



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE ADENOVIRUS HUMANO EN
ADOLESCENTES CON TOS PROLONGADA EN EL SUR DE LA CIUDAD DE
MÉXICO, A PARTIR DE EXUDADOS NASOFARÍNGEOS DE OCTUBRE DE
2008 A MARZO DE 2009**

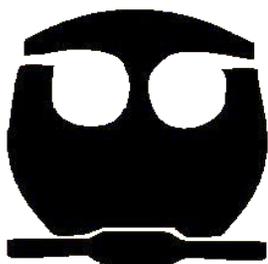
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

CLAUDIA ADRIANA COLIN CASTRO





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado:

PRESIDENTE	M en C. Aida Navas Pérez
VOCAL	Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva
SECRETARIO	Dr. Sarbelio Moreno Espinosa
PRIMER SUPLENTE	Q.F.B. Ma. Carmen Urzua Hernández
SEGUNDO SUPLENTE	Q.F.B. Ana Martínez Silva

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Infectología,
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)

Asesor del tema

Sustentante

Dr. Sarbelio Moreno Espinosa

Claudia Adriana Colín Castro

“El crecimiento intelectual debe comenzar al nacer y cesar solamente al morir”.

- Albert Einstein

Agradecimientos

Infinitamente a mis Padres, que gracias a sus enseñanzas y consejos he llegado a cumplir esta meta.

A mis hermanos Juan y Jorge, por todos los momentos alegres que hemos y seguiremos compartiendo como CÓMPLICES de la vida.

Al Dr. Guillermo Ruiz-Palacios, por el apoyo que siempre tuvo en mi persona, por la confianza y la oportunidad que me brindó de pertenecer a su grupo de trabajo.

A mi asesor de tesis, el Dr. Sarbelio, del cual siempre tuve un apoyo incondicional, una enseñanza perfecta y sobre todo una GRAN AMISTAD.

De manera especial quiero agradecer a Pily, Violeta, July y Luz Elena, quienes han sido mis instructoras a lo largo de la etapa profesional, pero sobre todo el brindarme su confianza y amistad hace que hoy pueda llamarlas con toda confianza y cariño AMIGAS.

A mis entrañables AMIGOS: Paty, Ayleen, Grace, Nora, Lety, Luis y Fernando que hacen de mis días difíciles una verdadera aventura de felicidad, además han acompañado mis logros y fracasos y quiero tenerlos por siempre a mi lado.

Al Dr. Rafael Franco, que en todo momento me ha motivado para no dejarme vencer por las adversidades así como por la gran amistad y HERMANDAD que nos une.

A la persona que mueve mi mundo, mi AMADO COMPAÑERO: Joel.

Índice

	CAPÍTULO I	Página
<i>Introducción</i>		1
	CAPÍTULO II	
<i>Objetivos</i>		3
	CAPÍTULO III	
<i>Antecedentes</i>		
3.1. Familia Adenoviridae		4
3.2. Género Mastadenoviridae		4
3.2.1. Estructura.....		6
3.2.2. Replicación.....		7
3.2.3. Patogénesis.....		10
3.2.3.1. Infección abortiva.....		11
3.2.3.2. Enfermedad similar a pertussis.....		11
3.2.4. Epidemiología.....		13
3.2.5. Diagnóstico		
3.2.5.1. Métodos directos.....		14
3.2.5.2. Métodos indirectos.....		20
	CAPÍTULO IV	
<i>Metodología Experimental</i>		
4.1. Población.....		22
4.2 Toma y transporte de muestra.....		23
4.3. Obtención de material genético		
4.3.1. Pre-tratamiento de la muestra.....		24
4.3.2. Extracción de ADN.....		24
4.4. PCR-Tiempo real		
4.4.1. Iniciadores y sondas		25
4.4.2. Condiciones de PCR-Tiempo real.....		26
4.5. Amplificación del fragmento a secuenciar		26
4.6. Limpieza de productos de gel embebidos en gel de agarosa (Kit MinElute DNA [®])...		27
4.7. Marcaje del producto amplificado y secuencia automática.....		30

CAPÍTULO V

Resultados y Análisis de Resultados

5.1. Estacionalidad de los casos.....	32
5.2. Manifestaciones clínicas.....	33
5.3. Adenovirus detectados mediante RT-PCR.....	33
5.4. Genotipificación de Adenovirus.....	35

CAPÍTULO VI

<i>Conclusiones</i>	40
----------------------------	----

CAPÍTULO VII

<i>Bibliografía</i>	41
----------------------------	----

Introducción

Los Adenovirus contienen un genoma lineal de ADN de doble cadena. Actualmente se conocen 51 serotipos de adenovirus humano, que son clasificados dentro de 6 especies (A-F).

Son responsables de un amplio espectro de enfermedades incluyendo infecciones de tracto respiratorio alto y bajo, conjuntivitis, queratoconjuntivitis y gastroenteritis en niños. En poblaciones militares adenovirus se relaciona con enfermedades respiratorias agudas y neumonía.

Las infecciones del tracto respiratorio bajo causadas por adenovirus son bronquiolitis, laringotraqueobronquitis y un cuadro similar a la tos-ferina caracterizado por accesos violentos paroxísticos de tos que puede estar acompañada de cianosis, vómito, periodos de apnea y por estridor inspiratorio similar al “canto de gallo” (del francés coqueluche), por lo que se conoce como Síndrome Coqueluchoide [1].

Entre octubre del 2008 y marzo del 2009, 13,000 estudiantes de secundaria de 11 a 15 años de edad, de 22 escuelas de las delegaciones Tlalpan y Coyoacán, fueron monitorizados clínicamente para identificar episodios de tos prolongada, que pudieran sugerir Síndrome Coqueluchoide. Se tomaron muestras nasofaríngeas mediante hisopado para la identificación de adenovirus.

El reporte del Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia (Censia) en los Lineamientos Generales del año 2007 señala en referencia a la tos-ferina un aumento de formas clínicas atípicas en adultos jóvenes que perdieron inmunidad y que esto constituye fuentes de contagio potencialmente peligrosas para la población infantil. Determina que para el año 2005 hubo un incremento de 166.93% en el número de casos por este padecimiento. [22]

Las muestras para este estudio provienen retrospectivamente del estudio de identificación para *Bordetella pertussis*, ya que es sabido que los síntomas en ambas infecciones son similares y son necesarias técnicas de diagnóstico específicas para ser diferenciadas.

La identificación del adenovirus se hizo mediante PCR-Tiempo real, basada en la amplificación de un pequeño fragmento conservado del gen que codifica para la proteína llamada Hexón, que forma la cápside. La genotipificación se realizó mediante PCR convencional amplificando una región mayor del mismo gen con un grupo de iniciadores diferentes, obteniéndose secuencias parciales del gen que fueron analizadas con el programa Mega 4[©] Análisis Genético y Evolución Molecular.

Objetivo General

- Determinar la prevalencia de genotipo de Adenovirus Humano asociados a tos prolongada en adolescentes del sur de la Ciudad de México.

Objetivos Particulares

- Identificar adenovirus humano mediante la técnica de PCR-tiempo real en muestras clínicas de hisopado nasofaríngeo.
- Amplificar el fragmento de la región conservada del gen que codifica la síntesis del Hexón, mediante la técnica de PCR convencional, a partir de las muestras positivas para adenovirus humano.
- Purificar, marcar y secuenciar el fragmento amplificado obtenido mediante PCR convencional.
- Alinear la secuencia obtenida con muestras registradas en el banco de genes (GenBank) para determinar el genotipo.
- Identificar los genotipos de adenovirus humano y diseñar un árbol filogenético empleando el software Mega 4[©] Análisis Genético y Evolución Molecular.

Antecedentes

3.1. Familia Adenoviridae

Los Adenovirus son un grupo de virus que afecta a mamíferos, aves y algunos reptiles. Estos virus causan diversas enfermedades, siendo más frecuentes las infecciones respiratorias y con menor frecuencia gastroenteritis, conjuntivitis, cistitis y las enfermedades exantemáticas.

Estos virus fueron aislados por primera vez en 1953 a partir de tejido adenoidal y linfoides humano, por lo que se les dio el nombre de adenovirus. Existen 4 géneros incluidos dentro de la familia llamada *Adenoviridae*, estos son: mastadenovirus, aviadenovirus, atadenovirus y siadenovirus.

El género aviadenovirus se compone de 5 subgrupos, de la A a la D, que afectan únicamente aves, ocasionando hepatitis y bronquitis. Los géneros atadenovirus y siadenovirus se han aislado en anfibios, mamíferos y aves. Los atadenovirus ocasionan alteraciones en la cáscara de los huevos de los patos, haciéndolos más frágiles, y son utilizados como vectores para la terapia génica en humanos utilizando algunas especies de ganado y ovejas.

Los siadenovirus no tienen efecto patógeno en anfibios, pero pueden causar enteritis hemorrágica y alteraciones esplénicas en las aves. [2]

3.2. Género Mastadenovirus

El género mastadenovirus es el que tiene mayor relevancia clínica, ya incluye a los adenovirus que afectan al ser humano. Se denominan adenovirus humanos (AdVH) para diferenciarlos de los mastadenovirus que infectan a otros mamíferos. Se han descrito 51 tipos de AdVH que inicialmente fueron agrupados en seis subgéneros basándose en patrones de hemaglutinación, oncogenicidad en células de roedores, homología del ADN y organización genética.[3] En 1999 se realizó una reclasificación aprobada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, basándose en las secuencias de los aminoácidos. Esta clasificación ha ido modificándose de acuerdo al subgénero por especies. [4]. Actualmente los adenovirus se clasifican dentro de

seis especies utilizando letras de la A a la F (AdVH-A a AdVH-F), información que queda plasmada en la Tabla 1.

Especie	Serotipos	Tipo de infección
A^a	12, 18, 31	Respiratoria
B^{b, c}	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 51	Respiratoria y renal
C^{a, d}	1, 2, 5, 6	Respiratoria
D^d	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49	Ocular
E^a	4	Respiratoria
F^a	40, 41	Intestinal

Tabla 1. Serotipos de Adenovirus humanos agrupados en especies, tipo de infección provocada por la especie y receptores que reconoce. ^aReceptor Cocksackie-Adenovirus (CAR). ^bReceptor expresado en célula dendrítica 46 (CD46). ^cReceptor expresado en célula dendrítica 80 (CD80). ^dÁcido siálico

Los Adenovirus Humanos son responsables de enfermedades del tracto respiratorio, conjuntivitis, diarrea en infantes, cistitis hemorrágica y neumonía en casos graves, como puede verse en la Tabla 2. Algunos Adenovirus humanos presentan un potencial oncógeno en los animales.[5]

Enfermedad	Población de pacientes
Enfermedades respiratorias	
Infección febril e indiferenciada de las vías respiratorias superiores	Lactantes y niños pequeños
Fiebre faringoconjuntival	Niños y adultos
Enfermedad respiratoria	Personal militar
Síndrome coqueluchoide	Lactantes, niños pequeños
Neumonía	Lactantes, niños pequeños; personal militar; pacientes inmunodeficientes
Otras enfermedades	
Cistitis hemorrágica aguda	Niños; receptores de trasplantes de médula ósea
Queratoconjuntivitis epidémica	Cualquier edad; receptores de trasplantes de médula ósea
Gastroenteritis	Lactantes y niños pequeños
Hepatitis	Receptores de trasplantes hepáticos; pacientes inmunodeprimidos

Tabla 2. Enfermedades ocasionadas por adenovirus humano y poblaciones susceptibles.

