

**Universidad de Chile**  
Facultad de Medicina  
Escuela de Tecnología Médica

# DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ADENOVIRUS ENTÉRICO EN NIÑOS CON CUADRO DE DIARREA AGUDA EN SANTIAGO

Tesis Profesional para optar al Título de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis Clínico,  
Hematología y Banco de Sangre

Autores:

**Alexis Lovera Avila**  
**Walter Manquilef Ayenao**

Tutor: Aldo Gaggero

**1999**



..	1
<b>RESUMEN .</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN. . .</b>	<b>5</b>
<b>OBJETIVOS. .</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES. . .</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS. .</b>	<b>11</b>
<b>MATERIALES Y METODOS. . .</b>	<b>13</b>
<b>MUESTRAS. . .</b>	<b>13</b>
<b>DETECCION DE ADENOVIRUS EN DEPOSICIONES. . .</b>	<b>14</b>
1. Detección de adenovirus mediante ELISA. . .	14
2. Tipificación de adenovirus entérico mediante ELISA tipo-específica. . .	14
3. Tipificación de adenovirus enterico mediante PCR. .	15
<b>RESULTADOS. .</b>	<b>17</b>
Detección de adenovirus por ELISA género-específico. . .	18
Tipificación de adenovirus por ELISA. .	19
Distribución según edad de los casos positivos. .	20
Distribución mensual de los casos positivos. . .	21
Tipificación de adenovirus por PCR. .	23
<b>DISCUSIÓN. . .</b>	<b>25</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA. . .</b>	<b>27</b>



---

*A nuestras Familias, por entendernos en días difíciles. A Claudia y a Vicky por su amor y comprensión. A Pilar y Rosie, por hacer que los días fueran más cortos. A todas las personas que nos ayudaron a alcanzar la meta. Y Especialmente a Aldo Gaggero, por su apoyo y por la confianza que depositó en nosotros. Para todos, este trabajo.*



## RESUMEN

La gastroenteritis constituye una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo produciendo un fuerte impacto entre los niños. Este cuadro puede ser producido por diferentes agentes dentro de los que se incluyen virus.

Adenovirus son virus DNA icosaédricos desnudos de 900 Å de diámetro. Diversos estudios evidencian que los adenovirus serotipos 40 y 41, son agentes importantes de diarrea en niños, asociándose entre el 1 y el 17% de los casos.

La importancia descrita en el ámbito mundial, y el escaso conocimiento de este agente viral en nuestro país, motiva el interés por conocer el panorama de esta infección en Santiago. Con este objetivo se analizaron 793 muestras de deposiciones de niños menores de 5 años de Santiago, primero detectando adenovirus por una técnica de ELISA screening, y posteriormente tipificando las muestras positivas por un ELISA específico para adenovirus 40 y 41.

Se encontró un 4.8% de excreción de adenovirus entérico en niños con cuadro de diarrea aguda. El 90.3% de las infecciones ocurrió en menores de 24 meses, la mayoría de los casos se presentó durante meses cálidos. Indirectamente se pudo determinar que la infección producida no es tan grave para motivar la hospitalización del niño.





# INTRODUCCIÓN.

La gastroenteritis o diarrea aguda constituye una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo produciendo un fuerte impacto entre los niños. La enfermedad se contrae preferentemente durante los primeros 5 años de vida, en un promedio de varios episodios por año, con la potencial deshidratación severa, alteraciones nutricionales y muerte (Bern, C. y cols. , 1993). Si bien hay evidencias que sugieren que la mortalidad ha declinado en la última década, las diarreas siguen siendo una de las causas más importantes de mortalidad en niños menores de 5 años en los países en desarrollo. En Latinoamérica la mortalidad por diarrea en menores de un año se acerca a 20/1000 nacidos vivos. En Santiago, un niño menor de dos años tiene aproximadamente 2,7 episodios de diarrea por año y el riesgo de morir es de 3/1000 nacidos vivos (Prado,V. y cols., 1994). Además, la alta morbilidad que inducen estas infecciones produce un costo en salud importante en términos de tratamiento y hospitalización (Glass,R. y cols., 1994).

La gastroenteritis puede ser causada por diferentes agentes que incluyen bacterias, parásitos y virus. Tanto en países desarrollados como en desarrollo, los rotavirus son los agentes responsables del mayor porcentaje de diarrea severa en niños causando entre el 10-50% de las hospitalizaciones por diarrea aguda en menores de 2 años. También se han asociado otros virus a diarrea aguda en adultos y niños, entre los que se cuentan Adenovirus, Astrovirus, Enterovirus, Coronavirus, y Calicivirus humanos.

Adenovirus son virus DNA sin envoltura, se dividen en dos géneros Mastadenovirus, que infecta a los mamíferos, y el género Aviadenovirus, que infecta a las aves. Los dos

géneros son completamente distintos antigénicamente. A su vez los adenovirus humanos se subdividen en 6 subgéneros (A-F), basados en la homología del DNA. Por definición aquellos con más de 50% de homología son miembros del mismo subgénero, mientras que son de distinto subgénero aquellos con menos del 20% de homología.

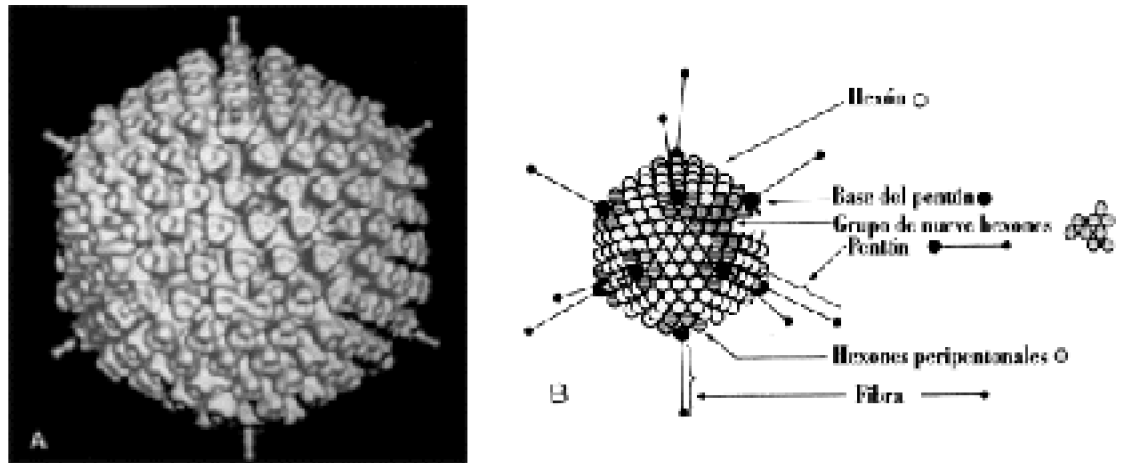
Dentro de cada subgénero los serotipos se definen por reactividad cruzada en test de neutralización. De esta forma se reconocen 47 serotipos de adenovirus humano.

