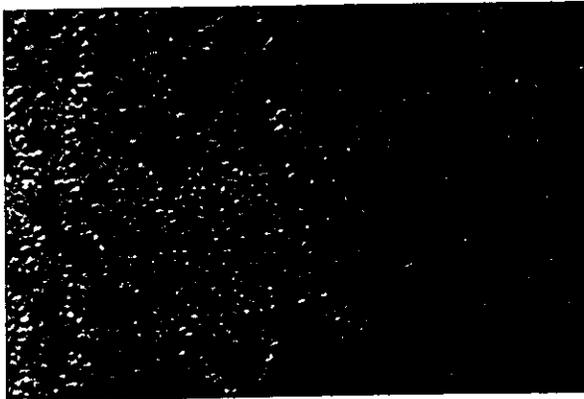


Fig. 8. Efecto citopático en células Hep-2.

Células con 24 hrs de infección, las células presentan redondamiento y tienden algunas de ellas a agruparse en forma de racimo de uvas, algunas de ellas ya no refractan la luz lo cual indica la muerte celular, las células están en medio CMEM de mantenimiento.

**INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA
IDENTIFICACION DE ADENOVIRUS EN
CELULAS DE CULTIVO CELULAR**

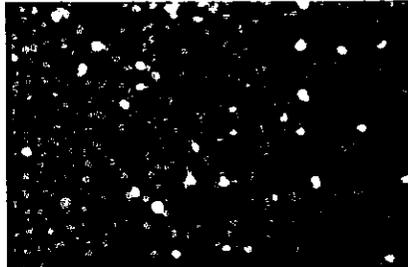


Fig. 9 Control positivo de adenovirus

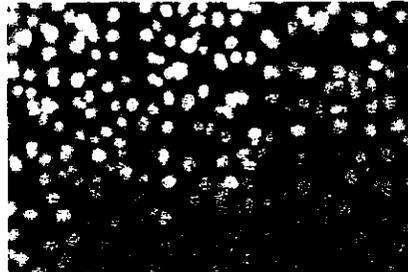


Fig.10 Control negativo cel. Hep-2

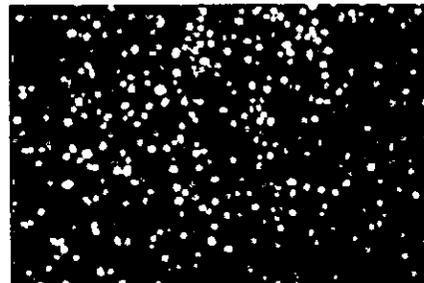


Fig. 11 Muestra positiva de
adenovirus

Las células teñidas de rojo indican células normales o sin ninguna infección por Ad.

Las células con inmunofluorescencia verde representan células infectadas por adenovirus. Las muestras se observan al microscopio de inmunofluorescencia a objetivo de 100X y lente de 10X.

El control positivo muestra células Hep-2 sin inocular, las células fueron tomadas al momento de realizar un pase de cultivo celular, tomadas del boton de la muestra centrifugada

RESULTADOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

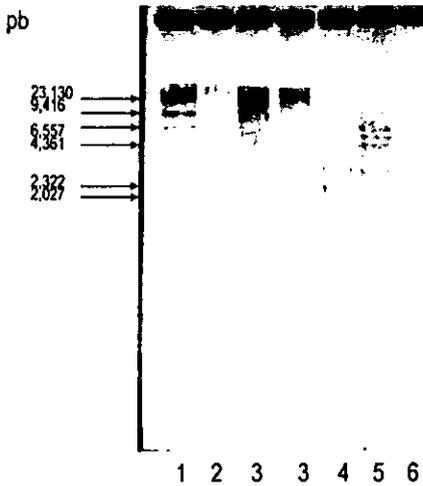


Fig. 12 Gel de agarosa 1.2%.
 Carril 1: Marcador de PM λ DNA/Hind III,
 Carril 2: Muestra de DNA total México
 Carril 3: DNA total muestra de Oaxaca. Cortada con Hind III
 Carril 4: Material genético total muestra de Veracruz
 Carril 5: Digestión de la muestra de Veracruz con Hind III
 Carril 6: Patrón de bandas obtenido con Hind III, muestra de México.



