



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "FEDERICO GÓMEZ"

**GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE VARICELA-ZOSTER
EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON VARICELA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:
INFECTOLOGÍA**

P R E S E N T A:

DRA. ENEIDA SÁNCHEZ MEDINA



DIRECTOR DE TESIS

DR. VÍCTOR MANUEL PÉREZ ROBLES – HIMFG

M.C. ARACELI RODRÍGUEZ CASTILLO – INDRE

HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

MÉXICO, D. F.

AGOSTO 2007



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE VARICELA- ZOSTER EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON VARICELA

Tesis que para obtener el título en

INFECTOLOGÍA

Presenta

DRA. ENEIDA SÁNCHEZ MEDINA

Dr. VÍCTOR MANUEL PÉREZ ROBLES
DIRECTOR DE TESIS

M.C. ARACELI RODRÍGUEZ CASTILLO
DIRECTORA DE TESIS

México, DF, agosto 2007



...ya estoy llorando y todavía no empiezo...

Antes que todo... ¡GRACIAS DIOS!

Por todo lo que ha puesto en mi camino, empezando por mi maravillosa familia, las oportunidades y mi segunda familia... mis amigos

Mi angelito personal... Gerardito

Mamá. Por ser un ejemplo de fortaleza, porque sin ti ninguno de nosotros estaría donde está, porque cada uno de tus sacrificios ha valido la pena, no soy tan valiente como tú

Papá. Nos perdimos el resto de cosas maravillosas que tenías para nosotros, pero donde quiera que te encuentres, te estoy infinitamente agradecida por tus enseñanzas

Chivis, Bris, Flotsam Y Jetsam, Andreita Y Akira, porque ustedes son mi fuerza, mi motivo principal para ser mejor cada día

HEK

Con especial agradecimiento

Mis amigos del alma... Ana Cristina, Andrea, Estrella, Julio César, Rubén.

Mis nuevos y súper amigos, que sufrimos, nos desesperamos y emocionamos juntos con cada nuevo conocimiento y que espero sigan en este camino conmigo y sepan que cuentan conmigo: Alejandra, Blanca, Mario, Paty, René, Rocío, Roberto, Jesús el micólogo del HIM

A todos y cada uno de los médicos adscritos y los jefes de Infectología, porque todos ustedes me enseñaron el verdadero amor a esta profesión, la emoción con la que cada uno de ustedes ejerce y la vehemencia por aprender... GRACIAS

A Irenita y toño, durante estos dos años, ustedes fueron nuestro sol...

Dra. Dora, Dra. Giono, Mtra. Teresita, a cada uno de los que laboran en los laboratorios de este, nuestro hospital, que también a partir de ellos aprendimos el amor hacia cada uno de los microorganismos, que también son nuestra pasión...

Dr. Víctor Pérez, Dr. Carlos del Río, Mtra. Araceli Rodríguez, por su paciencia, sus enseñanzas y su apoyo para la realización de esta tesis...

A cada uno de los niños que pasaron por nuestras manos y nuestras mentes durante este tiempo... algunos ya angelitos... otros continúan luchando y nosotros con ellos...

Eneida

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	5
JUSTIFICACIÓN.....	7
OBJETIVOS.....	7
PROBLEMA.....	8
HIPÓTESIS.....	8
MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	15
IMPACTO.....	15
RESULTADOS.....	16
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	23
ANEXOS.....	24
REFERENCIAS.....	27

INTRODUCCIÓN

La varicela es una enfermedad exantemática de curso agudo de predominio en la infancia, causada por el virus de Varicela-Zoster, descrita desde el siglo XVIII y que aún a la fecha puede ser confundida con la viruela.

La varicela es una enfermedad altamente contagiosa, a menudo una infección banal, caracterizada por un exantema pleomórfico, generalizado, pruriginoso; como resultado de la primoinfección por este virus. El herpes zóster es menos común, ocurre usualmente en la vejez o en huéspedes inmunocomprometidos, habitualmente produce un exantema doloroso en un sólo dermatoma, siendo este debido a la reactivación del virus. Las características clínicas de ambas enfermedades han sido determinadas desde la antigüedad, el nombre de “herpes” se atribuye a Hipócrates y se deriva del griego ερπειν reptar. Se aplicaba para describir el desarrollo de un exantema que ahora se conoce como herpes simple y zoster. Plinio distinguió entre estas dos enfermedades y describió las características del herpes zoster en una región del tórax. Celso describió las lesiones del herpes diseminado “como una serpiente y en la misma forma que un cinturón”. El nombre de zoster, así como sus sinónimos en inglés y en griego derivan del latín *cingulus* (cinturón), en referencia a la forma que se dibuja sobre el tronco o abdomen. Varicela deriva del latín *varus* que es el diminutivo del espinilla, reportada como tal a partir de 1764 y se usó para distinguir esta enfermedad de la viruela, también derivado de la misma palabra latina, puesto que inicialmente se pensaba que eran formas leve y severa de la misma enfermedad: Viruela.

William Heberden fue el primero en diferenciar las características clínicas y la evolución de la varicela, con el término de *variolae pusillae*. Notó que a aquellas personas que habían tenido varicela no podían cursar con ella otra vez, hizo un intento por transmitir la enfermedad a una persona inmune al inocularle líquido de una pústula de varicela en una herida sin poder ocasionarle la enfermedad ¹.

La varicela es una enfermedad común durante los primeros años de la infancia y en la mayoría de los casos, con una evolución benigna, es decir, pródromos 3-5 días previos, un exantema pleomórfico de aparición en brotes, con resolución espontánea. Sin embargo, en ocasiones puede cursar en la etapa aguda, con sobre-infecciones, sobre todo por *Streptococcus pyogenes*, que puede ocasionar un síndrome de choque tóxico.

El virus de Varicela-Zoster (VVZ), es el más infectante de la familia de los herpes virus¹, los seres humanos somos los únicos reservorios y fuente de infección², con una tasa de ataque de hasta el 80% en contactos domiciliarios. En climas templados es más común en el invierno y al inicio de la primavera en la población infantil, sin embargo en los trópicos es una enfermedad mas frecuente en adultos. En los países desarrollados hasta el 90-95% de la población adulta tiene evidencia serológica de exposición al VVZ, sin embargo en los países en vías de desarrollo, puede existir hasta un 60% de adultos susceptibles². Tiene un periodo de incubación de aproximadamente 14 días, con un rango entre 10-21 días en huéspedes inmunocompetentes y hasta 28 días en inmunocomprometidos. Las vías de transmisión son dos: Contacto directo con las lesiones del paciente y por vía aérea a través de aerosolización de partículas expelidas al toser, estornudar o hablar³. El periodo de infectividad abarca desde dos días previos al inicio del exantema hasta aproximadamente 5 días (por vía respiratoria), o hasta que todas las lesiones están en fase de costra^{2,3}.