Adenovirus contienen una única copia lineal de DNA doble hebra, la que se asocia a proteínas virales para formar la estructura del core. El core está rodeado por una capa interna de proteínas que a su vez está rodeada por una capa icosaédrica de proteínas, este complejo proteico forma la cápside (Burnett, R., Grutter, M., 1984).

Todos los adenovirus tienen forma icosaédrica con 900 Å de diámetro. Microscopía electrónica de virus completo ha revelado que la cápside está formada por 252 unidades morfológicas (capsómeros), que se distribuyen de tal forma para dar origen a 12 vértices, 30 lados y 20 caras triangulares. Dado que las unidades que se ubican en los vértices tienen 5 unidades vecinas mientras que el resto tiene 6 vecinos, se han denominado pentones y hexones respectivamente (Van oostrum, J. y cols., 1987).

Los pentones consisten de una base, que está embebida en la cápside, y de una fibra apical protuberante que permite la adherencia del virus a receptores en la superficie de la célula huésped.

Los hexones son la principal proteína de la cápside. Es un trímero que puede ser representado por una base hexagonal y una superficie triangular sobrepuesta. A ésta superficie triangular están asociados los determinantes tipo-específico que se utilizan en los ensayos ELISA de detección del virus. La estructura del virión se observa en la figura 1.



**Figura 1. Partícula de adenovirus. A. Imagen tridimensional de la cápside adenoviral reconstruida por computadora. B. Vista esquemática de la partícula adenoviral con los nombres de cada proteína de la cápside.**

Su genoma consta de una única copia de DNA doble hebra, lineal. Tiene un PM de  $20-30 \times 10^6$ , equivalente a 33-45 kilobases. Este codifica para un número considerable de proteínas con peso molecular entre 7500 y 400000, que incluye proteínas estructurales y

no-estructurales (Greenwood, D., Slack, R., 1992).

El DNA se encuentra asociado a proteínas codificadas por el virus, unidas en forma covalente en cada extremo 5'-terminal del genoma lineal. La infectividad relativa, in vitro, se reduce por lo menos 100 veces si se separan estas proteínas por proteólisis. El DNA condensado en el core muestra una distribución similar a 12 grandes esferas apretadas entre sí.

Los adenovirus infectan a las células susceptibles por las fibras apicales de los pentones, que se adhieren a los receptores de la superficie celular. El complejo virus-receptor es transportado por los endosomas cubiertos por clatrina al interior celular. El pH ácido del endosoma, provoca que los viriones eliminen sus pentones y fibras, a su vez este cambio provoca la ruptura de los endosomas y la liberación hacia el citoplasma. El complejo del core ingresa en el núcleo donde las proteínas son reemplazadas por histonas celulares para formar un complejo similar a la cromatina, creándose las condiciones para la expresión de los genes virales.

La gran mayoría de las infecciones con adenovirus son no diagnosticadas. Por otra parte la infección y replicación viral no necesariamente se asocian a enfermedad. Adenovirus infecta células epiteliales de la faringe, conjuntivas, intestino delgado, y algunos sistemas orgánicos, pero está claro que la infección no siempre provoca enfermedad. Diferentes serotipos tienen preferencia por diferentes regiones, dependiendo de la presencia o ausencia de receptores particulares.

Los adenovirus inducen una inmunidad prolongada y adecuada contra la reinfección. Al parecer, la resistencia a enfermedades sintomáticas se relaciona directamente con la existencia de anticuerpos neutralizantes circulantes. Aunque los anticuerpos de tipo específico pueden proteger de los síntomas patológicos, no siempre previenen la reinfección.

Adenovirus son transmitidos por muchos mecanismos: gotas aerosol; la ruta fecal-oral; y la inoculación directa de conjuntivas por dedos, y agua contaminada de piscinas. La ruta fecal-oral es el modo más común de transmisión en niños y en grupos familiares. Muchas especies de animales son infectadas por cepas de adenovirus, pero éstas son no patogénicas para los humanos (Collier, L., Oxford, J., 1993).

Las infecciones por adenovirus son endémicas en todo el mundo. Existen ciertos serotipos que están asociados a síndromes específicos. Por ejemplo tipos 1,2,3,4,5,6,7 causan enfermedades respiratorias; tipos 8,19,37 causan queratoconjuntivitis; tipos 11,21 causan cistitis hemorrágica; y los tipos 40, 41 causan gastroenteritis.

### **Adenovirus entérico.**

Muchos de los 47 serotipos de adenovirus humanos descritos hasta ahora pueden ser eliminados por las deposiciones, a menudo por períodos prolongados, sin asociarse a diarrea (Grimwood, K. y cols., 1995). Existen evidencias serológicas y epidemiológicas que señalan que la infección con adenovirus 40 (Ad40) y adenovirus 41 (Ad41) puede resultar en una diarrea aguda severa en niños (Noel, J. y cols., 1994). Estos dos serotipos conforman el subgrupo F del género adenovirus los que exhiben reacción cruzada en ensayos de neutralización, presentan diferentes perfiles de restricción enzimática y son

denominados *adenovirus entérico*.

Los miembros de este subgrupo son difíciles de crecer en cultivo celular lo que dificultó el desarrollo de métodos diagnósticos específicos. La introducción de técnicas inmunoenzimáticas como ELISA, ha permitido realizar estudios para definir el rol de estos agentes en la etiología de las diarreas agudas infantiles. Estos trabajos han mostrado que Ad40 y Ad41 tienen una distribución mundial y las prevalencias son relativamente similares tanto en países en desarrollo como desarrollados, y en zonas urbanas y rurales.

Los adenovirus del subgrupo F pueden identificarse por técnicas de ELISA en deposiciones, por inmuno-microscopía electrónica, técnicas de hibridización (dot-blot), y por la reacción de la polimerasa en cadena. Es difícil obtener aislados de este subgrupo en cultivos tradicionales, aunque la línea de células renales embrionarias humanas transformadas con fragmento de DNA de adenovirus tipo 5 (células Graham 293) ha dado resultados prometedores.