3.2.1. Estructura

Los adenovirus son virus de ácido desoxirribonucleico (ADN) bicatenario con un genoma compuesto por aproximadamente 36 000 pares de bases, cuyo tamaño codifica entre 30 y 40 genes. El genoma de estos virus está formado por ADN lineal con una proteína terminal (peso molecular 55kDa) unida por enlaces covalentes a cada extremo 5'.

La partícula viral, es de estructura icosaédrica no envuelta, de 70 y 90 nm diámetro (*Figura 1*). Posee una cubierta formada de proteínas que se conoce como cápside, formada por 240 capsómeros constituida a su vez por hexones y pentones. Los 12 pentones están localizados en cada uno de los vértices de la estructura. La base de los pentones se conoce como pentona y a la estructura terminal se le llama fibra, la proteína de adherencia vírica.

En el Adenovirus existen 11 polipéptidos, de los cuales 9 tienen una función estructural.

Gen/Proteína	Número	Función
E1A		Activa la transcripción genética vírica dentro del núcleo celular. Además se une al supresor del crecimiento celular, así también inhibe la activación de los elementos de respuesta inmune del interferón.
E1B		Se une al supresor de crecimiento celular (p53) para inhibir la apoptosis y evitar que la célula hospedera muera y no se pueda terminar el ciclo de replicación.
E2		Proteína terminal en el ADN, que desempeña la función de ADN polimerasa viral.
E3		Impide la inflamación por el factor de necrosis tumoral alfa (TFN- α)
E4		Limita el efecto citopático del virus.
Cápside		
	II	Contiene el antígeno de familia y algunos antígenos de serotipo
	III	Proteína de la base del pentón
	IV	Este gen codifica para las proteínas de la fibra, es además responsable de la adhesión al receptor
	VI	Proteínas asociadas al Hexón. Estabiliza y ayuda a ensamblar la partícula viral
	VIII	Proteínas asociadas al pentón
Núcleo		
	V	Proteína nuclear 1: proteína de unión al ADN
	VII	Proteína nuclear 2: proteína de unión al ADN

Tabla 3. Tipos de proteínas presentes en los adenovirus humanos y su función

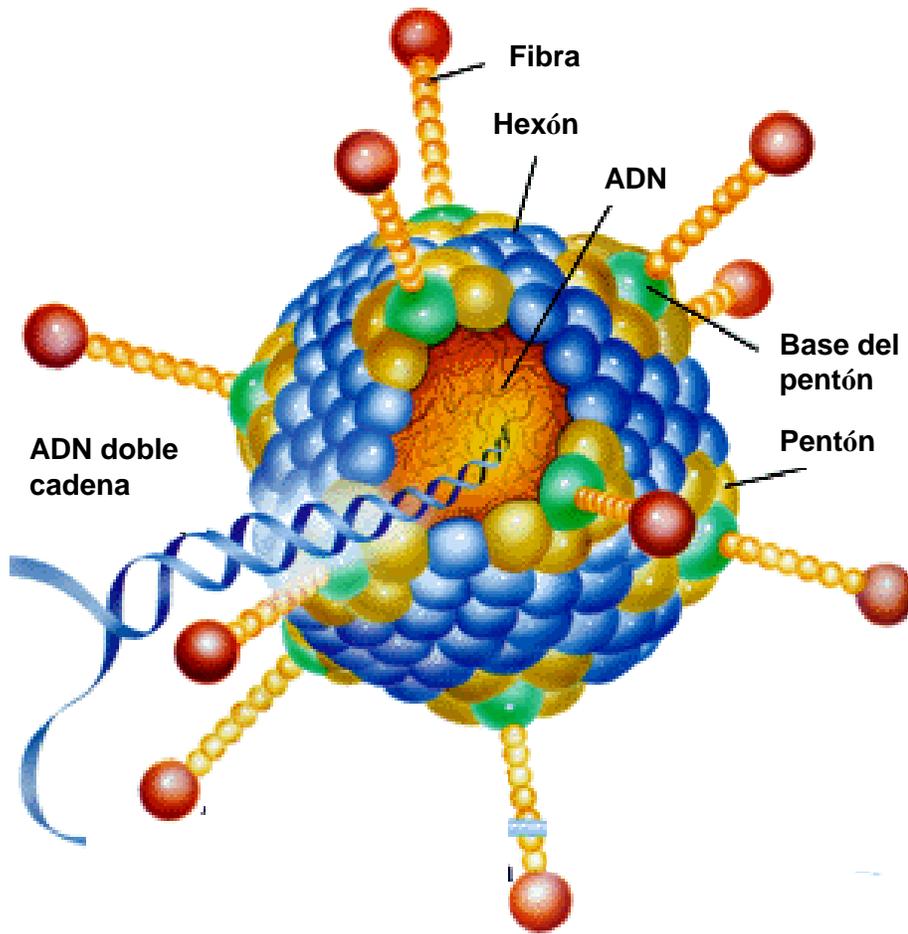


Figura 1. Esquema de un adenovirus humano

Modificada de http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1993/illpres/genes-in-pieces.html

3.2.2. Replicación

Las proteínas tempranas favorecen el crecimiento celular y entre ellas se encuentra la ADN polimerasa que está involucrada en la replicación del genoma. El adenovirus también codifica proteínas que inhiben la respuesta inmune e inflamatoria del huésped, por ejemplo E1A, E1B y

E3. Las proteínas tardías se sintetizan después de la replicación y son esencialmente proteínas de la cápside.[6]

Los Adenovirus se internalizan en la célula epitelial de la siguiente manera:

Las proteínas de la fibra viral interactúan con una glucoproteína perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas y mientras que la base de la pentona interactúa con una integrina para estimular la internalización por endocitosis mediada por receptores en una vesícula recubierta de clatrina. La interacción con las integrinas induce respuestas celulares, por ejemplo se activa la P13 cinasa y la GTPasa y ambas enzimas alteran de manera importante el citoesqueleto celular que a su vez facilita la internalización del endosoma. Dentro del endosoma la acidez provoca el desmontaje parcial de la cápside, perdiéndose los hexones que interactúan con las pentonas.

El receptor que reconocen las fibras del virus se conoce como receptor CAR (Receptor Cocksackie-Adenovirus, que se encuentra en los enterovirus de la familia cocksackie) [3]

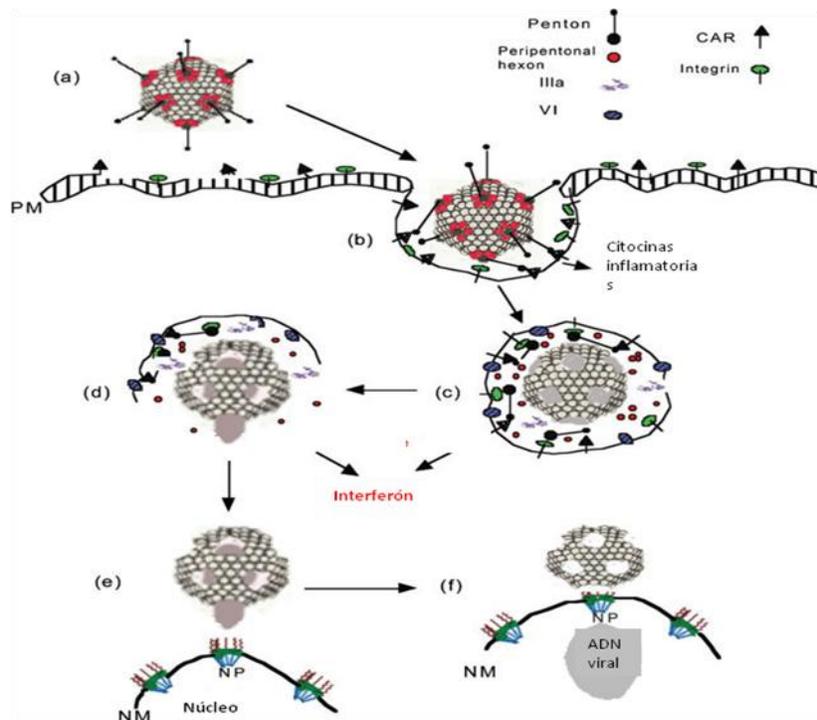


Figura 2. Internalización de Adenovirus a la célula y pérdida de la cápside.

Modificado de Adenoviruses: update on structure and function. Journal of General Virology (2009), 90, 1–20

La cápside parcialmente desmontada migra hacia el núcleo y libera el ADN viral a través del poro nuclear.

La replicación del ADN viral tiene lugar en el núcleo y está mediada por una polimerasa de ADN de origen vírico. El virus utiliza la maquinaria de la célula para la replicación. La polimerasa utiliza una proteína viral de 55 kDa unida a un monofosfato de citosina como cebador o iniciador para el comienzo de la replicación de ambas cadenas de ADN. [7]

El ciclo biológico del adenovirus comprende dos fases, inicial y final, separadas por la replicación del ADN. En ambas fases tiene lugar una transcripción primaria, generando ARNs mensajeros compatibles con los ribosomas del huésped, lo que permite que los productos sean traducidos. Los genes de la fase inicial son responsables de expresar principalmente las proteínas reguladoras no-estructurales. Los objetivos de estas proteínas son alterar la expresión de las proteínas del huésped que son necesarias para la síntesis del ADN, activar la ADN polimerasa y evitar la muerte prematura de la célula infectada por las defensas inmunes del huésped. [7]

La transcripción genética tardía se pone en marcha cuando ha finalizado el proceso de replicación del ADN y las proteínas de la cápside, se sintetizan en este proceso, que son transportadas al núcleo para terminar el ensamblaje del virus, permaneciendo éste en la célula y liberado cuando ésta se lisa.

3.2.3. Patogénesis

Los adenovirus infectan las células epiteliales del aparato respiratorio y digestivo. Siendo las proteínas de la fibra de la cápside las que determinan la especificidad de la célula blanco. [8]

Un hallazgo típico de la infección por Adenovirus es la presencia de una inclusión intranuclear central densa en el interior de la célula epitelial infectada, compuesta por ADN y proteínas víricas, que se forma al ensamblarse una cantidad exagerada de proteínas estructurales.(Figura 3)

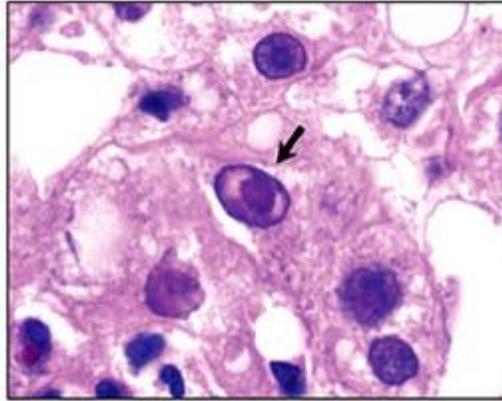


Figura 3. Célula hepática con la típica inclusión intracelular producida por Adenovirus

La viremia es la consecuencia de una replicación local del virus con la consiguiente difusión hacia otros órganos. (Figura 4) Ocurre con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos.