En niños sanos la mortalidad por varicela es menor de 2/100,00 casos, este riesgo se incrementa hasta 15 veces en adultos. Las manifestaciones de la varicela incluyen el exantema pleomórfico (máculas, pápulas, vesículas, pústulas y costras), fiebre y malestar general con síntomas prodrómicos de 1-2 días antes del inicio del exantema en algunos pacientes donde además del exantema, presentan prurito y anorexia, que mejoran conforme la enfermedad disminuye.

Las lesiones aparecen en el tronco y cara, se van extendiendo de manera centrífuga, a manera de brotes durante 2-5 días, inclusive en mucosas, aproximadamente con un número que varía entre 200-500 lesiones, inicialmente se describen como “gotas de rocío”, con el paso del tiempo, debido a la migración de polimorfonucleares, la vesícula deja de ser transparente para llenarse de un líquido de aspecto purulento, que contiene fibrina y detritus celulares, posteriormente se costrifica y estas se desprenden dentro de las dos semanas siguientes.

Entre las complicaciones de la varicela se encuentran las complicaciones infecciosas, predominantemente asociados el estreptococo del grupo A y *Staphylococcus aureus*⁴, sus complicaciones incluyen impetiginización de lesiones, celulitis, osteomielitis, artritis séptica, fascitis necrotizante⁵, síndrome de choque tóxico que en ocasiones puede ser mortal; estas incrementan la morbilidad asociada a la enfermedad y son la principal causa de hospitalización en menores de 5 años. Las complicaciones supurativas a nivel de sistema nervioso central son raras, se han descrito de manera escasa que estas complicaciones pueden incluir meningitis bacteriana, empiemas subdurales y/o abscesos cerebrales^{6,7} principalmente en niños en edad escolar o adolescentes.

Otra complicación común se da a nivel de sistema nervioso central, como ataxia cerebelar y/o encefalitis. La ataxia cerebelar, la complicación neurológica mas común, con una incidencia de 1/4000 casos, puede ocurrir entre una semana y 21 días posterior al inicio del exantema, incluyendo manifestaciones como ataxia, vómito, fiebre, vértigo, alteraciones en el lenguaje, el líquido cefalorraquídeo con linfocitosis e hiperproteíorraquia, es a menudo un proceso benigno, con resolución entre 2-4 semanas. Por otra parte, la encefalitis es una complicación con una presentación de 1,7/100,000 casos, sus manifestaciones incluyen náusea, vómito, rigidez de nuca, convulsiones. Otras complicaciones menos comunes son: meningitis aséptica, mielitis transversa, síndrome de Guillian Barré, síndrome de Ramsay-Hunt y parálisis de Bell⁸.

En un reporte realizado en el Hospital Infantil de México Federico Gómez⁹, se encontró que en un 10% los pacientes con varicela desarrollaron complicaciones, de estas el 23% cursó con celulitis como complicación bacteriana, en cuyos cultivos, se encontró desarrollo de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* (16.3%); de las complicaciones relacionadas con el virus, la complicación mas frecuente fue encefalitis en un 30%.

ANTECEDENTES

El virus de Varicela-Zoster VVZ, es parte de la familia Herpesviridae, comparte con ellos sus características estructurales. Es de simetría icosaédrica y contiene una doble cadena de ADN localizada en el centro de la cápside. El tamaño del virus es de aproximadamente 150-200 nm, tiene una envoltura con glucoproteínas. La cápside sin envoltura tiene un diámetro de aproximadamente de 90-95 nm. El ADN contiene 125,000 pares de bases (80 megadaltones), que codifican casi 75 proteínas. Tiene dos regiones una corta (5.2-kb) y otra larga (105-kb), cada una de las cuales tiene secuencias finales con bases repetidas. Durante la replicación se invierte sobre ella misma y resulta en dos formas isoméricas.

Se identifican cinco familias de glucoproteínas: gpl, gpII, gpIII, gpIV y gpV, que son homólogas a las gE, gB, gH, Us7 y gC del virus Herpes Simple. La infectividad de los viriones puede ser neutralizada por anticuerpos monoclonales dirigidos directamente contra gpl, gpII y gpIII. Estas glicoproteínas representan los marcadores primarios para respuestas humorales y celulares⁸. Sólo los viriones envueltos son infectantes, la envoltura es sensible a los detergentes y la desecación.

Las variaciones genéticas en el Virus de Varicela-Zoster, se definen por la ausencia o presencia de sitios de restricción como el sitio reconocido por la enzima de restricción *Pst*I en el marco de lectura abierta (Open Reading Frame, ORF) 38 de 350 pares de bases, de la cual se obtienen dos productos de 250 y 100 pares de bases; y el sitio *Bgl*I en el ORF 54 de 222 pares de bases con dos productos de 137 y 95 pares de bases, o bien diferencias en el número de elementos repetidos dentro de las cinco regiones repetidas (R1-5) en el genoma del VVZ. Con estos métodos se puede distinguir entre virus de diferentes regiones geográficas. Diferentes patrones de enzimas de restricción también ayuda a distinguir entre virus epidemiológicamente no relacionados, mientras que los virus obtenidos de un solo brote, muestran el mismo patrón de sitios de restricción^{10,11,12,13}.

Se han hecho diversos estudios con el fin de establecer el patrón genotípico del virus de varicela-zoster en diferentes regiones del mundo, un estudio refiere que en la mayoría de los aislamientos en Estados Unidos tienen el sitio de restricción PstI en el ORF 38, mientras que la cepa vacuna Oka, carece de este sitio¹¹, estableciendo los genotipos J (japonés) y E (europeo) de acuerdo con los sitios de restricción mencionados, además del genotipo M (mosaico), este último con aislamiento frecuente en regiones tropicales de África, Indochina, Centro América, etc.^{10,11,12,13} lo cual ha servido para identificar el virus predominante además de la relación de casos de varicela con la cepa vacunal Oka con genotipo japonés.