Diversos estudios realizados en Europa, Estados Unidos, Sudáfrica y Asia muestran que los adenovirus del subgrupo F son agentes importantes de diarrea en niños, causando entre el 7 al 15% de los casos (Jarecki-Khan, K. y cols., 1993; Cruz, J. y cols., 1990; Brown, M., 1990; Kidd, A., 1984). Esto sugiere que los adenovirus entéricos podrían ser la segunda causa viral de diarrea infantil, después de rotavirus (Blacklow, N. y col., 1991). También se han asociado a infecciones nosocomiales y a brotes en guarderías y jardines infantiles (Lew, J. y cols., 1991; Mitchell, D. y cols., 1995; Brandt, C. y cols., 1984). Los pocos estudios realizados en Chile sugieren que adenovirus tiene una menor frecuencia, causando cerca del 2-3% de los episodios de diarrea que no requieren hospitalización. No hay descripciones publicadas sobre estudios que busquen dirigidamente este agente en niños que requieren hospitalización.

El cuadro clínico se caracteriza por: tener un período de incubación de 3-10 días, las deposiciones son de características acuosas y en número de 4-5 evacuaciones por día, el promedio de duración del cuadro es de 10.8 días y en un rango de 4-23 días, afecta a principalmente a niños menores de 2 años y a lactantes, presenta deshidratación severa, y en algunos casos hay vómito y fiebre moderada.

La importancia descrita en el ámbito mundial para adenovirus entérico como causante de diarrea aguda en la población infantil, y el escaso conocimiento de este agente viral en nuestro país, motiva el interés por conocer el panorama de esta infección en Santiago de Chile. Para ello se aplicarán técnicas de ELISA para el estudio de adenovirus, ya conocidas pero poco disponibles en nuestro país, y nuevas técnicas moleculares, como PCR, descritas solo en los últimos años para la detección de este virus.

Con este objetivo se analizaron muestras de niños menores de 5 años con cuadro de diarrea aguda, que acudieron a dos consultorios (Lucas Sierra y Symon Ojeda), un servicio de urgencia (Sótero del Río), y niños que requirieron hospitalización (Roberto del Río).

Sin embargo, dado el período de tiempo en que se tomaron las muestras para realizar este estudio (1 año), no fue posible contar con un número representativo de éstas para establecer parámetros estadísticos (prevalencia, tasa de ataque, riesgo relativo) que

---

permitan apreciar la real importancia de este agente viral en la población infantil de Santiago de Chile. Pero es posible mostrar resultados que describen las mayores frecuencias de adenovirus entérico con relación a la edad, mes del año, además de la severidad de la diarrea la que se estimará indirectamente según la procedencia de la muestra, ya que la diarrea en un niño que requiere hospitalización es de mayor gravedad que el que llega a un servicio de urgencia y posiblemente también respecto al que llega al consultorio.



# OBJETIVOS.

## OBJETIVOS GENERALES.

1. Detección de adenovirus en niños menores de 5 años que presentan cuadro de diarrea aguda, mediante una técnica ELISA género-específica.
2. Tipificación de adenovirus entérico en niños menores de 5 años que presentan cuadro de diarrea aguda, mediante una técnica ELISA tipo-específica comercial, y mediante una técnica de PCR.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Manejo y dominio de una técnica inmunoenzimática en un laboratorio de Virología.
2. Manejo y dominio de una técnica de Biología Molecular aplicada al diagnóstico virológico.
3. Probar una técnica ELISA tipo-específica comercial, determinando su sensibilidad y especificidad, comparándola con una técnica de PCR en la caracterización de

adenovirus entérico.

4. Aplicar técnicas de estadística descriptiva en el análisis de los resultados: Cifras absolutas y distribución de frecuencias.



# MATERIALES Y METODOS.

## MUESTRAS.

Se analizaron muestras de deposiciones de niños menores de 5 años que se encontraban hospitalizados en el Roberto del Río, y de niños menores de 5 años que acudieron en forma ambulatoria a los consultorios Lucas Sierra y Symon Ojeda, por cuadros de diarrea aguda, durante el 1° de abril de 1998 y el 31 de marzo de 1999. Además se analizaron muestras de deposiciones de niños menores de 5 años que acudieron al servicio de urgencia del hospital Sótero del Río por cuadros de diarrea, durante el 1° de septiembre de 1997 y el 19 de mayo de 1998.

Se descartaron aquellos casos que presentaron deposiciones con secreciones sanguinolentas o mucosas, ya que estas características son propias de gastroenteritis de origen bacteriano.

Además se analizaron muestras de niños menores 5 años que concurrieron a los hospitales Roberto del Río y Sótero del Río por una causa distinta a un cuadro de diarrea aguda. Estas muestras se utilizaron como controles.

Para cada muestra se obtuvieron los siguientes datos: nombre del paciente, edad, fecha toma de muestra, fecha inicio del cuadro, y carácter de la muestra (caso o control).

## DETECCION DE ADENOVIRUS EN DEPOSICIONES.

### 1. Detección de adenovirus mediante ELISA.

---

a) Preparación de las muestras: se prepararon suspensiones al 10-20% de las deposiciones en PBS/BSA/TWEEN. Las suspensiones fueron, primero, homogeneizadas por agitación en vortex durante 30 segundos, y luego clarificadas por centrifugación a 3000 rpm x 5 minutos. Se ocuparon 200 ml del sobrenadante.

b) Detección del antígeno: para detectar el antígeno en las deposiciones se utilizó una técnica de ELISA elaborada en el CDC de Atlanta (EE.UU). Anticuerpos monoclonales anti-hexón se usaron como suero de captura positiva, y anticuerpos monoclonales anti-influenza como captura negativa. Microplacas Immunolon II (Dynatech) fueron cubiertas con 100ml de los anticuerpos diluidos 1:3000 en buffer carbonato-bicarbonato (0.05M, pH 9.6) e incubadas a 37°C por 1 hora. Se lavó 6 veces con PBS/T aquí y en las etapas siguientes. Posteriormente se agregó 100 ml de la suspensión de deposiciones, tanto para los pocillos con el suero de captura positivo y negativo, y se incubó por 1 hora a 37°C. Se agregaron 50 ml de un anticuerpo monoclonal biotinilado McAb 2/6 diluido 1:1000 en PBS/Gel/T, y se incubó a 37° por 1 hora, seguido de 50ml de un anticuerpo conjugado con peroxidasa estreptoavidina diluido 1:3000 en PBS/Gel/T. La reacción fue visualizada mediante la adición de 125 ml de una solución de 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (TMB 5mg/ml), y luego de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo usando 50 ml de una solución 2N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda. Como control positivo de la técnica se utilizó un lisado de células Hep2 infectadas por adenovirus 3WC diluidas 1:1000 en PBS/Gel/T. Como control negativo se utilizó un lisado de células Hep2 diluidas 1:1000 en PBS/gel/T.