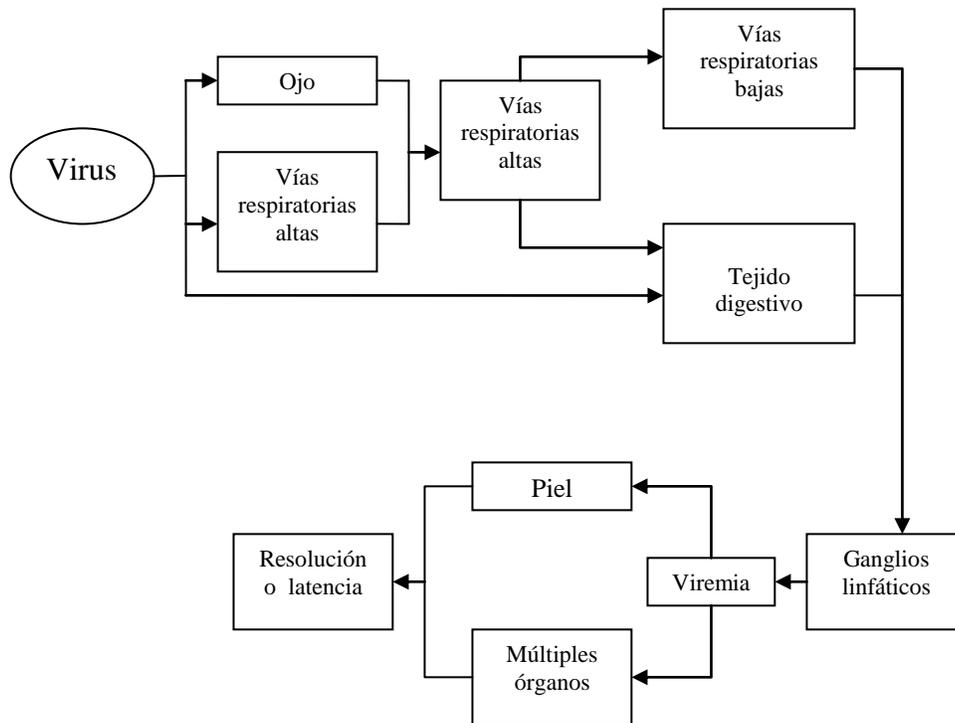


Figura 4. Esquema que muestra los mecanismos de diseminación de los Adenovirus dentro del organismo.

Una vez que el virus se ha internalizado y replicado puede permanecer en un estado de latencia y persistir en tejidos linfoides (adenoides, amígdalas, placas de Peyer) y existe la posibilidad de reactivarse, sobre todo en pacientes inmunosuprimidos o en aquellos con una coinfección.

A pesar de que algunos adenovirus, principalmente de los subtipos A y B, se pueden transformar y ser oncogénicos en células de roedores, no se han reportado casos en células humanas. Los anticuerpos son importantes en la resolución de las infecciones líticas por adenovirus y dan protección a los individuos frente a la reinfección por el mismo genotipo.

En adolescentes y adultos, la alta cantidad de anticuerpos circulantes protege contra la infección. Una vez reconocidas las células infectadas, éstas son destruidas por las células T citotóxicas. [5]

3.2.3.1. Infección abortiva

La interacción entre el virus y la célula hospedera puede ser bloqueada o inhibida dependiendo del grado de permisividad de la célula y la capacidad del virus para replicarse dentro de la célula y terminar de ensamblarse en ésta.

Un ejemplo de estas infecciones abortivas es el que se da entre el hA_v12 y las células de rata, en que el ADN viral es transportado al núcleo, donde parte del genoma se integra a la célula, generando oncogenes. Aunque en los estudios de los tumores humanos no se han encontrado genes o productos de genes que contengan genoma de adenovirus, no se descarta por completo, aunque la posibilidad es baja.

Cuando las amígdalas son removidas durante una infección aguda por adenovirus y se busca el genoma, éste se encuentra intacto dentro de todas las células. En contraste, después de algunos meses de una infección por adenovirus, al analizarse el tejido adenoidal se encuentran aún algunos fragmentos del genoma. [9] En estos casos se puede hablar de persistencia pero solo parcial, ya que lo que el genoma completo no permanece dentro de la célula.

3.2.3.2. Enfermedad similar a pertussis

En las infecciones del tracto respiratorio bajo las manifestaciones clínicas por adenovirus humano son: bronquiolitis, laringotraqueobronquitis y enfermedad similar tos-ferina (Síndrome Coqueluchoide); Este padecimiento respiratorio agudo se caracteriza por accesos violentos paroxísticos de tos que puede estar acompañada de cianosis, vómito, periodos de apnea y por un estridor inspiratorio conocido como “canto de gallo” (del francés coqueluche), por esta razón a este cuadro de tos se conoce como síndrome coqueluchoide [1].

El síndrome coqueluchoide secundario a adenovirus ha sido descrito desde hace varios años, y algunos autores describen que ocurre con mayor frecuencia que el originado por la misma *Bordetella pertussis*.

El diagnóstico de tos-ferina en el adolescente es particularmente difícil debido a la diversidad en la presentación clínica de la infección.

Los signos y síntomas de tos-ferina en el adolescente como rinorrea, lagrimeo, estornudos, conjuntivitis, fiebre, disfonía, hiperemia faríngea o tos, pueden ser moderados y pasar desapercibidos, y asemejarse más a otras infecciones más comunes como las ocasionadas por adenovirus, virus de parainfluenza o virus sincicial respiratorio.

En 1966 se describió la presencia de adenovirus tipo 5 en diversos órganos de casos fatales de pacientes con tos ferina grave con linfocitosis [10]. Aunque esta evidencia no explica por completo la relación de adenovirus con este síndrome, la frecuencia tan importante de aislados de este virus en estos pacientes puede deberse a que cuando *Bordetella pertussis* infecta el tejido epitelial ofrece condiciones favorables para la infección por adenovirus.[11].

3.2.4. Epidemiología

Las partículas de adenovirus resisten la desecación, los detergentes, las secreciones del tubo digestivo (ácido clorhídrico, proteasas y bilis) e incluso niveles bajos de cloro, por lo que pueden transmitirse por vía oral-fecal, fómites, e incluso por aguas recreativas mal clorinadas.

(Belshe RB, 1991) El contacto estrecho que se da entre los individuos en aulas, estancias infantiles y reclutamientos militares facilita la transmisión del virus. La afección ocular puede ocurrir de manera secundaria a una infección respiratoria, por tocarse los ojos después de haber tenido contacto con boca o nariz. La mayoría de las infecciones respiratorias causadas por Adenovirus son asintomáticas, lo que facilita en gran medida la dispersión en la comunidad. [12]

Además de que el tipo de infección también se encuentra asociada al tipo de receptores que reconoce la especie de adenovirus en el tejido blanco. (Ver tabla 1)

Una característica de las infecciones por adenovirus es el grado de variación estacional. Por ejemplo, los brotes de fiebre faringoconjuntival en escolares se da con mayor frecuencia en el verano, posiblemente por la mayor asistencia a aguas recreacionales. A diferencia de las infecciones del tracto gastrointestinal que no tienen una estacionalidad específica, las infecciones respiratorias por adenovirus predominan en de finales de invierno hasta principios del verano.

La población militar alrededor del mundo y a través de la historia ha sufrido considerablemente de infecciones respiratorias. Las condiciones de hacinamiento, exposición al ambiente, desafíos físicos, estrés y posibles fallas en la higiene, son considerados factores importantes que hacen a esta población vulnerable a enfermedades infecciosas [13] Los genotipos 4 y 7 fueron reconocidos como los responsables de infecciones respiratorias en población recluida. El impacto del adenovirus sobre este tipo de población favoreció el desarrollo de vacunas, siendo el primer intento, una vacuna parenteral de virus inactivados, pero fueron retiradas por su potencial oncogénico demostrado en hámsteres recién nacidos. Posteriormente se introdujo una vacuna oral contra genotipos 4 y 7, sin embargo no fue lo suficientemente segura, por lo que decidió dejar de producirse a pesar de haber demostrado hasta un 96% de eficacia en la población militar [13].

Las infecciones asociadas a Adenovirus han sido un problema de gran importancia entre los militares, entre 1971 y 1996 se aplicó una vacuna contra Ad4 y Ad7, que son los serotipos más comunes que aquejan a esta población, sin embargo la vacuna dejó de producirse en 1996 y tres años después cuando la vacuna se había agotado completamente se registró un aumento de

casos de infecciones respiratorias febriles causadas por este virus en la población mencionada, cerca del 67% de 22000 casos de infección respiratoria febril por año entre los militares fue causada por Adenovirus.

3.2.5. Diagnóstico

El método diagnóstico depende del tipo de enfermedad asociada a Adenovirus humano y el tipo de muestra obtenida. El diagnóstico de Adenovirus puede realizarse mediante métodos directos e indirectos.

Los métodos directos incluyen aislamiento en cultivo viral, detección de antígeno y detección de genoma, en tanto los indirectos son aquellos donde se emplean técnicas serológicas para la detección de anticuerpos aunque estos métodos se ven afectados cuando el paciente padece de inmunosupresión ya que existe una producción inadecuada o disminuida de anticuerpos.

3.2.5.1. Métodos directos

Detección directa de antígeno.

La detección directa de antígeno es una técnica ampliamente usada para el diagnóstico de infecciones respiratorias y gastrointestinales porque es rápida y tiene una sensibilidad alta con respecto al cultivo. Se realiza de dos maneras, mediante inmunofluorescencia especialmente usada en las muestras de exudados y biopsias; e inmunoensayo enzimático empleado generalmente en las muestras fecales. [14]; [15]

Inmunofluorescencia directa (IFA). La Inmunofluorescencia directa es la demostración de antígeno, se realiza mediante la utilización de un anticuerpo marcado con un fluorocromo (conjugado) que es específico para el antígeno que se ha de descubrir. Este proceso implica la preparación de un extendido en placa de la muestra, del tejido o de una monocapa celular

inoculada con la muestra, luego se fija, se coloca el conjugado con fluoresceína y después de una incubación y un lavado, la placa se observa en el microscopio de fluorescencia. La muestra, que puede ser un aspirado nasal, se concentra mediante centrifugación y se hacen placas que se fijan y se prueban con el antisuero para el virus por descubrir. La IFA también es útil para confirmar los hallazgos de cultivo viral y la combinación de estos dos métodos mejora el diagnóstico. (Lennette DA)

Inmunoensayos directos. Los inmunoensayos comprenden los ensayos de captura del antígeno (mejor conocidos como de sándwich) y inmunocromatografía. Son inmunoensayos en fase sólida donde se fijan los anticuerpos específicos para el virus en la superficie de una matriz, tubo o microplaca y luego se pone en presencia del suero o muestra que contiene el antígeno que se quiere demostrar; una vez ocurre la reacción antígeno-anticuerpo, se hace un lavado y se agrega un anticuerpo marcado, que depende de la marcación del anticuerpo. La prueba se denomina radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA o EIA) dependiendo del trazador que se utilice para evidenciar la reacción.