Un estudio realizado en Costa Rica¹⁴ en 23 pacientes inmunocompetentes, se reportó en el 44% genotipo M y en el 39% genotipo E, no se identificó el genotipo J, de acuerdo con la metodología publicada por los CDC, en el mismo estudio se reportan dentro de las complicaciones como la más frecuente la sobreinfección cutánea en 44% de los pacientes, sin hacerse una correlación entre el genotipo y la evolución clínica. En el estudio reportado por Loparev en 2004, donde se estudiaron aislamientos de VVZ obtenidos en diferentes partes del mundo, utilizando polimorfismos de un solo nucleótido en genes 38 (PstI) y 54 (BglI), se obtuvo de un total de 113 muestras para América, predominio de genotipo E, de estas las muestras tomadas en nuestro país, fueron 5, de pacientes que clínicamente cursaban con varicela, obteniendo en ellas el 100% de genotipo M.¹¹

JUSTIFICACIÓN

La varicela se ha descrito de manera clásica como una enfermedad exantemática de curso benigno en la infancia, comúnmente autolimitado, así mismo en la mayoría de las ocasiones sin condicionar secuelas, sin embargo en algunas ocasiones se desarrollan complicaciones, las cuales pueden estar asociadas a patologías de base en el huésped, principalmente inmunocompromiso, además de factores asociados al ambiente, de manera predominante las complicaciones secundarias a sobre infecciones bacterianas. En nuestro país, la vacunación contra varicela no está establecida dentro del sistema de vacunación, lo que condiciona que esta enfermedad, aún tenga una alta frecuencia en nuestra población: durante el 2006 se reportaron, hasta la semana 50, 264,816 casos¹⁵; dada la frecuencia y el estado actual del conocimiento de los factores de riesgo asociados al huésped y el ambiente, con estudios iniciales que documentan la distribución de los diferentes genotipos a lo largo del mundo, sin estudios al momento que valoren la asociación de estos genotipos, es importante conocer por una parte cual es la distribución en nuestro de país, además de sí, el hecho de ser genotípicamente diferente, condiciona alguna modificación en el curso de la enfermedad.

OBJETIVOS

Caracterizar genotípicamente el virus de Varicela-Zoster aislado de pacientes pediátricos con varicela.

Comparar la frecuencia de los diferentes genotipos virales aislados en pacientes pediátricos con varicela complicada contra la observada en los pacientes que cursan con varicela no complicada.

PROBLEMA

El virus de Varicela-Zoster que infecta y produce varicela complicada, será fenotípicamente diferente a aquél que produce varicela no complicada.

HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo

Los niños con varicela complicada son infectados por un Virus de Varicela-Zoster genéticamente distinto del causal de la varicela no complicada.

Hipótesis nula

Los niños con varicela complicada son infectados por el mismo tipo de Virus de Varicela-Zoster que los niños con varicela no complicada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población

Pacientes que acudan al Hospital Infantil de México Federico Gómez, durante el periodo de agosto del 2006 a mayo del 2007, con diagnóstico de varicela, así como al hospital de segundo nivel Hospital del Niño Morelense y Hospital Pediátrico de Coyoacán. Se integrarán dos grupos de acuerdo al tipo de varicela. Se realizará historia clínica, de acuerdo a cuestionario con interrogatorio directo al paciente y familiar responsable (anexo 1), posteriormente toma de muestra, almacenamiento y procesamiento de la misma.

Criterios de inclusión

- Edad \leq 18 años
- Varicela diagnóstico clínico
- Tinción de Tzanck positiva
- Firmen consentimiento informado

Criterios de eliminación

- Sin obtención de ADN viral a partir de las muestras
- Retiro voluntario del estudio

Diseño del estudio

Se realizará un estudio piloto, con pacientes que cursen con varicela, integrándose dos grupos iniciales, varicela complicada o no complicada, con una muestra por conveniencia, siendo está de los pacientes que durante el periodo de mayo de 2006 a julio 2007 presente la enfermedad.

Operacionalización de variables

- Edad – Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un ser vivo hasta el momento del estudio expresado en meses. Cualitativa continua
- Sexo – Condición orgánica, que diferencia al macho de la hembra en una especie. Cualitativa nominal dicotómica – Femenino / masculino
- Varicela – Cuadro clínico caracterizado por lesiones dérmicas pleomórficas (máculas-pápulas-vesículas-pústulas-costras) con aparición en brotes, distribución centrífuga, acompañado de síntomas generales, que cuente con tinción de Tzanck positiva y/o antecedente epidemiológico de contacto con varicela. Cualitativa nominal dicotómica – si/no
- Varicela complicada – Cuadro clínico caracterizado por lesiones dérmicas pleomórficas (máculas-pápulas-vesículas-pústulas-costras) con aparición en brotes, distribución centrífuga, acompañado de síntomas generales, que cuente con tinción de Tzanck positiva y/o antecedente epidemiológico de contacto con varicela; que cursa con patología sobre agregada de tipo bacteriano o inherente al virus. Cualitativa nominal dicotómica – si/no
- Tipo de complicación de varicela
 - ATAXIA CEREBRAL AGUDA – hasta 21 días posterior al inicio del exantema, caracterizado por ataxia, vómito, lenguaje alterado, vértigo, con resolución en 2-4 semanas, LCR con hiperproteorraquia y pleocitosis
 - ENCEFALITIS – disminución del nivel de conciencia, cefalea progresiva, vomito, patrones de pensamiento alterados, fiebre y convulsiones, hiperproteorraquia, pleocitosis con predominio de mononucleares
 - MENINGITIS – fiebre, irritabilidad, alteración en el estado de conciencia, signos de Kernig y Brudzinsky positivos, hiperproteorraquia, hipoglucorraquia, pleocitosis predominio polimorfonucleares

- MIELITIS TRANSVERSA – déficit sensitivo, motor y esfinteriano, límite sensitivo superior bien definido, en ausencia de otra condición patológica, relacionado con el inicio de varicela
 - SINDROME DE RAMSAY-HUNT – otalgia intensa, exantema periauricular, peribucal, facial, cervical; parálisis de nervios faciales, pérdida auditiva, vértigo, inclusive, pérdida sensorial lingual, etc.
 - SINDROME DE REYE - alteración en estado de conciencia, asociado a disfunción hepática, con antecedente de ingestión de salicilatos
 - NEUMONITIS – entre los 3 y 5 días del inicio de enfermedad, caracterizado por taquipnea, tos, disnea y fiebre, radiográficamente con neumonitis intersticial.
 - MIOCARDITIS – disfunción del músculo cardiaco en el curso de la enfermedad.
 - NEFRITIS – presencia de sangre y proteínas en orina, función renal deteriorada
 - HEPATITIS – alteración de pruebas de funcionamiento hepático, incremento de transaminasas.
 - IMPÉTIGO – lesiones dérmicas con secreción purulenta
 - SÍNDROME DE CHOQUE TÓXICO
- Tipo de virus – Combinación de presencia o ausencia de sitios de restricción en los marcos de lectura abierta 34 y 58 - cualitativa nominal pluritómica.