Las muestras fueron consideradas positivas si el promedio de la absorbancia de los pocillos de captura positiva (P) y negativa (N) cumplió con los siguientes requisitos:  $P/N > 2$  y  $P-N > 0.07$ .

### 2. Tipificación de adenovirus entérico mediante ELISA tipo-específica.

---

Se usó el kit comercial *Premier Adenoclone Type 40/41*. Es una técnica de ELISA que utiliza un anticuerpo monoclonal anti-hexón específico para adenovirus subgrupo F.

a) Preparación de las muestras: Se prepararon suspensiones al 10-20% de las deposiciones que resultaron positivas en el ELISA de screening (CDC-USA), en 500 ml de buffer salino. Las suspensiones fueron homogeneizadas por agitación en vortex por 30 segundos. Se usó un volumen de 100 ml de sobrenadante para el test. Como control positivo se utilizó adenovirus inactivado (AD41), en buffer con Thimerosal 0.02% como preservante, éste viene incluido en el kit. El control negativo corresponde al diluyente de

muestra.

b) Detección del antígeno: Se usaron microplacas sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal tipo-específica para adenovirus tipo 40/41. Se cargó un volumen de 100 ml del sobrenadante de la suspensión de deposiciones y de los controles, y simultáneamente se agregó un volumen de 100 ml de conjugado (Peroxidasa horseradish con un anticuerpo monoclonal murino anti-adenovirus contenidos en un buffer con gentamicina y thimerosal 0.02% como preservantes). Previa agitación suave se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego la placa se lavó 5 veces con agua destilada/deionizada. Después del último lavado se agregó 100ml de un substrato A conteniendo peróxido de urea, y 100 ml de un substrato B conteniendo TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina), y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, al cabo de los cuales la reacción colorimétrica se detuvo agregando 50 ml de una solución de parada (ácido sulfúrico 1 N).

Los resultados fueron analizados en espectrofotómetro a 450nm de longitud de onda. Aquellas lecturas mayores a 0.150 fueron consideradas positivas y aquellas lecturas menores a 0.150 fueron consideradas negativas.

### 3. Tipificación de adenovirus enterico mediante PCR.

a) Obtención de DNA: Aquellas muestras positivas para adenovirus entérico se utilizaron para realizar la técnica de PCR. Se preparó una dilución 1:3 en buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5mM EDTA, y se clarificó por centrifugación a 10000 rpm por 10 min. El sobrenadante resultante fue precipitado toda la noche a 4°C con polietilenglicol (PEG) 8000. Luego esta mezcla se centrifugó a 13.000 r.p.m. por 5 minutos a 4° C. El pellet se resuspendió en 200 ml de buffer de lisis (10 mM Tris-Hcl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.5% SDS, proteinasa K 250 mg/ml) y se incubó por una hora a 37° C. Posterior a la incubación, se centrifugó a 8.000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C y se tomó el sobrenadante, al cual se agregó fenol:cloroformo en relación 1:1. Tras agitar, esta mezcla se centrifugó a 3.000 r.p.m. por 5 minutos, se extrajo la fase acuosa y se mezcló con etanol en una proporción extracto:etanol igual a 1:2. Esta preparación se dejó a 4°C overnight. Finalmente, se centrifugó a 13.000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

b) Oligonucleótidos partidores: Se utilizaron 2 partidores, designados como hexAA1885 y hexAA1913, que corresponden a una región altamente conservada, deducida de las secuencias publicadas del hexón de adenovirus humano.

c) Amplificación: La amplificación de la secuencia blanco (1 ng de DNA viral) se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 50 ml que contiene 50 mM KCl, 10 mM tris-HCl pH 9.0, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tritón x-100, 100 ml de cada dNTP, 0.08 rM de partidores, y 1U de Taq polimerasa. La mezcla se cubrió con 50 ml de aceite mineral para prevenir la evaporación. La reacción se realizó en un termociclador automático. El ciclo inicial consistió en la denaturación del DNA a 92°C por 3 min, alineamiento a 56°C por 30 seg, y la elongación a 72°C por 30 seg. A este ciclo inicial le siguieron 29 ciclos de 30 seg de denaturación a 92°C, 30 seg de alineamiento a 56°C y 30 seg de elongación a 72°C. Se

incluyó un control negativo que lleva solo la mezcla de reacción.

## RESULTADOS.

Se recolectaron en total 793 muestras de deposiciones de niños menores de 5 años. Entre el 1° de abril de 1998 y el 31 de marzo de 1999 se recolectaron 284 muestras de niños hospitalizados en el Roberto del Río, y 150 muestras de niños que concurren en forma ambulatoria a los consultorios Lucas Sierra (51 muestras) y Symon Ojeda (99 muestras), y entre septiembre de 1997 y mayo de 1998 se recolectó un total de 359 muestras de niños que fueron al servicio de urgencia del hospital Sótero del Río. La distribución por sexo y edad de cada servicio se muestra en la tabla 1.

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ADENOVIRUS ENTÉRICO EN NIÑOS CON CUADRO DE DIARREA AGUDA EN SANTIAGO**

Edad (meses)	Consultorios		Hospital Sótero del Hospital Roberto del Río				Total		
	Ma: (M)	Fe: (F)	Río (Servicio de Urgencia)		Río (Hospitalizados)		Ma: (M)	Fe: (F)	TOTAL
0-6	0	15	52	46	9	66	153	23	281
7-12	19	25	51	46	40	49	110	120	230
13-18	15	17	39	33	7	4	61	54	115
19-24	14	6	23	16	2	5	45	27	72
25-36	10	9	14	21	4	5	23	35	63
37-48	2	1	7	11	2	0	1	2	23
48-60	3	2	0	0	1	2	4	5	9
Subtotal	73	77	186	173	153	12	172	35	793
Total Servicios	150		359		284		793		

**Tabla 1.** Total de muestras estudiadas, distribuidas por servicio de origen, edad y sexo. (Cifras absolutas y porcentajes).