Se denomina RIA cuando el anticuerpo se marca con un isótopo radioactivo, el más utilizado es el yodo-¹²⁵, el anticuerpo que reacciona a manera de sándwich, se pega a los epítopes del antígeno que han quedado expuestos; después de varios lavados, se mide o cuantifica la radioactividad mediante un contador de centelleo. El número de destellos por minuto es directamente proporcional a la concentración del antígeno que reacciona y de acuerdo con una serie de estándares de concentración conocida, se realiza una curva y se extrapolan los valores de la muestra. [16]

En la técnica ELISA el anticuerpo se marca con una enzima que puede ser la fosfatasa alcalina (FA) o la peroxidasa de rábano (PR) y para revelar la reacción se coloca el sustrato específico para la enzima que es modificado por ésta y produce un compuesto coloreado. En el caso de la FA el sustrato es el paranitrofenilfosfato y para la PR es el peróxido de hidrógeno en una solución de ortofenilendiamina (OPD) que hace visible la reacción. Para la cuantificación se mide la absorbancia en una longitud de onda determinada en un espectrofotómetro, donde la absorbancia será directamente proporcional a la cantidad de antígeno descubierto. [21]

Otro método rápido de detección de antígeno es la inmunocromatografía y aglutinación en látex. Las partículas de látex son esferas de poliestireno que se unen fácilmente al fragmento cristalizante (Fc) de moléculas de inmunoglobulina G (IgG) o inmunoglobulina M (IgM). Los fragmentos de unión del anticuerpo (FAb) quedan expuestos y son capaces de unirse al antígeno que se encuentra en la muestra. Cuando los antígenos tienen varios epítopes (o estructuras antigénicas repetitivas), los anticuerpos multivalentes acoplados a múltiples partículas de látex se unen al antígeno y se produce un entramado de las partículas de látex que dan como resultado una aglutinación visible. Esta técnica se aplica ampliamente en el laboratorio de microbiología, porque es fácil de realizar, requiere sólo unos minutos y no necesita equipo, pues se lee a simple vista. Sin embargo, ofrece como desventaja la presencia de reacciones cruzadas sobre todo con otros antígenos en la muestra, además de que un exceso de anticuerpos no permite la formación del entramado. [17]

Aislamiento de virus

Las líneas celulares empleadas en el cultivo de Adenovirus son A549, Hep-2 y HeLa, estas son células de origen humano y en ellas pueden crecer las seis especies de Adenovirus. [18].

Todos los genotipos de Adenovirus, excepto los tipos 40 y 41, se han aislado en líneas celulares de epitelio humano y producen un efecto citopático caracterizado por agrupamiento de células en formas de racimos con cuerpos de inclusión dentro del núcleo. Los efectos citopáticos son generalmente visibles entre 2 y 7 días aunque pueden tardar hasta 28 días en aparecer [17]

Después de aislar el virus es posible determinar su patrón de hemaglutinación con los antisueros específicos.

Para que los resultados del aislamiento del virus sean significativos, deben proceder de una secreción relevante para los síntomas de la enfermedad, es decir muestras de lavado broncoalveolar, exudado nasofaríngeo cuando la infección sea del tracto respiratorio y secreciones lacrimales en el caso de la queratoconjunctivitis.

Microscopía electrónica

La microscopía electrónica permite visualizar la partícula viral debido a la gran resolución del microscopio electrónico. Para poder llevar a cabo esta técnica se utilizan dos tinciones especiales con sales de metales pesados como el uranio o el tungsteno. La primera es la tinción negativa donde el acetato de uranilo forma una especie de molde viral que permite detallar la estructura del virus. La segunda tinción es la del sombreado, donde las partículas virales se ponen en un ángulo donde el metal que se utiliza en ella se deposita sobre el virus pero no sobre su sombra y sólo se visualiza lo que no se ha cubierto con el metal. Esta técnica no revela las estructuras internas del virus sino su forma y dimensiones. El uso de equipo especializado y costoso, el elevado nivel técnico que requiere, la baja sensibilidad cuando hay un bajo número de partículas virales y el hecho de que en algunos casos la morfología no es suficiente para un diagnóstico viral definitivo, hacen que este sistema sea poco usado y sólo se emplee a nivel de investigación o académico. [17]

Los métodos convencionales como el cultivo tienen la desventaja de requerir tiempos prolongados para tener un resultado. Actualmente el desarrollo de las técnicas moleculares basándose en la amplificación de ADN utilizando el PCR como técnica estándar ha incrementado la sensibilidad y rapidez en el diagnóstico.

Reacción en cadena de la polimerasa

Otra herramienta de diagnóstico es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP, o mejor conocida como PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) y el análisis de sondas de ADN. Es preciso de emplear técnicas moleculares para detectar Adenovirus de tipo entérico, ya que no crecen en cultivos celulares habituales.

La Reacción en cadena de la polimerasa, mejor conocida como PCR (siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*) mediante esta técnica se pueden encontrar cantidades mínimas de del virus en una muestra clínica gracias a la amplificación selectiva y repetitiva de una secuencia de nucleótidos del patógeno.

La PCR consta de tres pasos:

- a) La desnaturalización del ADN en la muestra, lo que se logra al someterlo a altas temperaturas (entre 90 °C y 95°C) para lograr la separación de las cadenas,
- b) La hibridación de los cebadores (donde la temperatura depende de la secuencia de nucleótidos, pero oscila entre 50°C y 60°C) que son unos fragmentos cortos de ADN complementarios a los extremos 5' y 3' de las secuencias por amplificar y a partir de los cuales se inicia la síntesis. Los cebadores o bien llamados iniciadores son específicos de la secuencia del microorganismo que se ha de diagnosticar.
- c) La extensión de estos cebadores por la enzima ADN polimerasa termoestable (72° C) que produce dos bandas de ADN que son idénticas a la banda blanco original.

Estas reacciones se llevan a cabo de una forma automatizada en un equipo denominado termociclador, así en cada ciclo de estos tres pasos, se duplica el material genético hasta que éste se evidencia fácilmente en un gel de agarosa, adicionando un Bromuro de etidio que al unirse al ADN bicatenario forma un complejo que es visible bajo luz UV. Cuando el producto de PCR se visualiza en un gel de agarosa u otra gelatina se le conoce como PCR convencional. El uso de la PCR en los métodos de diagnóstico molecular ha incrementado al punto de ser considerada como la técnica estándar para el diagnóstico de agentes patógenos en muestras clínicas.

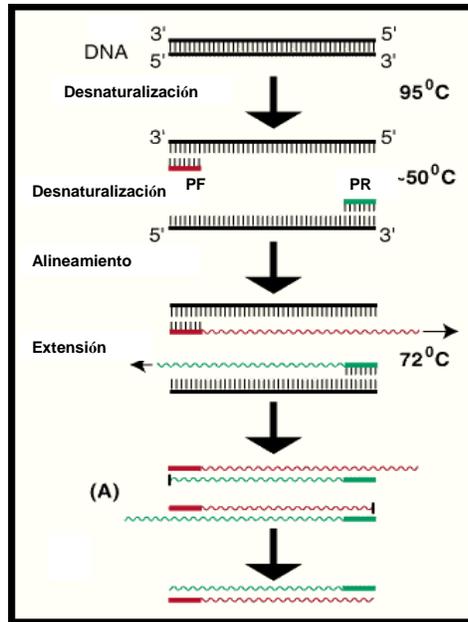


Figura 5. Representación gráfica de los pasos de la PCR durante un ciclo

PCR en tiempo real

La técnica de PCR tiempo real se basa en los mismos principios del PCR convencional, sin embargo utiliza sondas que son secuencias de nucleótidos unidos a una molécula de fluoróforo, que se unen a una región específica del producto amplificado, que dan una señal en una determinada longitud de onda y ésta es captada por el detector para así formar una curva de amplificación utilizando un software. Esto se basa en el principio de que la cantidad de luz emitida será proporcional a la cantidad de amplicones que se formen en cada ciclo.

El uso de la PCR tiempo real se ha incrementado en el diagnóstico molecular al punto de aceptarse como la técnica estándar en el laboratorio clínico. La PCR tiempo real tiene grandes ventajas, pues es rápida, altamente sensible, reproducible y reduce los riesgos de contaminación cruzada. Las desventajas que tiene esta técnica es que no es preciso saber el tamaño del amplicón detectado, aunque generalmente los productos tienen un tamaño pequeño (de 100 a 150 pares de bases) para ahorrar tiempo de elongación; otra desventaja es la incompatibilidad de algunas plataformas con algunos fluoróforos y la baja capacidad de detectar varias regiones amplificadas en

el mismo tubo de reacción, es decir, es muy difícil realizar una PCR múltiple en el mismo tubo de reacción, esto es debido a que el láser utilizado en los equipos de tiempo real tienen restringido a 5 longitudes de onda y cada fluoróforo se detecta a una diferente, por lo tanto no es posible detectar más de 2 fluoróforos debido a que no todos los fluoróforos son compatibles en una misma mezcla de reacción [19]

Limitaciones de las modalidades del PCR.

Utilizando PCR tiempo real se puede monitorear la fase temprana de la reacción, en cambio en el PCR convencional sólo se puede visualizar el producto de reacción hasta punto final del programa.

El PCR convencional tiene una baja sensibilidad comparada con el tiempo real; en una técnica convencional se pueden detectar mínimo 1000 copias de ADN, en cambio en PCR tiempo real se pueden detectar hasta menos de 10 copias. [19]

El PCR convencional a diferencia del Tiempo real no es un sistema automatizado, por lo tanto es un tanto impreciso pues el amplicón detectado sólo puede hacerse a través de la discriminación de tamaños y además de que los resultados obtenidos en un PCR tradicional no pueden ser expresados en números.

Finalmente el compuesto más utilizado para teñir los geles de agarosa y visualizar los productos de amplificación es el bromuro de etidio, que es altamente cancerígeno, un inconveniente en la seguridad del operador, una gran desventaja de la PCR convencional.

Una desventaja clara que tiene la PCR tiempo real con respecto a la tradicional es el costo de los reactivos, el precio se incrementa casi en un 100% en comparación a la técnica convencional.

La PCR realizada por tiempo real permite amplificar un fragmento de interés del patógeno en cuestión simplificando el trabajo con respecto a una PCR convencional, porque además de ser específica, altamente sensible, reproducible, reduce riesgos de contaminación entre las muestras.

3.2.5.2. Métodos indirectos

Las técnicas indirectas comprenden técnicas serológicas tradicionales, el objetivo principal es descubrir anticuerpos contra el Adenovirus en cuestión, teniendo en cuenta que la exposición al virus produce una respuesta por parte del sistema inmune que genera la producción de anticuerpos específicos. Estos ensayos se pueden clasificar en tres grupos con base en la cuantificación de la reacción antígeno-anticuerpo.

- a) Los que dependen de la capacidad del anticuerpo que se une al antígeno para ejercer alguna función no relacionada con el virus, por ejemplo: la fijación del complemento (FC), hemaglutinación indirecta (HI), aglutinación por látex.
- b) Los que miden la capacidad de los anticuerpos para bloquear la función viral específica como la neutralización
- c) Los que miden directamente la interacción antígeno-anticuerpo como por ejemplo: la inmunofluorescencia IFA indirecta, el RIA, ELISA y el Western blot.

Fijación de complemento (FC). La FC es un proceso de dos pasos, esta técnica emplea el complemento para lisar los eritrocitos que, a su vez, funcionan como indicadores. Durante el primer paso, el antígeno reacciona con el anticuerpo que se encuentra en el suero del paciente en presencia de complemento que generalmente se usa de suero de conejo previamente titulado. Si el antígeno y el anticuerpo reaccionan, se activa la vía clásica del complemento, luego se añade el indicador constituido por eritrocitos cubiertos con anticuerpos y de esta forma, si el complemento se fija y se activa por el complejo antígeno viral-anticuerpos del paciente, los eritrocitos no se lisarán. Si durante la primera fase no hay unión antígeno-anticuerpo el complemento permanece libre y se une al complejo indicador y produce la lisis de eritrocitos. Este es un sistema semicuantitativo y es una de las pruebas serológicas tradicionales utilizada como estándar de comparación para las nuevas pruebas comerciales.

Neutralización viral

Este ensayo mide funciones virales específicas, por lo que es bastante selectivo, de esta forma la neutralización viral sólo mide anticuerpos para antígenos específicos sobre la superficie viral. Si los anticuerpos se encuentran en el suero del paciente que se pone a incubar con una suspensión del virus, los anticuerpos reaccionarán con los antígenos virales, y cuando la suspensión se ponga en presencia de las células permisivas al virus (en cultivo celular) el resultado será la neutralización de la invasión celular y la no evidencia del efecto citopático.