Genotipo	<i>Pst</i> I	<i>Bgl</i> I
J	-	+
M	+	+
E	+	-

Material biológico

La obtención de muestras clínicas para la identificación y genotipificación del virus de la Varicela-Zoster (VVZ) depende de la fase de la enfermedad en la que se encuentra el paciente y pueden ser:

1. **Exudado faríngeo (fase prodrómica).** Iluminar la cavidad orofaríngea y frotar el hisopo por el área posterior de la garganta y de la zona de las amígdalas. Sumergir el hisopo dentro del medio de transporte viral. Romper el aplicador a la altura del tapón y cerrar herméticamente. Conservación de 2-5°C hasta su envío al laboratorio.
2. **Líquido de Vesícula (fase aguda).** Elegir de una a tres vesículas grandes y con una aguja de insulina puncionarlas, recoger el líquido vesicular con un hisopo de algodón y frotar la lesión para que se absorba todo el líquido. Sumergir el hisopo dentro del medio de transporte viral. Conservar de 2-5°C hasta su envío al laboratorio.
3. **Costras (fase convaleciente).** Elegir de una a tres costras que estén próximas a desprenderse o en la cama del paciente, con pinzas y colocar en una bolsa colectora de plástico, éstas pueden conservarse a temperatura ambiente.
4. **LCR (en casos de encefalitis o meningitis pos-varicela)** Colectar no menos de 1mL de LCR, por personal capacitado. Conservar de 2-5°C hasta su envío al laboratorio. Debe tenerse especial cuidado de mantener la cadena fría de la muestra hasta su proceso.

Envío de muestras biológicas: Transportar las muestras tan pronto como sea posible. Como está indicado, las muestras de exudado faríngeo, líquido vesicular y de LCR deberán mantenerse a temperatura de 2-5°C durante su envío al laboratorio. En el caso de las costras pueden mantenerse a temperatura ambiente.

Metodología para la detección y genotipificación del VVZ

1. Extracción a partir de costras

Se toman 2-3 costras a partir de las recolectadas por paciente, a las que se adicionan 150 μ L de PBS y 15 μ L de proteinasa K, se agita en Vórtex durante 5 segundos y se deja en baño María a 56°C por 18 hrs, repitiendo el proceso de agitación en Vórtex cada 2 horas, durante las primeras 8 horas. Al término del tiempo en baño María, se agitan 20 segundos en Vórtex y se centrifugan durante 10 minutos a 10,000 rpm.

2. Extracción y purificación del DNA viral

Colocar 120 mL de muestra clínica (obtenido a partir del proceso anterior para las costras o a partir del medio de transporte donde se colocó la muestra de vesícula) en un tubo Eppendorf, adicionando 750 μ L de DNAzol* Reagement – Invitrogene¹⁶. Después de 30 segundos de agitación vigorosa, agregar 500 μ L de etanol absoluto a -20°C, manteniéndose durante 30 minutos a -20°C, posteriormente centrifugar la mezcla 10 min a 8000 rpm, lavar el DNA una vez con 500 μ L etanol al 90%, dejando secar el DNA ya sedimentado.

3. Amplificación de los genes 38 y 54 del DNA viral

Eluir el material genético con 40 μ L de agua inyectable. Realizar las amplificaciones de cada uno de los genes, utilizando la cepa vacunal Oka como control positivo, y agua inyectable como control negativo. Se utilizan los siguientes cebadores: para el gen 38, PstA (TTG AAC AAT CAC GAA CCG TT) y PstB (CGG GTG AAC CGT ATT CTG AG); para el gen 54, Nla (GGA ACC CCT GCA CCA TTA AA) y FoK (TCC CTT CAT GCC CGT TAC AT). La reacción de PCR se lleva a cabo en presencia de 2 μ L de DNA puro, 10 pmol de cada oligonucleótido, 10mM de dNTP's y 1.5U de Taq en un volumen de 25 μ L de reacción de PCR. Las condiciones de amplificación son: 94°C/2', 32 ciclos a 94°C/15", 52°C/15", 72°C/30 " , con una extensión de 72°C/7min.

Los productos de la amplificación de cada una de las reacciones se verifican en geles de agarosa al 2% en TBE 1X a 120 volts por 40 min, se tiñen con 0.5g/mL de bromuro de etidio y se capturó la imagen en el sistema “Eagle Eye II” (Stratagene).

4. Digestión de los amplicones con enzimas de restricción

Las digestiones se realizan utilizando 4 μ L del producto de amplificación de PCR, solución reguladora y 4U de enzima, en un volumen final de 10 μ L. Las muestras se incubaron a 37°C durante 2 horas. Los amplicones de los genes 38 y 54 se someten a digestión con las enzimas *Pst*I y *Bgl*I respectivamente Posteriormente los productos de digestión se verifican en geles de poliacrilamida al 8%, y se tiñe con 0.5g/mL de bromuro de etidio. Cada gel es documentado mediante una imagen en el sistema “Eagle Eye II” (Stratagene).

5. Análisis de los resultados

La interpretación de los resultados se realiza de acuerdo a la presencia o ausencia de los sitios de cortes a cada uno de los genes, mediante el siguiente diagrama:

Genotipo	<i>Pst</i> I	<i>Bgl</i> I
J	-	+
M	+	+
E	+	-

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Nuestro estudio, es un estudio piloto que se realiza con el fin de tratar de establecer si en nuestra población existe alguna distribución especial de los diferentes genotipos virales, que pudieran condicionar mayor número de complicaciones asociadas, por lo que es un estudio en seres humanos con riesgo mínimo, puesto que, como parte del estudio es necesario la toma de producto biológicos para su estudio, es necesario contar con el consentimiento informado para la participación en el estudio, otorgado por el tutor del paciente y en caso conveniente del mismo paciente; se considera de riesgo mínimo debido a que no realizaremos intervención alguna en los sujetos, únicamente la obtención de productos de la replicación viral y de donde se sabe, puede ser aislado el virus. Puesto que para la toma de productos se hará de manera estéril, eso disminuye la probabilidad de causar daño al paciente, como podrían ser sobre-infección de la lesión, dolor al momento de la toma del producto, en el caso de encefalitis que se considera secundaria a infección del virus de Varicela-Zoster, se solicitará un consentimiento informado adicional para la realización de punción lumbar, como parte de la evaluación que se realiza a los pacientes en quienes se sospecha cursan con este tipo de complicación.

IMPACTO

Los estudios encontrados al momento basados en la diferenciación genotípica del virus, se han limitado a una evaluación acerca de la frecuencia de los diferentes genotipos del virus, pero sin una correlación clínica; en nuestro caso el punto principal es este, con el fin de establecer si alguno de los genotipos puede tener una asociación con la evolución hacia una varicela complicada, al momento se desarrolla como un estudio piloto con muestra por conveniencia por lo que a futuro podrá servir como base para establecer un tamaño de muestra que pueda corroborar lo obtenido en este trabajo.