Fig. 13. Gel de agarosa al 1.2%
 Carril 1. Marcador de peso molecular λ DNA
 Carril 2. DNA total extraídos por la técnica sin precipitación del DNA celular desde el principio de la metodología. La primera banda representa a un DNA de alto peso molecular (DNA celular). La segunda banda es el DNA del Ad. El cual tiene un PM aproximado a 23,000 bp

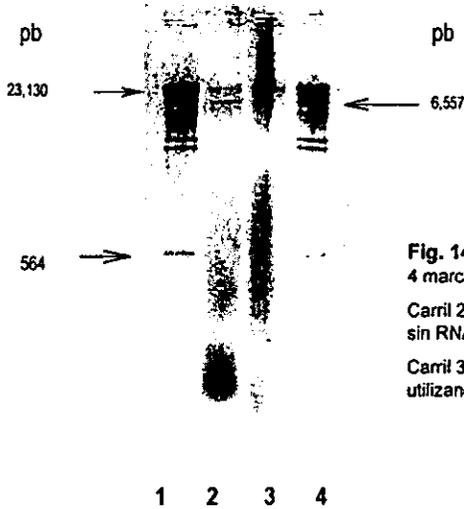


Fig. 14. Gel de agarosa 1.2%. Carril 1 y 4 marcadores de peso molecular lambda.
 Carril 2. Muestra de Tamaulipas, extraida sin RNAsa.
 Carril 3. Muestra de Tamaulipas, extraida utilizando RNAsa.

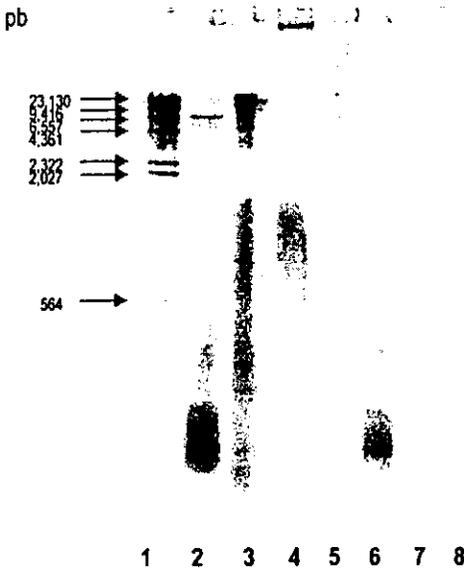


Fig 15. Gel de agarosa 1.2 %.
 Carril 1: Marcador de PM λ DNA/Hind III,
 Carril 2: Muestra de DNA total Tamaulipas, se observa la presencia de dos bandas una de 23,000 kb correspondiente al material genético del adenovirus, y la de 7,000 kb correspondiente a un enterovirus, se puede apreciar la diferencia de intensidades entre las dos bandas siendo la más intensa la de 7,000 kb
 Carril 3: DNA total muestra de Oaxaca
 Carril 4: DNA total de células Hep-2
 Carril5: Material genético total muestra de Hidalgo
 Carril 6: Digestión de la muestra de Tamaulipas del carril número 2 con RNAsa, se observa la eliminación de la banda de 7,000 Kb

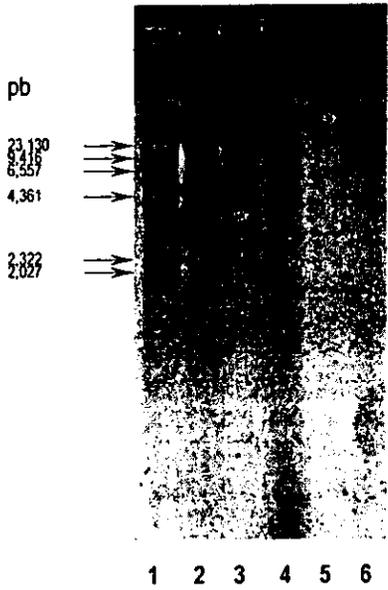


Fig.16 . Carril 1 maracdor de peso molecular lamda.