Del total de muestras analizadas en el servicio de Urgencia del hospital Sótero del Río, 45 (12.5%) corresponden a muestras controles. De las 284 muestras analizadas provenientes del hospital Roberto del Río, 101 (35.6%) corresponde a controles. No se contó con muestras controles de los consultorios Lucas Sierra y Symon Ojeda.

## DetECCIÓN de adenovirus por ELISA género-específico.

Todas las muestras fueron analizadas por la técnica de ELISA género-específico para la detección de adenovirus en deposiciones. Se encontró un total de 71 muestras positivas para adenovirus (8.9%). En la tabla 2 se presentan los resultados de la técnica ELISA de screening positivo para los casos y los controles. Se obtuvo un total de 65 casos positivos (10%), y 6 controles positivos (4.1%).

SERVICIO	CASOS			CONTROLES		
	n	Adenovirus positivo	%	n	Adenovirus positivo	%
Hospital	133	13	9.8	101	3	2.9
Urgencia	314	35	11.1	45	3	6.6
Consultorios	150	12	8.0	---	---	---
TOTAL	647	60	10.0	146	6	4.1

**Tabla 2.** Casos y controles con ELISA género-específico para adenovirus positivo, distribuidas por servicio de origen. (Cifras absolutas y porcentajes).

### Tipificación de adenovirus por ELISA.

Las 71 muestras positivas para ELISA adenovirus género-específico fueron luego analizadas por el ELISA adenovirus tipo-específico para adenovirus 40 y 41. La tabla 3 muestra el número de casos y controles que resultaron con ELISA tipo-específico positivo, respecto del número total de muestras positivas para ELISA de screening. Se observa que en los casos, 31(47.6%) resultaron positivos para adenovirus entérico, y que 5 (83.3%) de los controles resultaron positivos para adenovirus entérico.

SERVICIO	CASOS			CONTROLES		
	n	Ad. entérico Positivo	%	n	Ad. entérico Positivo	%
Hospital	13	6	33.3	3	2	66.6
Urgencia	35	21	60	3	3	100
Consultorios	12	4	33.3	---	---	---
TOTAL	60	31	47.6	6	5	83.3

**Tabla 3.** Total de casos y controles con test ELISA tipo específico para adenovirus entérico

## DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ADENOVIRUS ENTÉRICO EN NIÑOS CON CUADRO DE DIARREA AGUDA EN SANTIAGO

positivo, respecto del total de muestras positivas en el screening. (Cifras absolutas y porcentajes).

La tabla número 4 muestra los resultados positivos para el test de ELISA tipo-específico con relación al número total de muestras casos y controles analizadas. Los resultados obtenidos indican que en el caso de los niños que requirieron hospitalización por diarrea aguda, un 3.2% resultaron positivos para adenovirus entérico, y para los controles se obtuvo un 1.9% de positivos. Respecto a los niños que acudieron al servicio de urgencia, se encontró un 6.7% de positivos en los casos, y un 6.6% de positivos en los controles. En los consultorios fueron positivos, para adenovirus entérico, un 2.7% de los niños que concurrieron por cuadros de diarrea aguda. En total, en los casos se obtuvo un 4.8% de positivos, y un 3.4% de positivos en los controles.

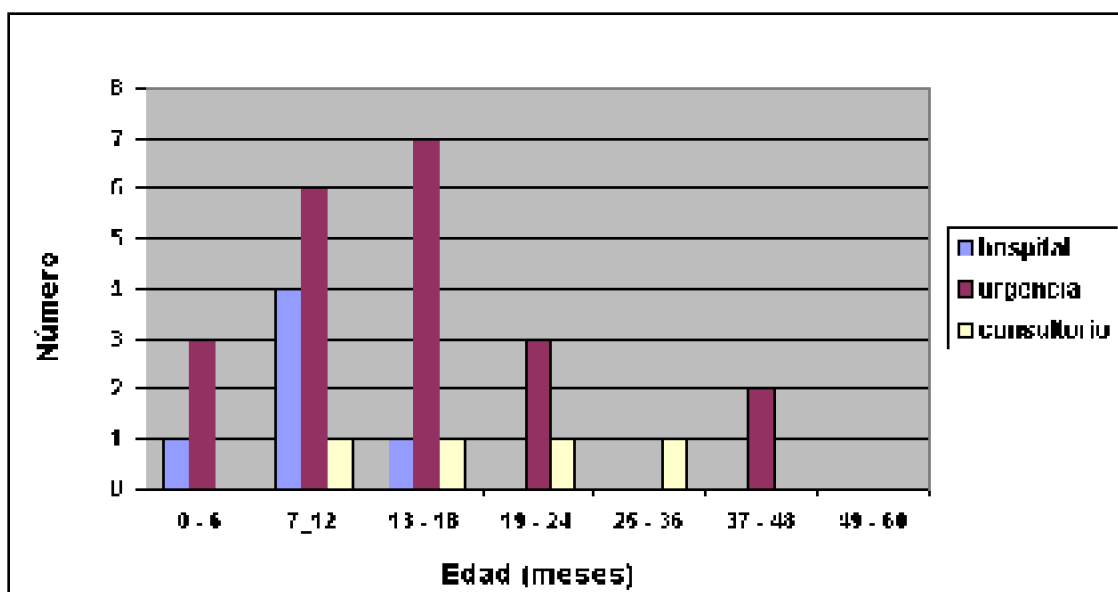
Servicio	CASOS			CONTROLES		
	n	Ad positivo	enterico %	n	Ad positivo	enterico %
Hospital	183	6	3.2	101	2	1.9
Urgencia	214	21	6.7	45	3	6.6
Consultorio	150	4	2.7	---	---	---
TOTAL	547	31	4.8	146	5	3.4

**Tabla 4.** Total de casos y controles con test ELISA tipo-específico para adenovirus entérico positivo, respecto del total de muestras analizadas. (Cifras absolutas y porcentajes).

## Distribución según edad de los casos positivos.

En el gráfico 1 se muestra la distribución por edad de los casos positivos para adenovirus entérico.