RESULTADOS

Se analizaron 15 muestras de pacientes con varicela, provenientes del HIMFG y los hospitales de segundo nivel: Hospital del niño Morelense y Hospital Pediátrico de Coyoacán, de los cuales seis (40%) correspondieron a hombres y nueve (60%) mujeres, con una edad promedio de 6.19 años (2m-16a), con una mediana de 4 años, con un rango intercuartílico de 8.5 años.

Característica	Varicela	Varicela no complicada	Varicela complicada
Sexo			
Masculino	6	1	5
Femenino	9	2	7
Edad			
Promedio	6.19	10	5.25
Mediana	4	10	3
Rango IQx	8.58	2	5
Caso secundario			
Si	9	2	7
No	6	1	5
Complicaciones			
Impétigo	8/15	--	8/12
Encefalitis	4/15	--	4/12
Neumonitis	1/15	--	1/12
Endoftalmitis	1/15	--	1/12

Tabla 1. Características demográficas de pacientes con Varicela del Hospital Infantil de México Federico Gómez, Hospital del Niño Poblano del Hospital Pediátrico de Coyoacán durante el periodo de mayo 2006 a julio 2007.

La población masculina del estudio incluyó 6 pacientes, con edad promedio 6.19 años (2-11 años), dos (33.33%) con leucemia, cinco (83%) de los casos fueron secundarios y complicados, principal complicación fue impétigo, uno de estos casos secundariamente complicado tuvo desenlace fatal.

Dentro de la población del sexo femenino, se encontró una edad promedio de 6.52 años (2-16 años), 3 (33.33%) de ellas con (leucemia), ocho (80%) casos fueron secundarios, siete (77%) de estos presentaron complicaciones, de entre ellas, las complicaciones más frecuentes: impétigo (4, 44%), encefalitis (3, 33%)

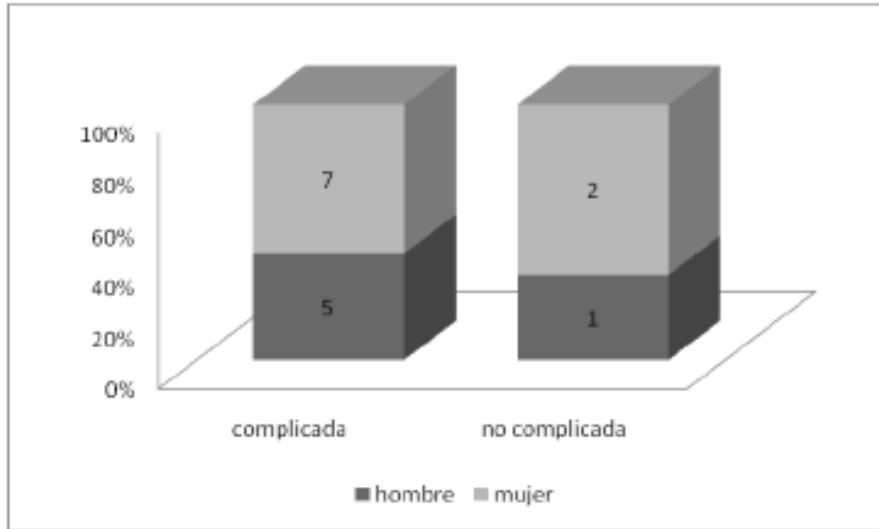


Figura 1. Distribución de casos de Varicela en pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez, Hospital del Niño Poblano y Hospital Pediátrico de Coyoacán durante el periodo de mayo 2006 a julio 2007.

Se incluyeron 12 casos de varicela complicada (80%), de los cuales siete fueron del sexo femenino y cinco del masculino; los casos de varicela no complicada incluyeron tres pacientes: un hombre y dos mujeres. Las complicaciones documentadas fueron: impétigo, encefalitis, endoftalmitis, neumonitis, varicela hemorrágica, en algunos pacientes (25%) se presentó mas de una complicación.

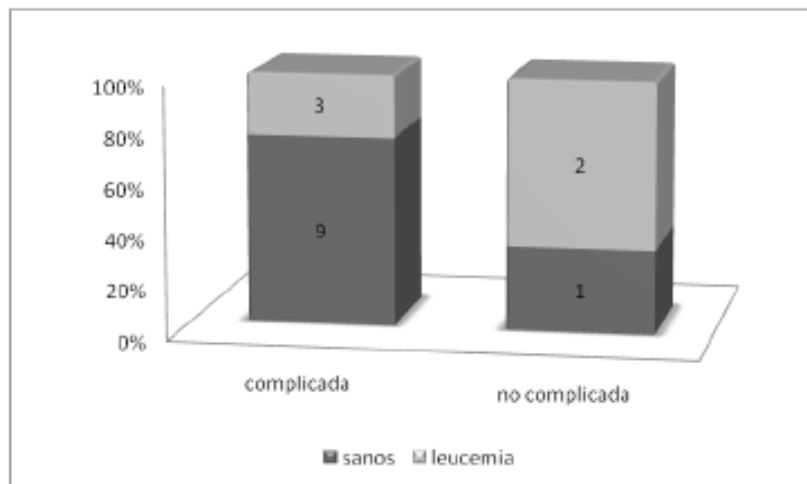


Figura 2. Distribución de casos de Varicela en relación con patología de base en pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez, Hospital del Niño Poblano y Hospital Pediátrico de Coyoacán durante el periodo de mayo 2006 a julio 2007.

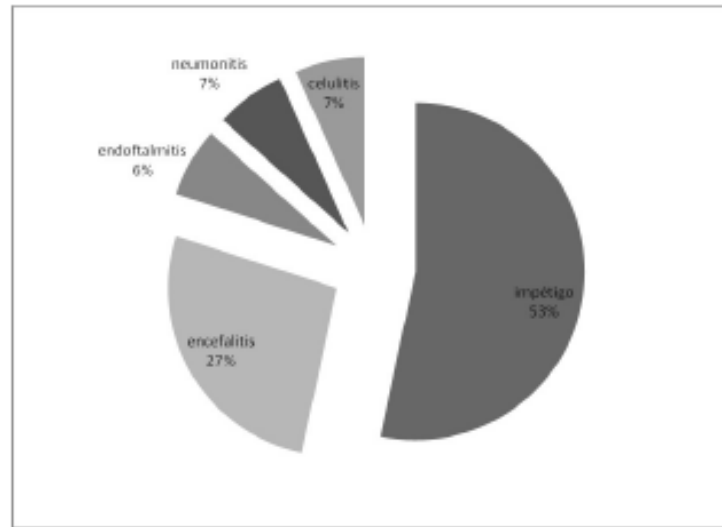


Figura 3. Distribución de casos de Varicela complicada en pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez, Hospital del Niño Poblano y Hospital Pediátrico de Coyoacán durante el periodo de mayo 2006 a julio 2007.