En caso de no existir anticuerpos en el suero de paciente, se producirá la invasión celular y como consecuencia se hará evidente el efecto citopático característico. Para realizar esta prueba se debe disponer de líneas celulares adecuadas y por lo general se realiza en laboratorios donde se tiene toda la infraestructura para los cultivos celulares.

La visita se realizó en cada escuela dos veces por mes; un médico se entrevistó con los alumnos que presentaron algún síntoma respiratorio en el transcurso de los 15 días previos a la visita. El estudiante fue revisado por el médico y se le tomó la muestra en caso de haber presentado por más de 10 días; este mismo día se revisó el cuaderno para asegurar el llenado correcto.

4.2. Toma y transporte de muestra

A cada paciente se le toma una muestra utilizando un cepillo de dacrón con bastón de poliestireno (Puritan Medical Products).

Para tomar la muestra se pide al estudiante que tome asiento e incline su cabeza hacia atrás. Se introduce el cepillo por la fosa nasal hasta la nasofaringe, se gira el cepillo 2 o 3 veces para lograr impregnar de moco las cerdas, se retira rápidamente sin lastimar. (*Figura 1*)

El cepillo con muestras se introduce en un tubo con tapón de rosca con 1mL de Solución amortiguadora de fosfatos (SAF). Una vez hecho esto la muestra debe mantenerse en refrigeración (2 a 4°C) hasta su llegada al laboratorio. Ya estando ahí, debe registrarse en base de datos y comenzar con su respectivo tratamiento.

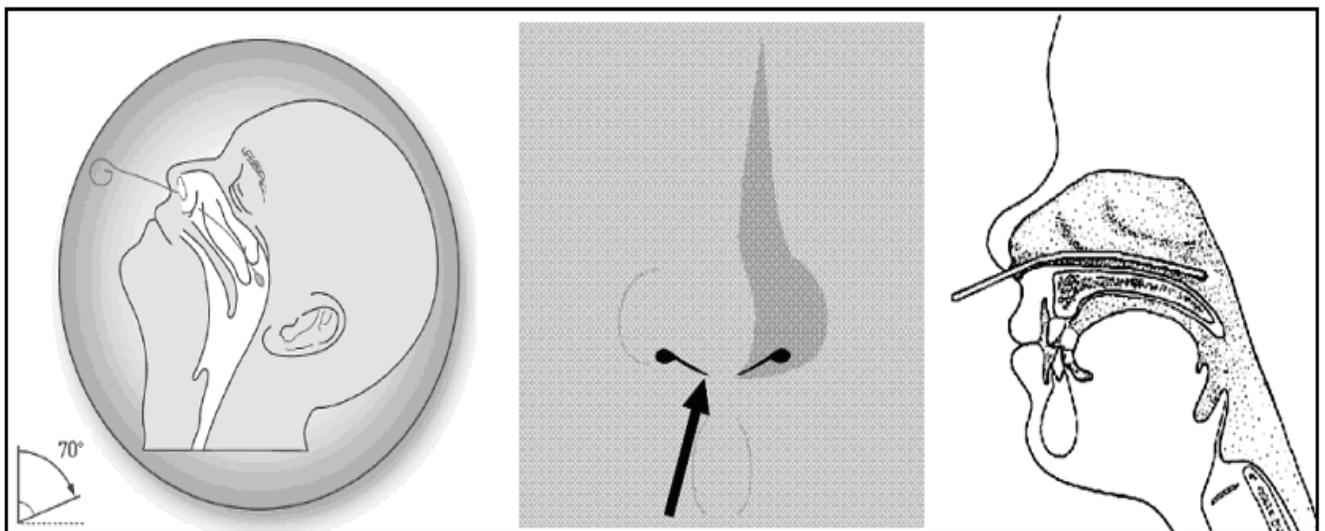


Figura 7. Proceso de la toma de exudado nasofaríngeo.

4.3. Obtención de material genético

4.3.1. Pre-tratamiento de la muestra

Homogenizar el tubo en vórtex durante 30 segundos, presionar el cepillo en las paredes del tubo con el fin de desprender la mucosidad adherida a las cerdas y retirarlo del tubo.

Tomar una alícuota de 300µL de muestra previamente homogenizada y colocarla en un tubo eppendorf de 1.5mL, agregar 1mg de proteinasa K (Invitrogen), posteriormente incubarlo a 55°C durante 15 minutos, durante este tiempo la proteinasa K y finalmente vuelve a incubarse durante 30 minutos a 37°C, permitiendo de esta manera que todo el tejido se desnaturalice. Todo el volumen de muestra incubada se transfiere a un tubo que contiene 2mL de solución de lisis.

El tiempo mínimo recomendado para asegurar la lisis completa es de 10 minutos a temperatura ambiente. En este tiempo cualquier partícula viral y célula presente en la muestra será desintegrada liberando los ácidos nucleicos y además inactivando cualquier RNAsa y DNAsa.

4.3.2. Extracción de ADN

Colocar la muestra contenida en la solución de lisis en el contenedor del equipo extractor *NuclieSens easyMAG* y agregar la cantidad de sílice necesaria. Las partículas de sílice actúan como fase sólida que retiene los ácidos nucleicos, son lavadas varias veces y finalmente estos son purificados y eluidos de la fase sólida

Acomodar el contenedor en el equipo semiautomático *NuclieSens easyMAG* (Biomérieux), usar el protocolo sugerido por la compañía para muestras de exudado nasofaríngeo eluyendo a un volumen final de 60µL.

Alicuotar el DNA extraído en dos tubos con 30 µL cada uno y conservarlo a una temperatura de -20°C.

4.4. PCR-Tiempo real

4.4.1. Iniciadores y sondas

Los iniciadores y sondas utilizadas para el ensayo de PCR-tiempo real fueron diseñados previamente por Z. Gu [20] utilizando la región conservada del gen que codifica para el Hexón de 26 serotipos de las especies A-E, quedando excluida la especie F por estar más asociada a enfermedades entéricas. (Ver tabla 1). Para estos autores la especificidad de las secuencias de los oligos y sondas se evaluó comparándose con secuencias de otros organismos eucarióticos con el fin de evitar falsos positivos

Los *primers* utilizados en este trabajo fueron sintetizados por la compañía Sigma, en tanto que las sondas fueron manufacturadas por Applied Biosystems. Estas últimas fueron marcadas del lado inicial 5' con el fluoróforo reportero (*reporter*) 6-carboxifluoresceína (FAM) y en el extremo terminal 3' con 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) como molécula extintora (*quencher*).

Nombre	Secuencia (5'-3') [*]	Especie reconocida por la secuencia
Iniciador		
DGF	AGACATGACHTTYGAGGTGGAYCC	AdV (24 tipos)
DGR	CGCAGGTASACBGYYTCRA	AdV (25 tipos)
31F	AGATATGACATTTGAAGTTGACCCC	AdV31
31R	CGCAGATAGACCGCTTCAATG	AdV31
4F	AGACATGAATTTCGAAGTCGACC	AdV4
Sondas		
98A12	TACGCATTCACCAGCCACACCCGC	AdV12
98A18/31R	CGCACCACGTCGAAAACCTTCAAACA	AdV18, AdV31
98B1	CAGAGTGCACCAGCCACACCCGC	Especie B (tipos 3, 7, 7a, 16, 21, 50)
98B2	TCAGAGTGCATCAGCCACACCCGC	Especie B (tipos 11, 14, 34, 35)
98C	TCCGTGTGCACCAGCCGCAC	Especie C (tipos 1, 2, 5, 6)
98D 21	TCAGAGTGCACCAGCCGCACC	Especie D (tipos 8-10, 19, 28, 37, 48)
98E4	TCCGAGTGCACCAGCCCCAC	Especie E (tipo 4)

^{*} Abreviaturas para las degeneraciones en los iniciadores: B: C/G/T; H: A/C/T; R: A/G; S: G/C; Y: C/T.

Tabla 4. Secuencias de *primers* y sondas empleados para la detección de Adenovirus Humano

4.4.2. Condiciones de PCR-Tiempo real

La amplificación se lleva a cabo en un volumen final de 25 μL , utilizando 5 μL de extracto de ADN, 12.5 μL de TaqMan Mezcla Maestra Universal (*Applied Biosystems*) y 7.5 pmol de cada primer y sonda. Se utiliza un control interno para asegurar la autenticidad de las muestras negativas y descartar la posibilidad de inhibición de PCR. Este control interno es conocido como IPC por sus siglas en inglés (*Internal Positive Control*), consta de una mezcla de PCR que contiene iniciadores, sonda, enzima, desoxinucleótidos (dNTP's) y ADN específicos para amplificar un fragmento como referencia. El amplicón del IPC es una secuencia desconocida, no hay detalles acerca de este pues la patente lo limita.

La amplificación y detección se realizó en el equipo 7500 PCR-tiempo real, bajo el programa que compuesto por las siguientes condiciones:

- Un paso de activación de la enzima polimerasa AmpliTaq Gold[®] y desnaturalización de ADN conformado de un ciclo de 2 minutos a 50°C para activar la polimerasa, seguido de un ciclo durante 10 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN de doble cadena presente en la mezcla de reacción.
- Etapa de amplificación que consta de 45 ciclos que a su vez están conformados por pasos de desnaturalización, alineación de iniciadores y elongación a 95°C durante 15 segundos, 52°C por 40 segundos y 60°C durante 45 segundos respectivamente.

4.5. Amplificación del fragmento a secuenciar

Los fragmentos a secuenciar se amplificaron por técnica de PCR convencional utilizando los primers de Casas [6] (Tabla 5) que permiten amplificar parte de la región conservada del gen que codifica para el Hexón de todos los genotipos de Adenovirus excluyendo los Adenovirus entéricos, con un producto de amplificación de 475 pb.

Nombre Iniciador	Secuencia (5'-3')*
ADHEX1F	CAACACCTAYGASTACATGAA
ADHEX1R	KATGGGGTARAGCATGTT
ADHEX2F	CCCITTYAACCACCACCG
ADHEX2R	ACATCCTTBCKGAAGTTCCA

* Abreviaturas para las degeneraciones en los iniciadores: B: C/G/T; H: A/C/T; R: A/G; S: G/C; Y: C/T.

Tabla 5. Secuencias de los *primers* empleados para la secuencia de Adenovirus Humanos

La PCR se realizó con 5 µL de ADN extraído, 5 µL de amortiguador 10X, 2.5 mM de MgCl₂, 30pmol de los primers ADHEX1R y ADHEX1F, 0.2mM de dNTP's y finalmente 3 U de AmpliTaq. Todos los reactivos exceptuando los primers son manufacturados por Applied Biosystems.

Las condiciones de la PCR fueron, un ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de un minuto a 95°C, un minuto a 50°C y un minuto a 72°C, con un ciclo de extensión final durante 5 minutos a 72°C.

Obteniéndose los productos de amplificación que fueron visualizados en geles de agarosa al 2%. Las bandas amplificadas para cada muestra deben cortarse con un bisturí para seguir con el proceso.

En el caso en que no se obtuvo un banda de amplificación en el primer intento, se reamplificó utilizando los primers ADHEX2F y ADHEX2R y la primer PCR se empleó como si fuera ADN, siguiendo las mismas condiciones de reacción y temperaturas.