Carril 2. Muestra de DNAv total de Ad

Carril 3 muestra de DNAv total de Ad

Carril 4 muestra de DNAv total Ad

Carril 5 muestra de DNAv total Ad

**DISCUSION
DE
RESULTADOS**

CAPITULO V DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El Ad puede ser identificado por técnicas como: inmunofluorescencia, inhibición de la hemaglutinación, hemaglutinación con glóbulos rojos de rata y de mono *Rhesus* y actualmente el PCR identifica el tipo y subtipo viral. Estos virus se propagan en cultivos celulares, en líneas Hep-2, HeLa, HK, observándose como ECP la formación de células redondas desprendidas de la monocapa celular, distribuyéndose en racimos, las pruebas mencionadas anteriormente son compartidas con los enterovirus, virus que también pueden causar CHA, la única opción para poderlos diferenciar es por IFA y por técnicas de biología molecular^{3,5,10,12,13,20,23,33}.

Como se puede observar con las pruebas de rutina es difícil conocer la presencia de enterovirus ya que el ECP es similar. Al ser susceptibles ambos virus a propagarse en células Hep-2 se estarían propagando ambos virus, al hacer la titulación viral el resultado obtenido es la suma del número de partículas infectivas de Ad y de enterovirus ya que los dos son capaces de dar un ECP similar. La aparición tan rápida de ECP puede deberse a múltiples factores como cantidad de inóculo, cantidad de partículas infectivas, título viral, esto principalmente a partir del segundo pase, en el caso de las muestras originales depende de la toma de muestras y el transporte de la misma; otra opción es la presencia de dos virus, en el caso de los enterovirus completan su ciclo de infección celular de 12-24 hrs y el Ad en aproximadamente 48 hrs. En la bibliografía se reporta la aparición del ECP en células Hep-2 para adenovirus en 7 días y para enterovirus en 48 hrs. Las muestras cosechadas presentaban un ECP 4+ en 48 hrs., y además un título viral alto al reportado experimentalmente ($10^{6.32} - 10^{13.314}$ TCID₅₀) de lo cual se podría decir de una mezcla de virus provocando el mismo ECP y un aumento en el título viral^{10,12,17}.

En la IFAd para Ad se utilizó un Ac monoclonal anti-hexón, esto hace que dicha prueba presente un 98% de especificidad eliminando la posibilidad de una reacción cruzada con algún tipo de enterovirus. Gracias a esta prueba se confirmó la existencia de Ad en las muestras inoculadas en cultivo celular⁵⁴.

La técnica de HA es muy general ya que identifica sólo el grupo y subgrupo de Ad y no da información sobre el tipo, pero nos sirve de referencia para suponer los tipos se esperados en la tipificación y así reducir el campo de búsqueda. La mayoría de los resultados de HA coinciden con los grupos esperados, ya que además del grupo B que es el responsable normalmente de brotes epidémicos de CHA, se encontraron otros grupos con los tipos Ad8, 19 y 37 (subgrupo D) (EKC), Ad5 (subgrupo C) o Ad4 (subgrupo E), se han visto involucrados en casos esporádicos de CHA. Los grupos A y F de Ad no se encuentran usualmente en los brotes de conjuntivitis

porque presentan tropismo, causando exclusivamente enfermedades gastrointestinales y respiratorias.^{15,17,32}

En el caso de los resultados de las hemaglutinaciones que no coinciden con los grupos con los tipos virales causales de conjuntivitis, se puede deber a modificaciones en las secuencias de aminoácidos de la fibra. Las propiedades de hemaglutinación de cada uno de los tipos de adenovirus caen en los componentes característicos presentes en sus fibras, por tanto, pequeñas modificaciones en las secuencias de aminoácidos pueden cambiar las propiedades de hemaglutinar con un determinado tipo de eritrocitos, por eso es posible encontrar reacciones cruzadas en la prueba (con los grupos A y F) que en este caso particular se descartaron por ser grupos no involucrados en la CHA^{15, 17, 32}.

En los geles de agarosa de 1.2% (fig 16) la banda de 23,000pb de acuerdo a los datos reportados corresponde al Ad; sin embargo en tres muestras se observó una banda adicional de 7000pb que posiblemente correspondería a un virus de la familia de los enterovirus (enterovirus 70, coxsackie y echovirus), los cuales son agentes causales de conjuntivitis hemorrágica. Las infecciones mixtas en la CHA son muy frecuentes, en estas infecciones se pueden encontrar diferentes virus involucrados como una infección mixta. La presencia de algún tipo de enterovirus se evidenció por la técnica electroforesis de los materiales genéticos extraídos (Fig. 14)^{4,17}.