No.de muestra	Edad	Enf. crónica	Tipo	Días de evolución	Caso secundario	Varicela complicada	Tipo de complicación	Tipo de muestra
1	8	Si	LLA L2	5	Si	no		costra
13	10	No		5	Si	no		vesícula
7	12	Si	LLA L1	3	No	no		vesícula
15	1 1/2	Si	LLA L1	4	No	si	impétigo	vesícula
5	1/6	No		15	Si	Si	impétigo	vesícula
2	1	No		7	Si	Si	impétigo	costra
11	1 5/6	No		4	Si	Si	encefalitis celulitis im- pétigo	vesícula
14	2	No		15	No	Si	impétigo endoftalmitis	costra
3	3	No		3	No	Si	impétigo	costra
6	3	No		8	No	Si	encefalitis	vesícula
10	4	No		6	Si	Si	impétigo	costra
4	5 1/3	No		7	Si	Si	impétigo	vesícula
8	11	Si	LLA L2	3	Si	Si	neumonitis varicela hemorrágica	vesícula
9	14	No		8	Si	Si	encefalitis	vesícula
12	16	Si	LLA M3	2	No	Si	encefalitis	costra

Tabla 2. Descripción de casos de Varicela en pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez, Hospital del Niño Poblano y Hospital Pediátrico de Coyoacán durante el periodo de mayo 2006 a julio 2007.

Se tomaron muestras tanto en fase aguda (9 de líquido vesicular) como en fase de convalecencia (6 de costras), posteriormente se realizó extracción y purificación de acuerdo con la técnica de DNAzol. Se amplificó DNA por PCR obteniéndose un producto de 350 pares de bases en el caso del gen 38 y de 222 pb para el gen 54 (tabla 3, figura 3).

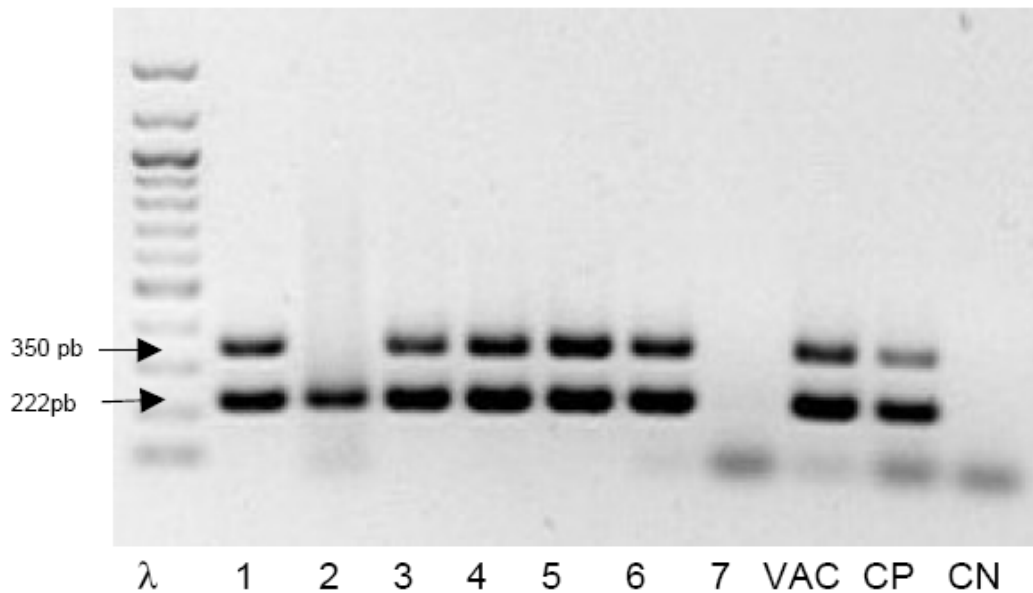


Figura 4. Amplificación de genes 38 y 54 de Virus de Varicela-Zoster. Carril λ, marcador de peso molecular, carriles 1-7 muestras clínicas, carriles 8 y 9 control positivo (cepa vacunal-Oka), carril 10 control negativo.

Los amplicones de los genes 38 y 54 fueron digeridos con enzimas de restricción PstI y BglI, con el fin de determinar la presencia o ausencia de sitios de restricción. El amplicón del gen 38 (PstI) generó los productos de 250 y 100 pb en todas las muestras excepto la vacuna; mientras que el gen 54 (BglI) no cortó el amplicón de las muestras problema, pero sí la vacuna cuyos productos fueron de 187 y 55 pb. Resumiendo: todas las muestras fueron PstI (+) BglI (-), mientras que el control positivo fue PstI(-) BglI(+). Así, de acuerdo a los resultados, todas las muestras fueron del genotipo E, semejante a lo reportado en otros países de América Latina.

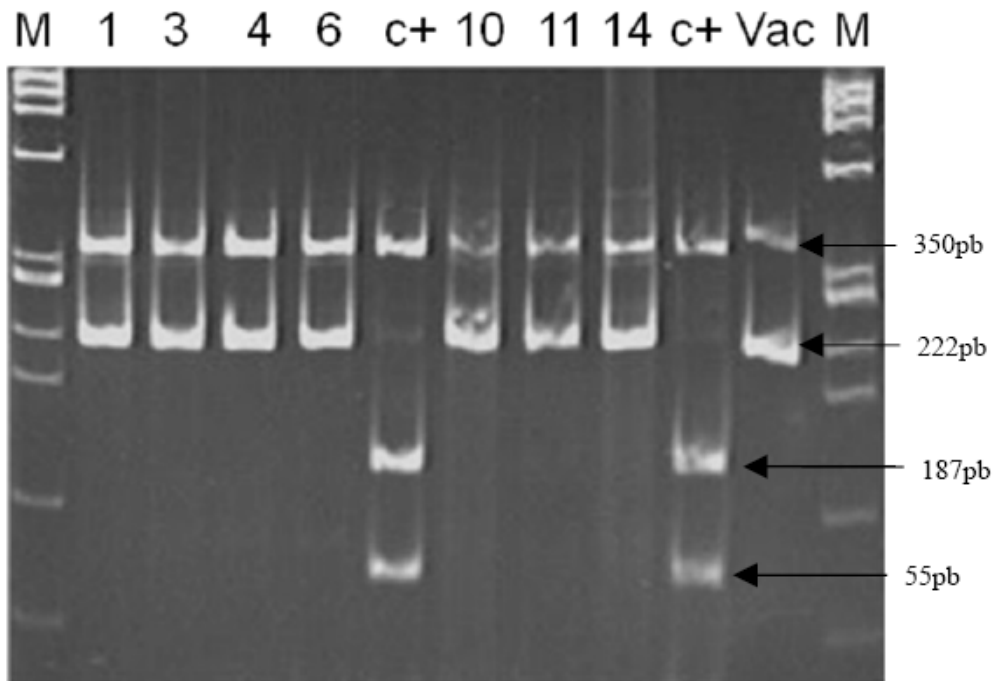


Figura 5. Digestión por BglII del amplicón 54 de Virus de Varicela-Zoster. Carril M, marcador de peso molecular VIII, carriles 1, 3, 4, 6, 10, 11, 14 muestras clínicas, carriles C+ control positivo (cepa vacunal-Oka), carril Vac (cepa vacunal-Oka, sin digestión)