4.6. Limpieza de productos de gel embebidos en gel de agarosa (Kit MinElute DNA[®])

La limpieza de las bandas amplificadas por medio de PCR convencional se limpiaron, con el fin de eliminar agarosa, dNTP's, colorantes, residuos de MgSO₄, primers, ADN polimerasa y demás reactivos de la mezcla de reacción.

Esta limpieza se realizó con un Kit especial para limpieza llamado MinElute Gel Extraction (QIAGEN)

Este sistema de limpieza está especialmente diseñado para el aislamiento de forma fácil y rápida de fragmentos de ADN de reacciones de PCR presentes en geles de agarosa o reacciones enzimáticas, teniendo como resultado una concentración alta de productos de PCR al final del proceso.

Durante la limpieza, las impurezas presentes se eliminan incluyendo las enzimas independientemente del tamaño y estructura secundaria, entre las enzimas están la ADN polimerasa, fosfatasa alcalina, ADN ligasa, además de eliminar sales y oligonucleótidos.

El sistema MinElute combina la comodidad de la tecnología de spin-columna con la propiedad del enlace selectivo de una membrana de sílice, al que se queda anclado el ADN hasta el momento de la elución.

La adsorción del ADN a la membrana depende del pH y de la concentración de sales presente, los amortiguadores empleados están optimizados para la recuperación eficiente de ADN y la eliminación de contaminantes, proporcionan la concentración de sal correcta y pH de adsorción de ADN a la membrana (pH óptimo 7.5)

El ADN se adsorbe en la membrana de sílice en presencia de las altas concentraciones de sal, mientras que los contaminantes pasan a través de la columna, son arrastrados de manera eficiente.



Figura 8. Vista de la columna MinElute

Además, se debe almacenar ADN a -20°C cuando sea eluida con agua, ya que puede degradar el ADN en ausencia de un agente de amortiguador. Elución con TE amortiguador (10 mM

Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) es posible, pero no es recomendable porque EDTA puede inhibir posteriores reacciones enzimáticas.

Procedimiento

Puntos importantes antes de iniciar la limpieza:

- El color amarillo de amortiguador QG indica un valor de $\text{pH} \leq 7$
- Los pasos de centrifugación se llevan a cabo a 17 000 x g (13 000 rpm) en un centrifuga de mesa convencional a temperatura ambiente.

1. El fragmento de ADN contenido en el gel de agarosa debe cortarse con un bisturí limpio, debe ser sólo la parte donde se encuentra la banda, de esta manera evitamos agarosa extra.

2. Pesarse la fracción de gel en un tubo incoloro. Añadir 3 volúmenes de amortiguador QG a 1 volumen de gel (100 mg). Por ejemplo, añadir 300 μl de amortiguador QG por cada 100 mg de gel. Para geles de agarosa $>2\%$, añadir 6 volúmenes de amortiguador QG. La cantidad máxima de gel es de 400 mg.

3.- Incubar a 50 °C durante 10 minutos (o hasta que el fragmento de gel se haya disuelto completamente). Para ayudar a disolver gel debe el tubo mezclarse usando un vórtex cada 2 ó 3 minutos durante la incubación.

4.- Después de que se haya disuelto completamente el gel, se comprueba que el color de la mezcla sea amarillo (similar al amortiguador QG sin agarosa disuelto).

Nota: Si el color de la mezcla es naranja o violeta, añadir 10 μl de acetato de sodio 3 M, pH 5.0 y mezclar, con ello el color de la mezcla se volverá amarillo. La adsorción de ADN a la membrana es eficiente sólo a $\text{pH} \leq 7.5$. El amortiguador QG contiene un indicador de pH que es amarillo a $\text{pH} \leq 7.5$ y naranja o violeta a pH superior, esto hace fácil la determinación del pH óptimo



Figura 9. El indicador contenido en el amortiguador QG permite evidenciar fácilmente del pH óptimo.

5. Añadir 100 μ L de isopropanol a la muestra y mezclar invirtiendo el tubo varias veces. En esta etapa no centrifugar la muestra.
6. Coloque una columna MinElute en un tubo de colección de 2 ml en una gradilla. Para unir el ADN, colocar la muestra en la columna MinElute y centrifugar durante un minuto a 13 000 rpm. Para la recuperación máxima, transferir toda la muestra a la columna, de ser necesario centrifugar más de una vez, pues el volumen máximo de la columna es 800 μ l.
7. Descartar el sobrenadante y colocar la columna de MinElute en el mismo tubo de colección.
8. Añadir 500 μ l de amortiguador QG a la columna y centrifugar durante un minuto a 13 000 rpm. Este lavado permite asegurar la eliminación total de gel que haya aún en la membrana.
9. Descartar el sobrenadante y colocar la columna MinElute en el mismo tubo de colección.
10. El siguiente lavado se realiza añadiendo 750 μ l de amortiguador PE la columna MinElute y centrifugando durante un minuto a la misma velocidad.
11. Descartar el sobrenadante y centrifugar la columna de MinElute durante un minuto adicional. Nota: el etanol residual del amortiguador PE no se eliminará por completo a menos que el sobrenadante se descarte antes de esta centrifugación adicional.
12. Colocar la columna de MinElute en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL.
13. Para eluir el ADN, agregar 15 μ l de amortiguador EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5), dejar reposar la columna durante un minuto y a continuación centrifugar el mismo tiempo y velocidad que los pasos anteriores.
14. Agregar 15 μ l más de amortiguador de elución a la columna y centrifugar a las mismas condiciones, con este segundo paso de elución arrastramos por completo el ADN.

Al final de este paso se cuenta con un producto de PCR limpio, al cual se le midió la concentración en gel al 1%, ya que para seguir con el proceso de secuenciación se debe trabajar con concentraciones de ADN adecuadas en cada reacción de secuencia.

4.7. Marcaje del producto amplificado y secuencia automática

La secuenciación automática se basa en realizar la cadena complementaria del fragmento de ADN de interés empleando dNTP's marcados con una fluoróforo diferente para cada uno de los cuatro nucleótidos (A, T, C y G), sin embargo en la mezcla de reacción están presentes los

didioxinucleótidos (ddNTP's), conocidos también como terminadores, pues al carecer del grupo –OH en 3', una vez que la ADN polimerasa une un ddNTP, la cadena se termina, y no hay más manera de unir otro nucleótido. Ya que los ddNTP's se unen al azar los fragmentos que se van sintetizando serán de distintos tamaños en cada ciclo. Dentro del secuenciador, al atravesar el capilar, los fragmentos que van corriendo a través de la electroforesis capilar son leídos a través de un láser; atraviesan primero los fragmentos más pequeño. El color con el que está marcado cada fragmento corresponde a un determinado nucleótido, es así como el secuenciador va registrando cada nucleótido y lo va registrando para luego dar un electroferograma.

Procedimiento para realizar la reacción de marcaje

El marcaje se realizó con el Kit BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), cada reacción se emplea 4 µl de Ready Reaction Premix, que es una mezcla que contiene los dNTP's marcados y los ddNTP's, la ADN polimera, 2 µl de BigDye Sequencing Amortiguador, este favorece las condiciones necesarias para llevarse a cabo la reacción, 3.2pmol de primers (estos primers son los de Casas et al) y 10 ng del producto de PCR.

Las condiciones para marcar fueron 96°C durante un minuto, 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos. Nótese que la temperatura de extensión (60°C) es de un tiempo prolongado para dar suficiente tiempo a que las cadenas de diferentes tamaños puedan sintetizarse.

Terminando el programa, el volumen de la reacción se coloca en una columna que contiene una sílica que atrapa los ddNTP's y los dNTP's marcados para evitar la saturación del láser.

El sobrenadante debe ser igual a 20 µL, los tubos se introducen en una centrífuga de vacío para poder evaporar todo el líquido contenido en los tubos, finalmente el producto sólido adherido a las paredes del tubo debe hidratarse con 20 µL de formamida. Este volumen se coloca en una placa de 96 pozos para poder colocarse en el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

Resultados y Análisis de Resultados

5.1. Estacionalidad de los casos

De los seis meses que duró el estudio, el mes en el que se obtuvo la mayor cantidad de fue el mes de de noviembre del 2008, cerca del 30% del total de las muestras. Entre diciembre y enero se tomó una cantidad menor de muestras en comparación con los otros meses y esto puede deberse al periodo vacacional de las escuelas.

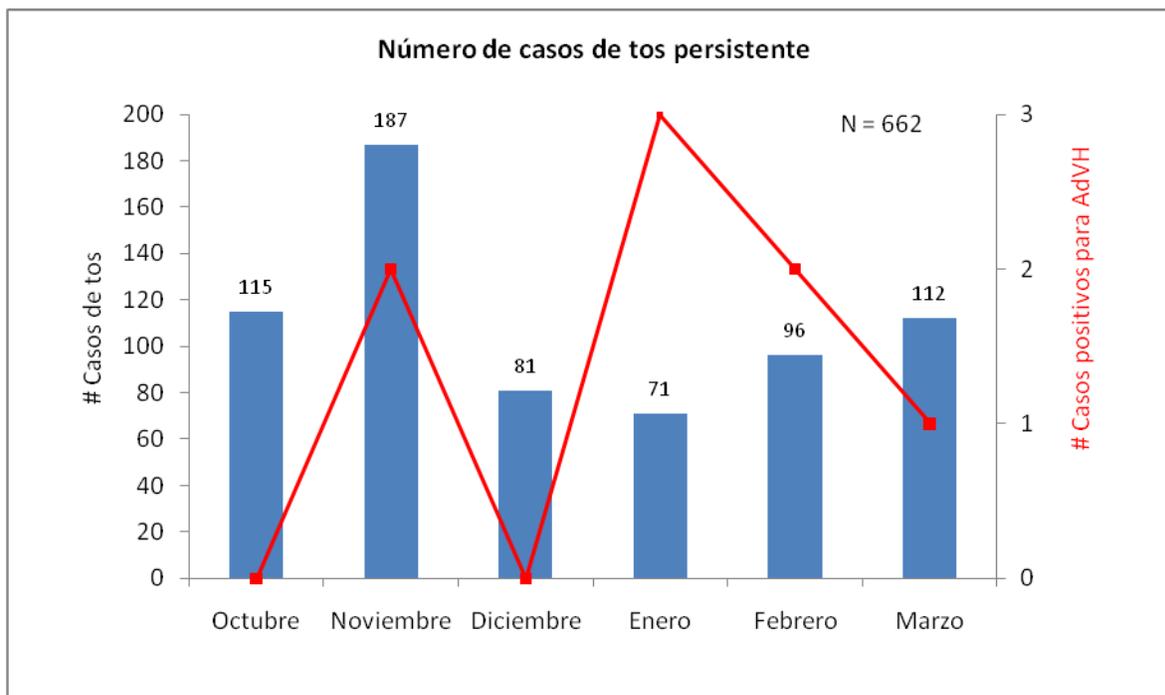


Figura 10. Distribución del número de casos registrados con respecto al tiempo de estudio

5.2. Manifestaciones clínicas

De la información contenida en el cuadernillo de cada estudiante incluido en el estudio, se pudo obtener una serie de síntomas en común que se presentaron en la población estudiada. Las manifestaciones clínicas se describen en la Tabla 6.

Síntoma	n	(%)
Escurrecimiento nasal	507	76.6
Resfriado	450	68.0
Tos paroxística	227	34.3
Tos seca o tos productiva	197	29.7
Estridor inspiratorio	184	27.8
Vómito	162	24.5
Dificultad para respirar	136	20.5
Falta de aliento	120	18.1
Sibilancias	97	14.7
Palidez	27	4.1
Total	662	

Tabla 6. Manifestaciones clínicas en los estudiantes participantes en el estudio

Generalmente los alumnos presentan un cuadro de resfriado al iniciar con los síntomas, por este motivo es indistinguible la infección por Adenovirus de las infecciones por el Virus de Influenza A, virus de Parainfluenza, Virus de Influenza B y Virus Sincicial Respiratorio, y no hay manera de diferenciarse con sólo tener los síntomas clínicos.