En algunos geles no se observó la banda de 7000 pb, esto probablemente debio al protocolo de extracción utilizado. Dicha banda probablemente corresponde a un RNA y esto se pudo corroborar al someter a la misma muestra a un tratamiento de RNAsa y observar la desaparición de la banda, quedando unicamente la banda de 23,000 pb del Ad. (15), estas evidencias pueden sugerir que en el brote de CHA en México de 1998 existe probablemente una infección mixta, en toda o quizás en algunas regiones específicas del país.

La poca cantidad de DNAv total (1.9×10^{-3} - 3.41×10^{-2} mg/ml) obtenida al final de una extracción fue insuficientes para poder realizar una tipificación adecuada, el DNAv obtenido era insuficiente como para poder apreciar bandas de digestión enzimática en un gel de agarosa. En la literatura se recomienda trabajar de 3-5mg de DNA total con una pureza del 80%.

Se logró obtener dos patrones de digestión con Hind III utilizando 8ml de muestra, el cual de acuerdo a los datos reportados en la tabla 6 el tipo de Ad presente en esa muestra es el tipo 7, que es un tipo viral muy frecuente en CHA. Para poder confirmar el resultado se necesita obtener diferentes patrones de digestiones con diferentes enzimas como Sma I, Bgl II, BstE II y BamH I. Los cortes con las enzimas mencionadas anteriormente no se realizaron, sólo se realizó con Hind III como resultado de la poca cantidad de DNA obtenido de las extracciones haciendo imposible los cortes enzimáticos.

Si se logran completar los patrones de bandas restantes SmaI, Bgl II, BstE II y BamH I se puede confirmar la presencia del tipo adenoviral en la muestra, esto es de gran utilidad al analizar patrones completos, se pueden observar las variantes entre tipos de adenovirus y sobre todo conocer con exactitud el tipo de Ad presente en las muestras de los estados de la república que presentaron brote de conjuntivitis.

La técnica de digestiones enzimáticas es muy difícil que se utilice como técnica de rutina para el diagnóstico aunque es una técnica muy sensible resulta ser muy costosa y es muy laboriosa de realizar a comparación de la IFA que sin duda seguirá siendo el arma para diagnosticar confiable y rápidamente. La Biología Molecular es aplicada en la Epidemiología molecular con el fin de recaudar datos más exactos sobre los cambios que sufre un virus a través del tiempo y en que poblaciones se presenta.

**CONCLUSIONES
Y
RECOMENDACIONES**

CAPITULO VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

El agente causal principal del brote de CHA es el Ad el cual se encuentra presente en todas las muestras analizadas y posiblemente en casos esporádicos un enterovirus cuasando una infección mixta en esas entidades.

El Ad encontrado en algunas de las muestras clínicas de pacientes que presentaron algún cuadro de conjuntivitis fue el Ad7, para confirmarlo se necesita completar una serie de mínimo cinco enzimas diferentes con la misma muestra (SmaI, Bgl II, BstE II, Hind III y BamH I) para estar 100% seguro del tipo y subtipo de Ad, sólo fue posible hacer la digestión con una sola enzima por la poca cantidad de DNA obtenido en las extracciones.

Se logro aislar todas la muestras diagnósticadas como positivas por IFAd en células Hep-2, encontrandose un titulo viral en las cajas de cultivo de $10^{6.32}$ - $10^{13.314}$ TCID₅₀.

En la tipificación por grupo se encontro que el Ad presente en ellas pertenecian a los grupos B,C,D y E en donde se ubican los tipos de Ad que pueden causar un tipo de CHA.

Es frecuente encontrar mezclas de diferentes virus en un brote de conjuntivitis, por tanto no se puede hablar de un agente etiológico único. En el caso del brote de conjuntivitis hemorrágica en México en el año de 1998 se encuentran adenovirus y posiblemente enterovirus como un agente causal del brote.

Las técnicas de biología molecular son de gran utilidad para poder identificar con mayor exactitud a posibles agentes involucrados en una muestra, sin tener la limitante de identificar exclusivamente al agente para el cual fue diseñada alguna técnica descrita (IFA), que a pesar de ser técnicas con gran especificidad poseen la limitante de pasar por alto la presencia de algún otro agente viral.

El analizar el material genético de cualquier microorganismo nos permite identificarlo con gran especificidad aunque para la validez total de tales resultados se necesita contar con el apoyo de otras técnica inmunológicas o serológicas que apoyen por completo los resultados .