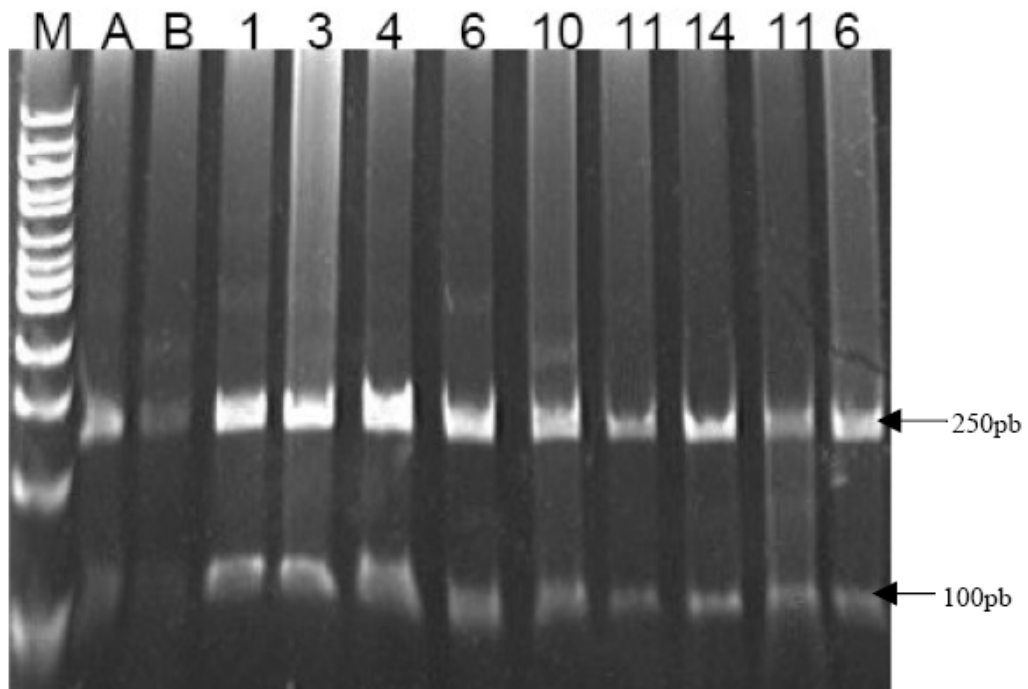


Figura 6. Digestión por PstI del amplicón 38 de Virus de Varicela-Zoster. Carril M, marcador de peso molecular VIII, carriles A, B, 1, 4, 6, 10, 11, 14 muestras clínicas.

	Tipo de muestra	Se obtuvo DNA	Digestión		Genotipo
			PstI	BglI	
1	Costra	Si	+	-	E
2	Costra	Si	+	-	E
3	Costra	Si	+	-	E
4	Vesícula	Si	+	-	E
5	Vesícula	Si	+	-	E
6	Vesícula	Si	+	-	E
7	Vesícula	No	----	----	----
8	Vesícula	Si	+	-	E
9	Vesícula	Si	+	-	E
10	Costra	Si	+	-	E
11	Vesícula	Si	+	-	E
12	Costra	Si	+	-	E
13	Vesícula	No	----	----	----
14	Costra	Si	+	-	E
15	Vesícula	Si	+	-	E

Tabla 3. Resultados de amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa, de los genes 38 y 54 de Virus de Varicela-Zoster y digestión de amplicones por enzimas de restricción PstI y BglI, a partir de muestras de pacientes con varicela del Hospital Infantil de México Federico Gómez, Hospital del Niño Poblano y Hospital Pediátrico de Coyoacán durante el periodo de mayo 2006 a julio 2007

Se analizaron las variables cualitativas por medio de χ^2 , para la asociación entre enfermedad crónica (leucemia) con varicela complicada, se obtuvo un valor de χ^2 de 0.2, por lo que para un grado de libertad, con una $p < 0.05$ no se encontró una asociación estadísticamente significativa, de igual forma para valorar la asociación entre caso secundario y varicela complicada, se encontró un valor de $\chi^2 = 0.8$, que para una $p < 0.05$ con lo que no se encuentra asociación entre estas características.

DISCUSIÓN

De entre las muestras amplificadas y digeridas de acuerdo a la metodología establecida, se reportó únicamente genotipo E en ellas, por lo que no se encontró diferencia de genotipo entre las cepas responsables de varicela complicada o no complicada. De acuerdo con lo reportado en otras series^{11,17} en diversos países hay por lo menos dos de los tres genotipos en diferentes proporciones de acuerdo con cada población estudiada, en el lejano oriente predomina el genotipo J, en Europa continental predomina el genotipo E, en diferentes áreas de África y Asia predomina el genotipo mixto (M).

Cabe mencionar, que en el 2004, Loparev¹¹, reportó el genotipo M en cinco muestras de nuestro país, sin embargo no se reportó el año ni el origen de aquellas muestras; por otra parte concuerda con datos obtenidos en una serie mexicana de aislamientos clínicos, donde, del total de 50 muestras, tanto de costras como vesícula, se amplificó DNA en 44 muestras, todas ellas con genotipo E¹. Las muestras en las que no fue posible amplificar por PCR, pudo deberse a problemas en la toma de la muestra.

El estudio incluyó tanto pacientes inmunocompetentes como algunos con una enfermedad crónica que condiciona inmunosupresión, al depletar de células efectoras de respuesta inmune, sin embargo no se encontraron diferencias en la proporción de varicela complicada al comparar ambas series; los factores asociados como edad y el ser un caso secundario, se presentaron de acuerdo a lo reportado en la literatura^{5,8}, sin embargo no se encontró asociación entre estos factores y la presencia de varicela complicada, esto puede deberse al tamaño de la muestra, puesto que esta fue establecida por conveniencia, probablemente al incrementar el tamaño de muestra, las asociaciones podrían establecerse con mayor fortaleza estadística.

CONCLUSIONES

En el presente estudio, dado el tamaño de muestra, no se encontraron asociaciones con los factores de riesgos previamente establecidos en la literatura. Con los datos obtenidos en este estudio, no se observa variabilidad en el genotipo, sin embargo al ser un tamaño de la muestra y las localidades limitadas, no se puede establecer con firmeza alguna conclusión.