La tos paroxística se describe como aquel ataque intenso de tos provocado por la tosferina, que se caracteriza por episodios paroxísticos que terminan en una inspiración ruidosa, a diferencia de la tos seca que es repetitiva breve y débil.

5.3. Adenovirus detectados mediante RT-PCR

Se evaluaron 662 muestras, de estas se obtuvieron 8 muestras positivas para Adenovirus mediante la técnica de PCR tiempo real. Como control positivo se empleó una mezcla de ADN de Adenovirus tipo 1 (AdH1), Adenovirus tipo 3 (AdH3) y Adenovirus tipo 5

(AdH5), cepas correspondientes al catálogo de *American Type Culture Collection* (ATCC) con números de identificación Correspondiente ATCC VR-1, ATCC VR-847 y ATCC VR-5D.

La curva de amplificación del control positivo interno (IPC) apareció en todas las muestras problema que se analizaron, por lo tanto se aseguró que la reacción se llevó correctamente a cabo en cada uno de los tubos de reacción.

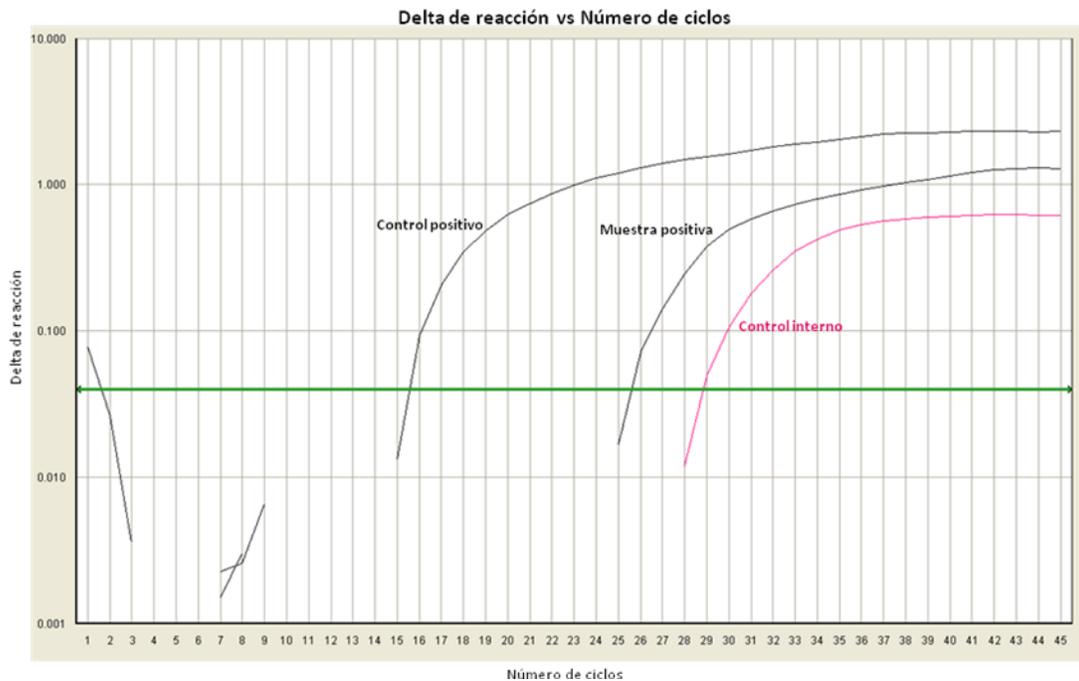


Figura 11. Diagrama del PCR- tiempo real, mostrando las curvas de amplificación del control positivo para Adenovirus, muestra positiva y el control interno positivo (IPC).

Este tipo de gráficas se ajustan al número de ciclos del programa de la PCR y se grafica el delta de reacción, es decir la diferencia de la fluorescencia emitida al final del ciclo dónde el láser efectúa la lectura menos la fluorescencia basal, de esta manera se registra sólo la fluorescencia emitida por la sonda específica en el momento de amplificar el fragmento deseado.

Después del ciclo 40 las curvas de amplificación no son confiables, ya que puede existir degradación de la sonda sin haber una amplificación específica, o se puede llegar a dar el caso de dimerización con los cebadores e hidrolizar la sonda lo que daría una señal detectable para el equipo.

Aunque la finalidad de la PCR-tiempo real en este trabajo no es de carácter cuantitativo, existe una observación muy notoria: el control positivo comienza a ser detectado en el ciclo 15, mientras que la muestra positiva aparece hasta el ciclo 25, esto se debe a que la concentración de ADN del control positivo es más alta con respecto a la concentración de la muestra.

Las ocho muestras identificadas por PCR tiempo real corresponden al 1.2 % del total de los exudados muestreados, esta cifra es mucho menor comparado con el estudio de Dora P. Rosete *et.al.* realizado con niños mexicanos entre 6 y 12 años con infección respiratoria aguda, donde reporta que el 23 % de la población de su estudio (N=100) fue afectada por adenovirus de la especie C. [1]

5.4. Genotipificación de Adenovirus

A las 8 muestras positivas para Adenovirus humanos que dieron positivo empleando la PCR-tiempo real, se les realizó la PCR convencional. La banda que corresponde a la amplificación del gen que codifica para el Hexón se observó a la altura de 400 y 500 pares de bases. Algunas bandas se observan con una mayor intensidad en comparación con otras, esto posiblemente se deba a la concentración de Adenovirus en cada muestra problema.

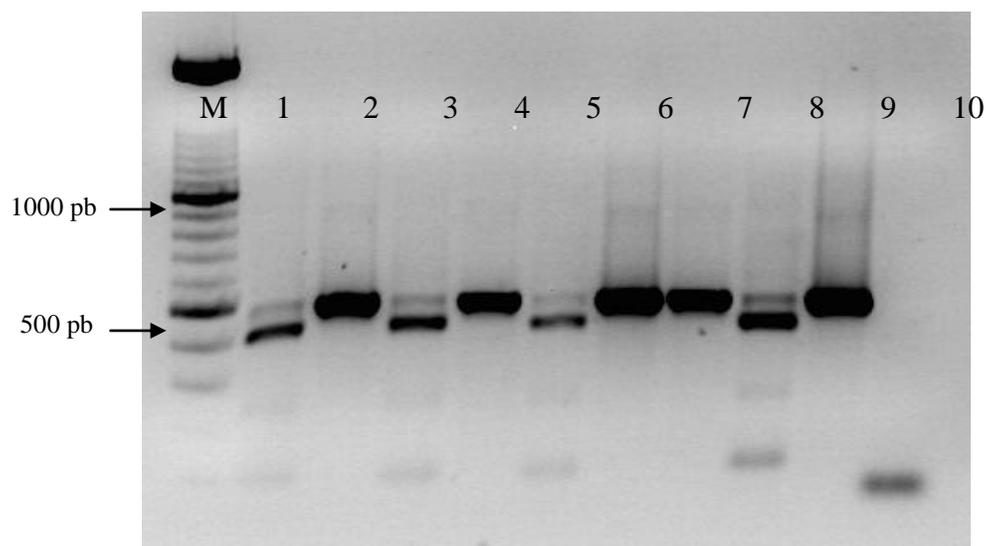


Figura 12. Fragmento del Hexón en muestras positivas. Carril M: Marcador de peso molecular XIV (Roche Diagnostics). Carril 1: Muestra 218; Carril 2: Muestra 514; Carril 3: Muestra 285; Carril 4: Muestra 550;

Carril 5: Muestra 562; Carril 6: Muestra 554; Carril 7: Muestra 641; Carril 8: Muestra 499; Carril 9: Control positivo de Adenovirus. Carril 10: Control negativo. Tamaño de amplicón 475 pares de bases.

Debe notarse que en los carriles 1, 3, 5 y 8 se observan dos bandas, sin embargo la banda de interés es la más cercana a la banda de 500 pares de bases, por lo que la banda inferior queda descartada. Con las bandas tenues de aproximadamente (475 pares de bases) no podría realizarse la secuenciación por estar un poco débiles, por esta razón fue necesario re-amplificar estas cuatro muestras, para ello se realizó una vez más el PCR convencional tomando como ADN la mezcla obtenida del primer PCR, con el fin de lograr un mayor grosor en la banda buscada.

Al cortar estas bandas se debió tener un cuidado especial en no cortar parte de la banda inferior, de esta manera sólo se secuenció el amplicón de 475 pares de bases.

Las ocho bandas obtenidas se limpiaron con el sistema miniElute, posteriormente se prepararon para el marcarje y finalmente se metieron al secuenciador para poder obtener las secuencias en la computadora que se encuentra adaptada al equipo.

La amplificación por medio de la PCR convencional se realizó por duplicado, en días diferentes para poder asegurar la autenticidad de la secuencia obtenida.

De las ocho muestras sólo pudo obtenerse la secuencia de siete, de una muestra fue insuficiente la cantidad y por lo tanto no pudo ser secuenciada.

Las secuencias obtenidas se analizaron en el software Mega 4 ©, con el propósito de obtener un árbol filogenético.

Sólo dos genotipos fueron identificados: Adenovirus Humano 2 y Adenovirus Humano 5, ambos pertenecientes a la especie C.

Cuatro muestras corresponden al genotipo 5 y las tres restantes al genotipo 2. La información que nos provee un árbol filogenético es saber que tanto se parecen entre si las secuencias analizadas; en este caso las secuencias se comparan con dos cepas que están bien caracterizadas, pues fueron las primeras cepas reportadas de Adenovirus 2 y 5. La línea de abajo indica el porcentaje de diferencia entre las cepas analizadas, de esta manera la distancia de las líneas horizontales es lo que da el porcentaje de diferencia en la

secuencia. Entre las secuencias de la muestra Bp318 y Bp285 no hay diferencia alguna, estos dos pacientes fueron infectados con la misma cepa a pesar de no pertenecer a la misma escuela. Entre la muestra Bp554 y Bp499 existe un poco menos del 0.005% de diferencia que finalmente no es un porcentaje significativo en comparación con la cepa reportada (Adenovirus 5 Hexón, acceso GenBank M73260).

El caso es similar con el Adenovirus 2 Hexón (acceso GenBank J01917) aunque la muestra Bp550 es prácticamente igual a la cepa que se toma como referencia. Finalmente esto ayuda a deducir que no se dan mutaciones en el gen del Hexón, ya que las cepas de referencia empleadas para el análisis datan de 1986 y 1992.