La utilización de una técnica en Biología Molecular es de gran utilidad para identificar los agentes etiológicos involucrados en una determinada patología, para obtener datos epidemiológicos muy confiables detectando así otros posibles agentes que estén involucrados en un brote.

Las técnicas como IFA son muy útiles dentro del diagnóstico de rutina de un laboratorio ya que son rápidas e identifican el agente para el que están diseñados con gran especificidad.

6.2 Recomendaciones:

- ✓ Trabajar todas las muestras registradas como casos de conjuntivitis hemorrágica en el laboratorio de Ira's en el INDRE con la finalidad de localizar el total de muestras que presentan una infección mixta entre Ad y enterovirus.
- ✓ Realizar las pruebas de rutina para enterovirus para demostrar la presencia del mismo de forma separada.
- ✓ Tratar de tipificar al tipo de enterovirus (enterovirus 70, coxsackie A24, echovirus) presente en las muestras positivas para dicho virus mostradas en el presente trabajo.
- ✓ Realizar la cosecha viral en cajas de 120 cm², para obtener mayor número de partículas virales y como consecuencia obtener mayor cantidad de DNA para realizar las digestiones enzimáticas.
- ✓ Realizar los cortes enzimáticos con las enzimas Sma I, Bgl II, BstE II y BamH I para confirmar el tipo de Ad sugerido en el presente trabajo.

En este presente trabajo sirve de parte aguas para la conclusión de un trabajo completo de investigación relacionado con la epidemiología molecular, donde se incluye el tipo presuntivo de Ad que pudo estar involucrado en el brote de CHA en el país, es de esperarse que al momento de completar los patrones de bandas o al analizar todas las muestras registradas durante el brote para un análisis epidemiológico se encuentren mezclas de diferentes tipos de Ad en las muestras ya que en la literatura se han reportado con frecuencia dichos casos y además mezclas con otros virus como es el caso de los enterovirus.

ANEXOS
Y
BIBLIOGRAFIA

A N E X O I
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES
Y REACTIVOS.