**Gráfico 1.** Distribución por edad de los casos positivos para adenovirus entérico, respecto del servicio de origen.

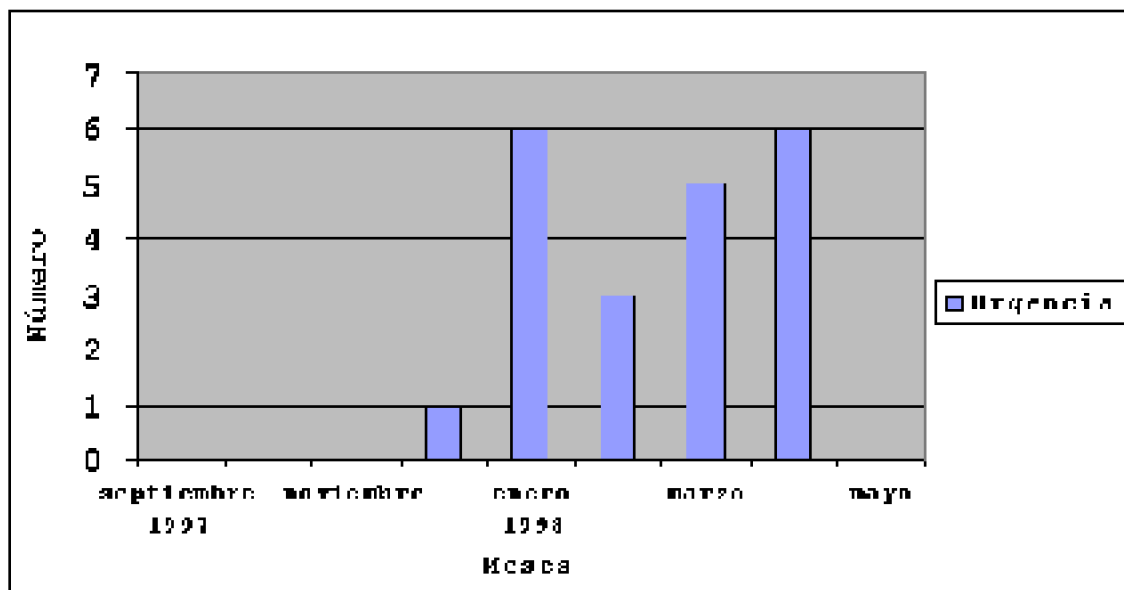
Se observa que el 90.3% de las infecciones de todos los adenovirus entérico detectados, ocurrió en niños menores de 24 meses, encontrándose el 35.5% de estos casos positivos en el grupo de 7-12 meses. Solo 3 casos (9.6%) correspondieron a niños mayores de 24 meses. En el rango de 49 a 60 meses de edad no se presentó ningún caso afectado por adenovirus entérico.

De los 5 niños controles que resultaron positivos para adenovirus entérico el 100% de ellos se ubicó en el rango de 0 a 24 meses de edad (dato no mostrado).

## Distribución mensual de los casos positivos.

En los gráficos 2 y 3 se muestra la distribución mensual de los casos positivos para adenovirus entérico a lo largo del período en que fueron tomadas las muestras para este estudio.

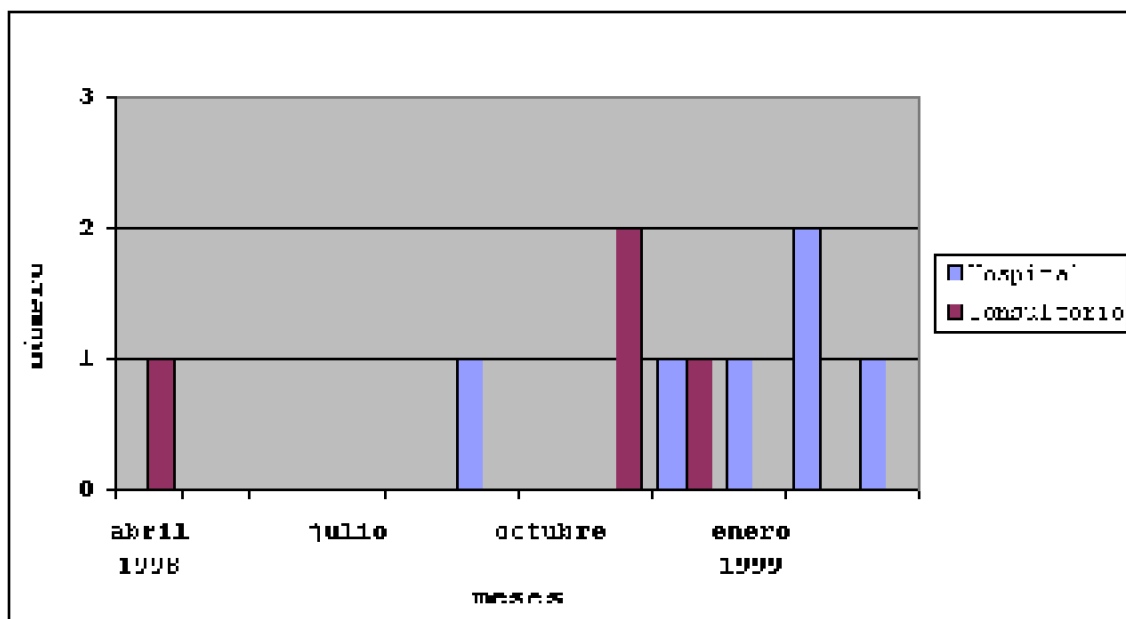
**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ADENOVIRUS ENTÉRICO EN NIÑOS CON CUADRO DE DIARREA AGUDA EN SANTIAGO**



**Gráfico 2.** Distribución mensual desde septiembre de 1997 a mayo de 1998, de los casos positivos para adenovirus entérico encontrados en el servicio de urgencia del Hospital Sótero del Río.

En el gráfico 2 se presentan la distribución de los casos positivos para adenovirus entérico hallados en el servicio de urgencia del hospital Sótero del Río, donde se observa que 1 de ellos ocurrió durante diciembre de 1997, 14 casos se presentaron durante los meses de enero, febrero y marzo de 1998, y 6 casos durante abril de 1998. No se presentó ningún caso durante el resto del período estudiado.

En el gráfico 3 se observa que en el hospital Roberto del Río los 6 casos positivos se distribuyen entre septiembre de 1998 y marzo de 1999. Respecto de los casos positivos en los consultorios Lucas Sierra y Symon Ojeda, se encontró 1 en abril, 2 en diciembre de 1998, y 1 en enero de 1999.



---

**Gráfico 3.** *Distribución mensual durante abril de 1998 a marzo de 1999, de los casos positivos para adenovirus entérico, encontrados en el hospital Roberto del Río, y en los consultorios Lucas Sierra y Symon Ojeda.*

## Tipificación de adenovirus por PCR.

Se siguió el protocolo establecido para la extracción del DNA viral (Noel, J., 1994) y se realizó la metodología para la PCR, pero no se obtuvo amplificado.