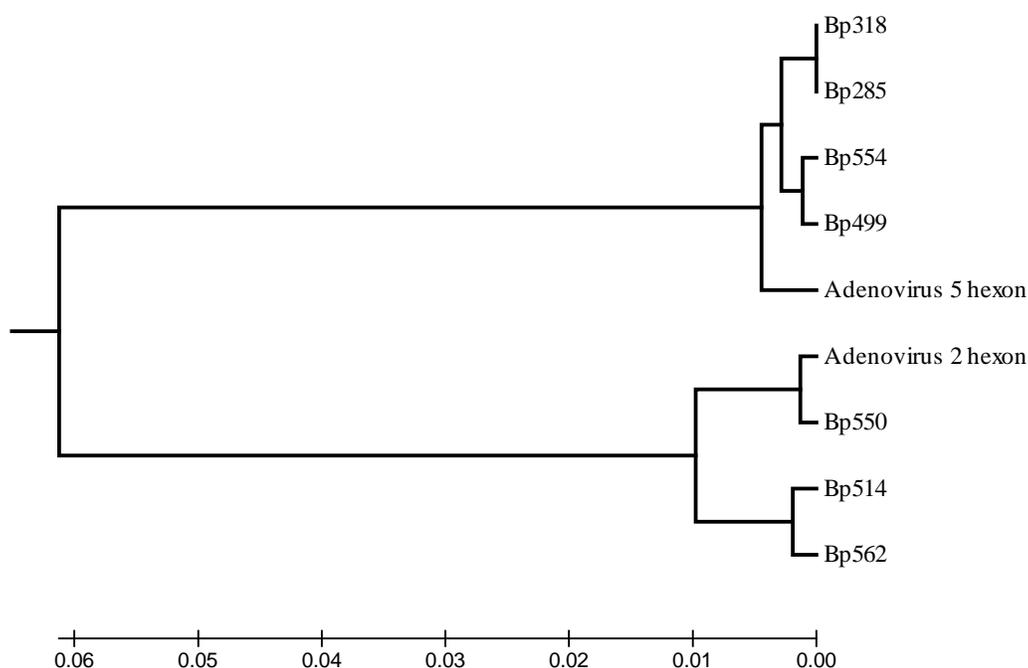


Figura 13. Análisis filogenético de los Adenovirus identificados en las muestras de los estudiantes.

Variable	Sujeto1	Sujeto2	Sujeto3	Sujeto4	Sujeto5	Sujeto6	Sujeto7	Sujeto8
# Laboratorio	554	514	285	550	218	641	499	562
Años	12	13	12	13	13	15	13	13
Género	Femenino	Masculino	Masculino	Femenino	Masculino	Masculino	Femenino	Femenino
Fumador activo	No	No	No	No	No	No	No	NI
Convive con	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	NI

fumadores								
Duración de tos (días)	25	14	17	25	30	21	30	17
Tos paroxística	Si	Si	No	No	Si	No	Si	NI
Vómito provocado por tos	No	Si	No	No	No	Si	No	NI
Falta de aliento	Si	Si	No	Si	No	No	No	NI
Tos nocturna	Si	si	No	Si	No	No	No	NI
Resfriado	Si	Si	No	Si	Si	si	No	NI
Rinorrea	No	Si	No	Si	Si	Si	Si	NI

Tabla 7. Síntomas de los sujetos positivos para Adenovirus Humano. NI. No hay información.

Los adolescentes sufren infecciones agudas del tracto respiratorio de la misma manera que los demás grupos de edad, sin embargo no hay muchos estudios en esta población, por lo mismo es prácticamente desconocida la etiología viral en estas infecciones.

El encontrar que Adenovirus especie C está asociado a periodos de tos prolongados se puede asociar a esta especie a las infecciones respiratorias de las vías altas, pues es sabido que los serotipos 1, 2, 5 y 6 infectan a más del 80% de la población en los primeros 5 años de vida.

Es de suma importancia tener un diagnóstico claro para efectuar un adecuado tratamiento de la infección, en esta población estudiada 231 estudiantes (35%) ingirió algún antibiótico entre los que se encuentran eritromicina, azitromicina, claritromicina, trimetoprim/sulfametoxazol, tetraciclinas, amoxicilina que podrían conferir resistencia a bacterias del mismo tracto respiratorio y además de bacterias gastrointestinales. Aunque para el caso de las 8 muestras positivas para adenovirus no presentaron ingesta previa de algún antibiótico, no por esto deja de ser preocupante el hecho de ingerir antibióticos sin un diagnóstico previo.

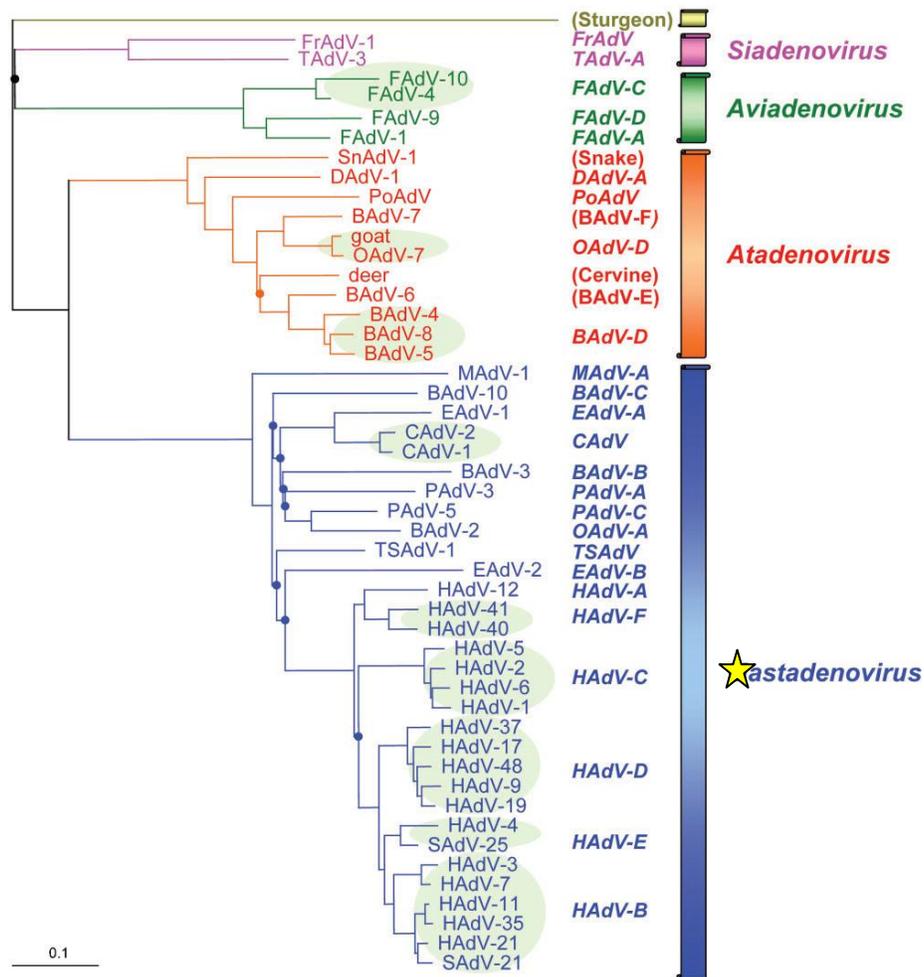


Figura 14. Árbol filogenético de la familia Adenoviridae. Las abreviaciones en los nombres de los virus al final del nombre indica a qué animal afecta, B bovino; C canino; D pato; E equino; F aves; Fr rana; H humano; M ratón murino; O ovino; P porcino; Sn víbora; T pavo.

Tomado de Genetic content and evolution of adenoviruses. Journal of General Virology (2003), 84, 2895–2908

Debido a la similitud de los síntomas clínicos provocados por adenovirus y *Bordetella pertussis* se decidió realizar este trabajo, y aunque dentro de los objetivos citados en este proyecto no está identificar dicha bacteria, debo mencionar que tan sólo seis de las muestras dieron positivo para la identificación de *B. pertussis* y tan sólo un muestra (Bp 550) dio positivo para la identificación de ambos patógenos, con lo que queda evidenciado que durante el mismo cuadro clínico puede darse la presencia de agentes virales y bacterianos sin distinción alguna hasta el diagnóstico en el laboratorio.

Conclusiones

- Este es el primer estudio en México que asocia la tos persistente con un agente viral bien identificado, además de describir los síntomas clínicos en los pacientes afectados por Adenovirus humano.
- Según los datos aportados en este trabajo, la especie C de Adenovirus, en particular los serotipos 2 y 5 están relacionados con el cuadro de tos persistente en la población adolescente entre los 12 y 15 años.
- El gen que codifica para el Hexón de Adenovirus humano ha tenido muy poca variación (menos del 0.01%) dentro del mismo serotipo con respecto a las secuencias reportadas inicialmente en la década de los 80's en Estados Unidos.
- El correcto diagnóstico del agente etiológico en una infección es de suma importancia para la vigilancia de las infecciones que se presentan en las comunidades y dentro de las instituciones de salud.

Bibliografía

1. Rosete, D.P., M.E. Manjarrez, and B.L. Barron, Adenoviruses C in non-hospitalized Mexican children older than five years of age with acute respiratory infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2008. 103(2): p. 195-200.
2. Davison, A.J., M. Benko, and B. Harrach, Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*, 2003. 84(Pt 11): p. 2895-908.
3. Zhang, Y. and J.M. Bergelson, Adenovirus receptors. *J Virol*, 2005. 79(19): p. 12125-31.
4. Miura-Ochiai, R., et al., Quantitative detection and rapid identification of human adenoviruses. *J Clin Microbiol*, 2007. 45(3): p. 958-67.
5. Blasiole, D.A., et al., Molecular analysis of adenovirus isolates from vaccinated and unvaccinated young adults. *J Clin Microbiol*, 2004. 42(4): p. 1686-93.
6. Casas, I., et al., Molecular identification of adenoviruses in clinical samples by analyzing a partial hexon genomic region. *J Clin Microbiol*, 2005. 43(12): p. 6176-82.
7. Avellon, A., et al., Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 2001. 92(2): p. 113-20.
8. Sarantis, H., et al., Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol*, 2004. 42(9): p. 3963-9.
9. Adhikary, A.K., et al., Identification of subgenus C adenoviruses by fiber-based multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 2004. 42(2): p. 670-3.
10. Collier, A.M., J.D. Connor, and W.R. Irving, Jr., Generalized type 5 adenovirus infection associated with the pertussis syndrome. *J Pediatr*, 1966. 69(6): p. 1073-8.
11. Nordmann, P., et al., Whooping cough associated with *Bordetella parapertussis* in a human immunodeficiency virus-infected child. *Pediatr Infect Dis J*, 1992. 11(3): p. 248.
12. Harrach, B. and M. Benko, Phylogenetic analysis of adenovirus sequences. *Methods Mol Med*, 2007. 131: p. 299-334.
13. Russell, K.L., et al., Vaccine-preventable adenoviral respiratory illness in US military recruits, 1999-2004. *Vaccine*, 2006. 24(15): p. 2835-42.

14. August, M.J. and A.L. Warford, Evaluation of a commercial monoclonal antibody for detection of adenovirus antigen. *J Clin Microbiol*, 1987. 25(11): p. 2233-5.
15. Gleaves, C.A., J. Militoni, and R.L. Ashley, An enzyme immunoassay for the direct detection of adenovirus in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1993. 17(1): p. 57-9.
16. Calcedo, R., et al., Host immune responses to chronic adenovirus infections in human and nonhuman primates. *J Virol*, 2009. 83(6): p. 2623-31.
17. Lipson, S.M., et al., Presumptive identification of common adenovirus serotypes by the development of differential cytopathic effects in the human lung carcinoma (A549) cell culture. *FEMS Microbiol Lett*, 1993. 113(2): p. 175-82.
18. Huang, Y.T. and B.M. Turchek, Mink lung cells and mixed mink lung and A549 cells for rapid detection of influenza virus and other respiratory viruses. *J Clin Microbiol*, 2000. 38(1): p. 422-3.
19. Mackay, I.M., K.E. Arden, and A. Nitsche, Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(6): p. 1292-305.
20. Gu, Z., et al., Multiplexed, real-time PCR for quantitative detection of human adenovirus. *J Clin Microbiol*, 2003. 41(10): p. 4636-41.