- ⇒ Azul de bromofenol: Preparar una solución al 0.25% de azul de bromofenol (Sigma) en glicerol (Becker) al 35%.
- ⇒ Bromuro de etidio: 10mg/ml: Disolver 100mg de bromuro de etidio (Behringer Manhem) en 10ml de agua bidestilada estéril.
- ⇒ Buffer de fosfatos para inmunofluorescencia: pesar 8g de NaCl (RPQF), 0.2g KCl, 1.15g NaHPO₄ (RPQF), KH₂PO₄ (RPQF) 0.2g aforar a un litro en agua destilada. Adicionar 0.1ml de Tween-20 (Sigma) a la solución anterior.
- ⇒ Buffer TBE 10X Disolver en agua bidestilada 108g de Tris-base (SIGMA), 27.5g de ácido bórico (Becker) y 6.8g de EDTA (SIGMA) aforar a un litro y calibrar la solución a pH=8.3
- ⇒ Cloroformo:alcohol isoamílico 24:1: En una probeta se mezclan 96ml de cloroformo (Monterrey) y 4ml de alcohol isoamílico (Merck).
- ⇒ CMEM de crecimiento para células Hep-2: 10% de suero fetal bovino (GIBCO), 2.5% bicarbonato de sodio (BioLab), 1.5% hepes (BioLab), 1% antibiótico (Penicilina/Estreptomina 10,000U/ml) (GIBCO), medio MEM filtrado, cuanto baste para completar un volumen de 100ml.
- ⇒ CMEM de mantenimiento para células Hep-2: 2.5% Bicarbonato de sodio (BioLab), 1.5% hepes (BioLab), 1% antibiótico (Penicilina/Estreptomina 10,000U/ml) (GIBCO), medio MEM filtrado, cuanto baste para completar un volumen de 100ml.
- ⇒ Dextrosa-Gelatina-Veronal (DGV) buffer pH=7.3: Pesar: ácido barbitúrico 0.58g, gelatina 0.6g, barbital sódico 0.38g, CaCl₂ 0.02g (RPQF), MgSO₄ · 7H₂O 0.12g (Merck), NaCl (RPQF), 8.5g y dextrosa 10g, aforar a un litro en agua destilada, esterilizar previo a su uso. El barbital y la gelatina son disueltos por separado en 250ml de agua con calor y una vez disueltos se mezclan con los demás reactivos.
- ⇒ Glóbulos rojos al 0.4%. Para preparar una 100 ml de solución, se pipetea 400ml de glóbulos rojos de mono o de rata y se colocan en un matraz Herlen Meyer que contenga 99.6 ml de la solución de DGV preparada anteriormente se mete a refrigeración hasta el momento de utilizarse.
- ⇒ MEM: Disolver en agua bidestilada estéril 9.98g de MEM (SIGMA) en polvo, filtrar y almacenar en 4°C hasta su uso.
- ⇒ Proteinasa K 10mg/ml: Pesar 200mg de proteinasa K (GIBCO) y disolver con agua bidestilada estéril hasta 20ml. Alicuotar y mantener a -20°C.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Azar Roberto, Varsano N, Milerguir F. Medelson E. Molecular Epidemiology of adenovirus type 7 in Israel: Identification of two new genomes types, Ad7k and Ad7d2. *J. Med. Virol.* 1998;54:291-299
- 2 Barry I. Elsom Norbert KH. Rapid method for preparing adenovirus DNA. *Biotechniques* 1997; 22:868-870.
- 3 Belshe. Robert. Et.al. "Textbook of human Virology". 2.ed. Mosby year boork. U.S.A. 1991. Pp: 26-38.
- 4 Chou m-y, Malison MD. Outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis due coxsakie A-24. *Am.J. Epidemiol*, 1988;127: 795-800
- 5 Collier Leslie, Morang. "Principles of bacteriology, Virology, and inmunity, / Vol. 4." BeDecker Inc. Gran Bretaña.
- 6 Curtis S. Wilkinson W. Westmoreland. An outbrak of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 37. *J. Med. Microb.* 1998;47:91-94.
- 7 D'Angelo, L.J. Hierholzer, R.C. Holman, J:D: Smith. Epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 8: epidemic and laboratory aspect of a large outbreak, *Am. J. Epidemiol.* 1981.113:44-49.
- 8 DeJong,J:Cwigand,G. Wadell,D: Keller, C:J: Muzerie. Adenovirus 37: identification and characterization of a medically important new adenovirus type group D. *J: Med. Virol.* 1981, 7:105-118.
- 9 Duggelby, R.G. .Rood Kinns, J. I.. A computer program for determinig the size of DNA restriction fragments. *Anal. Biochem.* 1981. 110:49-55.
- 10 Field B. David Kinipen. et al. "Virology /vol 2". 3a. Lippincott-Raven. 1996. U.S.A
1. Guyer, B. M: O'Day, J.C. Hierholzer, W: Schaffner. Epidemic keratoconjunctivitis: a community outbreak of mixed adenovirus type 8 and 19 infection. *J. Infect. Dis.* 1975. 128:541-550
2. Gary P.L. Patrick. C. Harris P. Use of continuous human lung cell culture for adenovirus isolation. *Intervirolgy* 1995; 38:352-355.
3. Hierholzer J.C. "Diagnostic proceduces for viral, rickettsial and clamidial infection". 6.ed. American Public Health Association. 1989. Washington D.C. U.S.A. pp 219-252
4. Jan C. de Jong, Démazure M, et.al. New Developments in the molecular epidemiology of adenovirus 8 keratoconjunctivitis. *J. Med. Virol* 1992; 38:102-107
5. Joe S. Sleight M. Jc Jeffrey A. Thomas B. The evolution of the adenoviral genome. *NYAS* 1980.426-448
6. Keenlyside. R.A., J.C. Hierholzer, J.D'Angelo. Keratoconjunctivitis asocietd with adenovirus type 37: an extended outbreak in an ophthalmologist's office. *J. Infct. Dis.* 147: 191-198.