El presente trabajo, es el primero desarrollado en relación con la epidemiología del virus de Varicela-Zoster en nuestra población, sin embargo hace falta un estudio más amplio, con muestreo a nivel nacional, para poder establecer con un mayor grado de certeza, el o los genotipos circulantes y de acuerdo a estos resultados valorar el grado de asociación entre ellos.

El tener establecida la metodología de genotipificación de este virus, será de gran utilidad para la vigilancia epidemiológica, al confirmar la participación del virus de Varicela-Zoster en cierto tipo de complicaciones, no ocasionadas por sobreinfección bacteriana.

ANEXOS

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: “GENOTIPIFICACIÓN DE VIRUS DE Varicela-Zoster EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON VARICELA”

1. Entiendo que mi hijo, _____, por padecer varicela es candidato para ingresar a este proyecto de investigación.
2. El propósito de su participación es obtener información acerca del virus de Varicela-Zoster
3. Este estudio se llevará a cabo en el Hospital Infantil de México Federico Gómez
4. He sido informado que se le realizará como parte del estudio: Historia clínica y toma de líquido de vesícula y/o costra, con el fin de obtener material para aislar el virus de varicela-zoster, en una sola ocasión.
5. Se me ha informado que las molestias que podría esperar en el momento de la toma serían dolor, incomodidad, infección de la lesión o cicatriz gruesa al retirar la costra.
6. En caso de que mi hijo tenga una complicación neurológica por varicela, es probable que como parte del estudio le sea tomada una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenida por punción en la espalda, del cual una parte será utilizada para este estudio, para tratar de obtener el virus.
7. Se me ha informado que la toma de estos productos no aumenta el riesgo o modifica el pronóstico de mi hijo en relación a la evolución de la varicela.
8. Entiendo que los expedientes médicos serán mantenidos en confidencialidad, pero que la información necesaria para el análisis estadístico en la interpretación del estudio, podrá ser revisado por las autoridades regulatorias. Entiendo que estas autoridades pueden inspeccionar estos expedientes, pero la identidad de mi hijo no será descubierta a las autoridades, excepto en circunstancias extraordinarias y que será informado si se dan estas circunstancias.
9. Entiendo que mi hijo puede abandonar el estudio clínico en cualquier momento sin perjuicio de otras oportunidades de tratamiento en la institución en la cual se esta llevando a cado el estudio o por el médico.
10. En el caso de que mi hijo sea dañando de cualquier forma como resultado de su participación en el programa, o si tengo cualquier pregunta o problema referente a su participación continua en el programa, entiendo que deberé contactar inmediatamente al médico responsable del estudio: Dra. Eneida Sánchez Medina – Infectología 1245 celular 044-55-17-01-87-09

11. He sido informado que con estos estudios no incrementa riesgo ni modifica la evolución de su enfermedad.

12. La participación de mi hijo en el estudio es voluntaria, sin que mediara presión alguna y que mi rechazo a su participación no involucrará una pena o pérdida de beneficios a los que tiene derecho

13. Con mi firma doy mi consentimiento para el ingreso de mi hijo al estudio y me doy por enterado de lo anterior.

Firma del padre o tutor

Firma del paciente

Firma y nombre de testigo

Firma y nombre de testigo

Lugar y Fecha: _____.

REFERENCIAS

1. Wood MJ, *History of VZV*, HERPES 7:3 2000
2. Aitken, C., Jeffries, DJ, *Nosocomial Spread of Viral Disease*, Clin Microbiol Rev, 14:3 2001
3. American Academy of Pediatrics Varicela-Zoster, virus, infecciones. En: Pickering LK (ed.). *Red Book (Libro Rojo). Memoria del Comité de Enfermedades Infecciosas para 2003*. 26a ed. México: Intersistemas, 2004: 693-707
4. Ulloa, GR, Dobson S, Forbes J, *Group A streptococcal subdural empyema as a complication of varicella*, Pediatrics, 2005; 115; 112-114
5. Gershon Anne A, Varicella-Zoster Virus en Feigin RD, Cherry JD, eds. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia, PA: Saunders Publishing; 2004
6. Quach C, Tapiero B, Noya F, *Group A Streptococcus Spinal Epidural Abscess During Varicella*, Pediatrics, Vol. 109, 14, 2002
7. Laupland KB, Davies HD, Low DE, Schwartz B, Green K, the Ontario Group A Streptococcal Study Group and McGeer A, *Invasive Group A Streptococcal Disease in Children and Association with Varicella-Zoster Virus Infection*, Pediatrics, Vol. 105 mayo 2005, pe60
8. Whitley Richard J, Varicella-Zoster Virus en Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Elsevier Inc., Sixth Edition, 2005, p 1780-1785.
9. Mendieta ZS, Caracterización de varicela en pacientes pediátricos en un periodo de 10 años, Tesis de especialización en pediatría, Hospital Infantil de México, Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
10. Barret MW, Nichols R, Breuer J, *Phylogenetic Analysis of Varicella-Zoster Virus: Evidence of Intercontinental Spread of Genotypes and Recombination*, J Virol, 76:4, feb 2002

11. Loparev VN, González A, Deleon-Carnes M, Tipples G, Fickensher H, Torfason EG, Schmid DS, *Global identification of three major genotypes of Varicella-Zoster Virus: longitudinal clustering and strategies for genotyping*, J Virol, Vol. 78, 2004,
12. Quinlivan M, Hawrami K, *The molecular epidemiology of varicella-Zoster Virus: Evidence for Geographic Segregation*, JID 2002; 186 (1) October, 888-894.
13. Dayan GH, Panero MS, *Varicella Seroprevalence and Molecular epidemiology of Varicella-Zoster Virus in Argentina, 2002*, J Clin Microbiol 2004, Vol. 42 No. 12 December, 5698-5704.
14. Pizarro CJ, Identificación de los genotipos del Virus Varicela-Zoster (VVZ) en niños costarricenses, en Libro de Resúmenes del XII Congreso Latinoamericano de Infectología Pediátrica, XV Congreso Nacional de Pediatría VII Congreso Nacional de Infectología
15. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, semana 50, Dirección general de epidemiología, SSA, 2006
16. DNAzol Genomic DNA Isolation Reagent. Manufacturer protocol, 1999. Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH
17. Campsal PA, Au NHC, Prendiville JS, Speert DP, Tan R and Thomas EE, *Detection and Genotyping of Varicella-Zoster Virus by TaqMan Allelic Discrimination Real-Time PCR*, J CLIN MICROBIOL, Apr. 2004, Vol. 42 No. 4 1409–1413