Para comprobar si la técnica de extracción era adecuada, es decir, que efectivamente se había obtenido DNA viral puro, se corrió un gel de agarosa, en el cual no se observaron bandas. La extracción de DNA se repitió usando el método descrito anteriormente, así como otros métodos de extracción de DNA viral a partir de muestras de deposiciones, no obteniéndose producto observable en un gel de agarosa.

Debido a las limitaciones de tiempo no se insistió en este punto. Sin embargo, en el laboratorio se están realizando modificaciones a la técnica de extracción de DNA con el objetivo de solucionar este problema y montar la técnica de PCR.



---

## DISCUSIÓN.

Está bien documentado que Ad 40 y 41 está asociado a cuadros de diarrea aguda (Noel, J. y cols, 1994), y que es el segundo agente etiológico de este síndrome en niños (Blacklow, N. y col., 1991).

En nuestro estudio, muestras de deposiciones de niños menores de 5 años con cuadro de diarrea aguda fueron analizadas para detectar Ad genérico. Del total de muestras analizadas, un 8.9% presentó excreción de adenovirus. De estos, un 10% correspondió a casos, y un 4.1% a controles.

En las muestras que resultaron positivas para adenovirus genérico, se encontró que en un 47.6% de los casos hubo excreción de Ad entérico. En relación al total de los casos de diarrea estudiados, un 4.8% fue positivo para Ad entérico. Este porcentaje está dentro de los rangos encontrados en otros países, que van del 1 al 17% (Jarecki-Khan, K. y cols., 1993; Cruz, J. y cols., 1990; Brown, M., 1990; Kidd, A., 1984).

Además se estudiaron muestras controles (niños sin diarrea), en las que se encontró un 3.4% positivos para Ad entérico. Este hecho puede deberse a que existe excreción asintomática, lo que se explica porque no toda infección produce enfermedad (infección subclínica), pero sí existe replicación viral a nivel intestinal y hay eliminación de suficiente carga viral para ser detectadas por la técnica ELISA empleada. Otra explicación a esta situación, es que la excreción de partículas virales puede persistir por un periodo de varios meses, posterior a un cuadro clínico de diarrea (Cukor, G., Blacklow, N.R., 1984). El hallazgo de muestras controles positivas para Ad entérico pudo deberse a que la muestra fue tomada en un periodo asintomático de la infección, o bien una vez terminado

un cuadro clínico.

Respecto a la edad de los niños que fueron positivos para Ad entérico, los resultados obtenidos en nuestro estudio son similares a estudios realizados en otros países, concentrándose la mayoría de los casos en los menores de 24 meses (Bates, P.R., 1993; Cruz, J., 1990; Jarecki-Khan, K., 1993; Noel, J., 1994).

En cuanto a la distribución mensual de Ad 40 y 41 durante el periodo estudiado, encontramos que en los tres servicios involucrados, la mayoría de los casos positivos se presentó durante meses cálidos (gráficos 2 y 3). Otros estudios en que se analizó esta situación, muestran que no hubo variación a lo largo del año, pero presentaron incrementos durante los meses fríos (Noel, J., 1994; Bates, P.R., 199; Uhnou, I., 1984).

De acuerdo a los datos señalados en la tabla 4, la frecuencia de casos de diarrea aguda en que hubo excreción de Ad entérico, es variable de un servicio a otro. Esto hace pensar en la posibilidad que la severidad de la gastroenteritis de aquellos niños que acuden al servicio de urgencia (6.7%) es más grave que la que presentan los niños que concurren a un consultorio (2.7%), pero que no es tan grave para motivar la hospitalización del niño (3.2%).

Del total de casos de diarrea, que fueron positivas para el screening de adenovirus, el 47.6% corresponde a adenovirus entérico, mientras que el 52.3% corresponde a adenovirus no-entérico. El hecho que el test de ELISA adenovirus género-específico haya resultado positivo y que el ELISA adenovirus tipo-específico haya resultado negativo en estos últimos casos, se debe a que hubo excreción de otros serotipos de adenovirus, lo que se relaciona con los niveles de absorbancia detectada.

Los métodos diagnósticos para adenovirus empleados en este estudio estaban restringidos al subgénero F, y no pueden detectar serotipo 31 (subgénero A) que también ha sido asociado a cuadros de gastroenteritis (Brown, M., 1990). En este sentido, es necesario mencionar que lecturas altas de absorbancia en el test de ELISA significa que en la muestra existe una alta concentración del antígeno (carga viral). Esta alta carga viral en las deposiciones evidencia una activa replicación a nivel intestinal. Por lo tanto es factible pensar que en aquellos cuadros de diarrea aguda en que se obtuvo una absorbancia alta en el ELISA de screening y que fueron negativos para el ELISA tipo-específico, estaba presente adenovirus 31.

Por otro lado, es probable que lecturas bajas correspondan a adenovirus respiratorios que llegan al intestino por deglución, y que también son eliminados en las deposiciones.

En base al desarrollo del trabajo y a los resultados obtenidos, podemos concluir que los objetivos trazados en nuestro proyecto fueron cumplidos en su mayor parte, salvo la caracterización de adenovirus por PCR.

Sin duda, es necesario continuar el estudio para determinar las variables epidemiológicas que permitan conocer el panorama real de este agente en los cuadros de diarrea infantil en Santiago de Chile.

---

## BIBLIOGRAFÍA.

- Appelton, H. & Higgins, P.G. "Viruses and gastroenteritis in infants". *Lancet* (1975);i:1297.
- Barnes G.L., Uren E., Stevens K.B. "Etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Melbourne, Australia, from April 1980 to March 1993". *J.Clin.Microbiol.* (1998);36(1):p133-8.
- Bates, P.R., Bailey, D.J., Wood,D.J., Couriel, J.M. "Comparative epidemiology of Rotavirus, Subgenus F (types 40 and 41) Adenovirus, and Astrovirus gastroenteritis in children". *J. Med. Virol.*(1993);39:224-228.
- Bern, C. & Glass, R. Impact of diarrheal diseases worldwide. In: Kapikian, A-Z.ed., "Viral infections of the gastrointestinal tract". New York, Marcel Dekker Inc., pp 1-26(1993).
- Blackwood, N. & Greenberg, H. "Viral gastroenteritis". *N.Engl.J.Med.*(1991);325:252-264.
- Brandt, C., Rodriguez, W., Kim, H., Arrobio, J., Jeffries, B. & Parrot, R. "Rapid presumptive recognition of diarrhea-associated adenoviruses". *J.Clin.Microbiol.*(1984);28:1525-1529.
- Brown M., Grydsuck JD., Fortsas E. "Structural features unique to enteric adenoviruses". *Arch.Virol.Suppl.*(1996);12:p301-7.
- Brown, M. "Laboratory identification of adenoviruses associated with gastroenteritis in Canada from 1983-1986". *J.Clin.Microbiol.*(1990);28:1525-1529.