7. Kemp Maurice. Hierholzer J.C. Cirilo Objeski F. The changing etiology of epidemic keratoconjunctivitis types 19 and 37 isolated over a 10-years period. *J. Inf. Dis.* 1983; 148(1): 24-33.
8. Kemp Maurice. Hierholzer J.C. Three Adenovirus type 8 genome types defined by restriction enzyme analysis: Prototypes stability in geographically separated populations. *J. Clin. Microb.* 1986; 23:469-473.
9. Kenneth H.F. Rhoda A. Shields A.F., et.al. Comparasion of neutralization and DNA restriction enzyme methods for typing clinical isolates of human adenovirus. *J. Clin. Microbiology* 1985; 22 (1): 95-100.
10. Lennet.E. "Manual de Microbiologia Clinica". 4a.ed. Panamericana. 1993. Argentina.
11. Luria. S.E. "General Virology". 3.ed. John Wiley & Sons. 1971. Pp
12. McMinn PC, Stewart J. Burrell C.J. A community outbreak of epidemic keratoconjunctivitis in central Australia due to adenovirus Type 8. *J. Inf. Des.* 1991; 164: 1113-1138
13. Payment. P, Michael Truedel. "Methods and Technique in Virology". Marcel Dekker. 1993. U.S.A.
14. Phillips. R. Vasil. et.al. "DNA based markers in plants". 1994. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. pp 8-38.
15. Richmond, S, Burman, E. Crosdale. A large outbreak of keratoconjunctivitis due to adenovirus type 8. *J. Hyg.* 93:285-291.
16. Shaw-Guag. Lee, William, C. Gruber. "Viral infections of the respiratory tract", vol 127. Cap. 9. "Adenovirus" de. Raphael Dolin, Peter Y. Wright. 1999. U.S.A. pp.223
17. Scott-Taylor T. Hammond G. Conserved sequences of the adenovirus genome for detection of all human adenovirus types by hybridization. *J. Microbiol* 1992;30(7) 1703-1710
18. Takacs, M. G. Berencsi, A, Lengyel, I. Nsz.. Restriction site maps of human adenovirus type 8 DNA. *Acta Virol.* 1983. 27:289-298.
19. Takeuchi R. Monura Y. Kojima M, Uchior E. Matumoto M. A nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis due to adenovirus type 37. *Microbiol Immunol.* 199;34: 749-754.
20. Wadell G. Hierholzer. J.C. Wigan. R. DNA Restriction Analysis of Adenovirus Prototypes 1 to 41. *Arch. Virol* 1986; 91:277-290
21. Wadell G.J.C. deJong. Restriction endonucleases in identification of genome type of adenovirus 19 associated with keratoconjunctivitis. *Infect. Immun.* 1980. 27:292-296.
22. Wadell G.J.C. deJong, S. Wolontis. Molecular epidemiology of adenovirus: alternating appearance of two different genomes ty7pes of adenovirus 7 during epidemic outbreaks in Europe from 1958 to 1980. *Infect. Immun.* 1981; 34: 368-372.
23. Wadell G. Marie-Louise H. et.al. Genetic variability of adenoviruses. *NYAS* 1980.1:17-43
24. Waka S. Oshima A. Koki AN. et.al. Rapid Diagnosis of adenoviral conjunctivitis by PCR and

restriction fragment length polymorphism analysis. J.Clin.Microb.Sep.1996;34(9): 2113-2116

25. Yim-Murphy. Et.al. Acute hemorrhagic conjunctivitis. Prog.Med. Virol. 1984; 29:23-44.

- 1 200.9.43.240/interv7conjunt.htm
- 2 ab.net/mft/producto/p399.htm
- 3 bilbo.bio.purdue.edo/viruswww/coxsackie/initial
- 4 biomed.nus.sg/microb/notes/enterov_preg.txt
- 5 cehs.siu.edu/fix/medmicro/adeno.htm
- 6 cof.es/sevilla/publico/ibfosani/ficha/6.htm
- 7 drscope.com/privados/pac/generales/ofthalmologia/conjuntiva.html
- 8 elfaro.net/salud.htm
- 9 gansmart.com/medinfo/disease/herpes.htm
- 10 ha.org.hk/generalidades/advice.htm
- 11 homepages.wich.net/ks.burrell/f2/conjunctivitis.htm
- 12 mipediatra.com.mx/oct.htm
- 13 morgat.udg.es/microbsem/v1301-97/Martinez.html
- 14 netsalud.sa.cr/interes/conjunt.htm
- 15 ns.binass.sa.cr/conjunt.htm
- 16 oftalio.com/conjuntivitis.htm
- 17 Tulane.edu/ dmsander/Big_Virology/BNDNAadeno.html.
- 18 wadsworth.org/databank/enterov.htm
- 19 Wysiwyg://35/http://www-micro.msb.le.ac.uk/335/Adenovirus.html

RECIBIDO EN EL SERVIDOR
DE LA BIBLIOTECA
DE LA UNIVERSIDAD DE
SALAMANCA