- Burnett, R., Grütter, M. & White, J. "An Envelope Model of Hexon at 6 Å Resolution". *J.Mol.Biol.*(1984);185:105-123.
- Cepko, C., Whetstone, C., Sharp, P. "Adenovirus hexon monoclonal antibody that is group specific and potentially useful as a diagnostic reagent". *J.Clin.Microbiol.*(1983):360-364.
- Cruz, J., Cáceres, P., Caro, F., Flores, J., Bartlett, A. & Torun, B. "Adenovirus type 40 and 41 and rotaviruses associated with diarrhea in children from Guatemala". *J.Clin.Microbiol.*(1990);28:1780-1784.
- Cukor, G., Blacklow, N.R. "Human viral gastroenteritis". *Microbiological reviews.*(1984);48:157-179.
- De Jong, J., Bijlsma, K., Wermwmbol, A. "Detection, typing, and subtyping of Enteric Adeniviruses 40 and 41 from fecal samples and observation of changing incidence of infections with these types and subtypes". *J. Clin. Microbiol.*(1993);31(6):1562-1569.
- Glass, R. & Bern, C. Gastroenteritis. In: "The epidemiology of childhood disorders". ed. Barry, I., Oxford University Press, pp 221-228(1994).
- Grimwood, K., Carzino, R., Barnes, G. & Bishop, R. "Patients with enteric adenovirus gastroenteritis admitted to an australian pediatric teaching hospital from 1981 to 1992". *J.Clin.Microbiol.*(1995);33:131-136.
- Hammond, G., Hannan, C., Yeh, T., Fischer, K., Mauthe, G., Straus, S. "DNA hybridization for diagnosis of enteric adenovirus infection from directly spotted human fecal specimens". *J.Clin.Microbiol.*(1987);10:1881-1885.
- Herrmann, J., et al. "Incidence of enteric adenoviruses among children in Thailand and the significance of these viruses in gastroenteritis". *J.Clin.Micro.*(1988);26:1783-1786.
- Hussain, M. et al. "Comparison of primer sets for detection of fecal and ocular adenovirus infection using the polymerase chain reaction". *J.Med.Virol.*(1996);49:187-94.
- Jarecki-Khan, K., Tzipori, S. & Unicomb, L. "Enteric adenovirus infection among infants with diarrhea in rural Bangladesh". *J.Clin.Microbiol.*(1993);31:484-489.
- Kidd, A. "Genome variants of adenovirus 41 (suggroup G) from children with diarrhoea in South Africa". *J.Med.Virol.*(1984);14:49-59.
- Kidd, A., Harley, E., Erasmus, M. "Specific detection and typing of adenovirus types 40 and 41 in stool specimens by dot-blot hybridization". *J.Clin.Microb.*(1985);22:934-936.
- Lew, J., Moe, C., Monroe, S. et al. "Astrovirus and adenovirus associated with diarrhea in children in day care settings". *J.Infect.Dis.*(1991);164:673-678.
- Mendis, L., Kumarasinghe, G., Chow, C., Liew, H., et col. "Bacteria, viruses, yeast and protozoans associated with diarrheal in Singapore". *Pathology*(1995);27:48-52.
- Mitchell, D., Monroe, S., Jiang, X., Matson, D., Glass, R. & Pickering, L. "Virological features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by transcriptase-polymerase chain reaction". *J.Infect.Dis.*(1995);172:1437-1444.
- Norrby, E. "The structural and functional diversity of adenovirus capsid components". *J.Gen.Virol.*(1969);5:221-236.
- Noel, J., Mansoor, A., Thaker, U., Hermann, J., Penon-Henry, D. & Cubitt, W.



- 
- "Identification of adenovirus in faeces from patients with diarrhoea at the hospitals for sick children, London 1989-1992". *J.Med.Virol.*(1994);43:84-90.
- Palombo, E., Bishop, R. "Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia". *J.Clin.Micro.*(1996);34:1750-1753.
- Prado, V. & O'Ryan, M. "Acute gastroenteritis in Latin America". *Infect.Dis.Clin.*(1994);1:77-106.
- Rousell, J., Zajdel, ME., Howdle, PD. "Rapid detection of enteric adenoviruses by means of the polymerase chain reaction". *J.Infect.*(1993);27(3):271-5.
- Scott-Taylor, T., Ahluwalia, G., Klisko, B., Hammond, G. "Prevalent Enteric Adenovirus variant not detected by commercial monoclonal antibody enzyme immunoassay". *J.Cli. Microbiol.*(1990);28(12):2797-2801.
- Szucs G., Uj M. "First isolation of enteric adenoviruses type 41 from children acute gastroenteritis in Hungary". *Acta Microbiol Immunol Hung.*(1998);45:425-31.
- Uhnou, I., Wadell, G., Svensson, L., Johanson, M. "Importance of Enteric Adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children". *J. Clin. Microbiol.*(1984);20(3):365-372.
- Unicomb, L., Jarecki-kan, K., Hall, A., Podder, G. "Previous Enteric Adenovirus infection does not protect against subsequent symptomatic infection: longitudinal follow-up of eighth infants". *Microbiol. Immunol.*(1996);40(2):161-168.
- Van Oostrum, J., Smith, P., Mohraz, M. & Burnett, R. "Hexon Packing Determined from Electron Micrographs of Capsid Fragments". *J.Mol.Biol.*(1987);198:73-89.
- Vizzi, E., Ferraro, D., Cascio, A., Di stefano, R., Arista, S. "Detection of enteric adenoviruses 40 and 41 in stool specimens by monoclonal antibody-based ". *Res.Virol*(1996);147:333-339.
- Wood, D., Bailey, A. "Detection of adenovirus types 40 and 41 in stool specimens by immune electron microscopy". *J.Med.Virol.*(1987);21:191-199.
- Wood, D., Bijlsma, J., Jong, C., Tonkin, C. "Evaluation of a commercial monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detection of adenovirus types 40 and 41 in stool specimens". *J.Clin.Micro.*(1989);27(6):1989.