

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



FRECUENCIA DE DETECCIÓN DE TIPOS C2, B3, B7 Y B66
DE ADENOVIRUS HUMANOS RESPIRATORIOS EN
PACIENTES PEDIÁTRICOS GRAVES CON NEUMONÍA EN
DOS PERÍODOS EPIDEMIOLÓGICOS: 1998-2005 Y 2022-
2023 EN SANTIAGO DE CHILE

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Clínica y Memoria para optar al Título de Bioquímica por:

DANIELA ALEJANDRA VARGAS ZÚÑIGA

Directora de Tesis: Dra. Sandra Patricia Ampuero Llanos

Santiago-Chile

Diciembre 2024

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

DANIELA ALEJANDRA VARGAS ZÚÑIGA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Bioquímica Clínica y Título de Bioquímica.

Directora de Tesis:

Dra. Sandra Ampuero



Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Maritza Garrido

Dra. Vivian Luchsinger

Dr. Carlos Santiviago

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de la Dra. Sandra Ampuero, Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y fue financiada por el proyecto N°367829 del Colegio Médico de Chile, investigador principal Dr. Gustavo Saint-Pierre Contreras.

AGRADECIMIENTOS

Luego de más años de los que esperaba, al fin he terminado con el largo camino de la carrera de Bioquímica, y el Magíster en Bioquímica Clínica, me quedo corta en agradecer a mi familia por el apoyo incondicional que he tenido en estos años, en especial a mi amado esposo Juan Pablo y mi suegra Marcela, que sin su apoyo, esto no habría terminado así, no me imagino mi vida sin ellos en ella. Sin restar importancia a mis padres y hermanos que estuvieron en todo el proceso.

Agradecer a mi profesora guía, la Dra. Sandra Ampuero por recibirme en su laboratorio y apoyarme en todo lo que pudo para que este trabajo saliera adelante, no puedo dejar de mencionar al Bioquímico Luis Lizama, que estuvo siempre para ayudarme en este proceso, al señor Cristian y a Gustavo Saint-Pierre, mi compañero de laboratorio y amigo, que sin él todo habría sido mucho más laborioso y solitario.

Gracias a cada persona que estuvo involucrada en el proceso de alguna manera, todos fueron guiando mi camino hasta este punto cúlmine de tener al fin mi título, todos fueron fundamentales para llegar hasta aquí.

Por sobre todo agradezco a Dios por poner en mi camino a todas estas personas y darme la resiliencia y fortaleza para terminar esta etapa de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

FINANCIAMIENTO	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de las enfermedades respiratorias virales	1
1.2 Generalidades de adenovirus humanos	2
1.3 Características estructurales, replicación y organización genómica de AdVH	2
1.4 Infección por AdVH	4
1.5 Diagnóstico de AdVH en cuadros respiratorios	5
1.6 Manifestaciones clínicas, gravedad, circulación y tipos de AdVH	6
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVO GENERAL	10
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
5. MÉTODOS	11
5.1 Población incluida en el estudio, criterios de inclusión y muestras	11
5.1.2. Información registrada de las historias clínicas electrónicas y/o dato de atención del servicio de urgencia	12
5.1.3. Categorización de gravedad	13
5.2 Extracción de material genético	13
5.3 Calidad de la extracción	14
5.4 Estandarización de las reacciones para la tipificación de AdVH C2, B3, B7 y B66 mediante PCR en tiempo real	16
5.5 Detección de los tipos C2, B3, B7, B66 de AdVH en muestras respiratorias de pacientes para ambos períodos	18
	v

5.5.1.1 Detección del gen hexón de AdvH C2 por PCR en tiempo real	20
5.5.1.1.a Ensayo de eficiencia	21
5.5.1.1.b Ensayo de especificidad	22
5.5.1.2 Detección del gen fibra de AdvH C2 por PCR en tiempo real	23
5.5.1.2.a Ensayo de eficiencia	23
5.5.1.2.b Ensayo de especificidad	24
5.5.2 Tipificación AdvH B3 por PCR en tiempo real	25
5.5.2.1 Detección del gen hexón de AdvH B3 por PCR en tiempo real	25
5.5.2.1.a Ensayo de eficiencia	26
5.5.2.1.b Ensayo de especificidad	27
5.5.2.2 Detección de la fibra de AdvH B3 por PCR en tiempo real	28
5.5.2.2.a Ensayo de eficiencia	29
5.5.2.2.b Ensayo de especificidad	30
5.5.3 Tipificación AdvH B7 por PCR en tiempo real	31
5.5.3.1 Detección del gen hexón de AdvH B7 por PCR en tiempo real	31
5.5.3.1.a Ensayo de eficiencia	32
5.5.3.1.b Ensayo de especificidad	33
5.5.3.2 Detección del gen fibra de AdvH B7 por PCR en tiempo real.	34
5.5.3.2.a Ensayo de eficiencia	35
5.5.3.2.b Ensayo de especificidad	35
5.5.4 Tipificación AdvH B66 por PCR en tiempo real	36
5.5.4.1 Detección de la región genómica que codifica la glicoproteína de 20.5 kDa y proteína E3 de 6.6 kDa por PCR en tiempo real	36
5.5.4.1.a Ensayo de eficiencia.	38
5.5.4.1.b Ensayo de especificidad	38
5.6 Análisis <i>in silico</i>	40
5.7 Análisis estadístico	40
6. RESULTADOS	41
6.1 Descripción de la población incluida	41
6.2 Tipificación viral de AdvH de las muestras de pacientes por PCR en tiempo real	43

6.2.2 Tipificación para AdvH B3	44
6.2.3 Tipificación para AdvH B7	45
6.2.4 Tipificación para AdvH B66	45
6.2.5 Muestras no AdvH C2, AdvH B3, AdvH B7 ni AdvH B66	46
6.2.6 Análisis de coinfecciones.	47
6.3 Análisis <i>in silico</i>	48
7. DISCUSIÓN	53
7.1 Visión general	53
7.2 Circulación de los distintos tipos virales	53
7.3 Tipos de muestras y metodología	55
7.4 Consideraciones sobre el análisis de los tipos B3, B66 con B114 de AdvH56	56
7.5 Implicancias del cambio de circulación de AdvH	57
7.6 Limitaciones del estudio	58
8. CONCLUSIONES	59
9. REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura general de una partícula viral de AdvH.....	3
Figura 2: Organización del genoma de adenovirus humano C5.....	4
Figura 3: Derivada de la curva de la temperatura de <i>melting</i> (Tm) del ensayo de PCR tiempo real con partidores del exón 5 de ADA.....	15
Figura 4: Análisis en gel de agarosa de productos amplificados mediante PCR tiempo real con controles positivos de AdvH C2 y B3 para su estandarización.....	17
Figura 5: Gráfico representativo de la curva de <i>melting</i> de la detección del gen hexón para el tipo C2 de AdvH, por PCR tiempo real.....	21
Figura 6: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el gen hexón de AdvH C2.....	21
Figura 7: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo C2 de AdvH, gen hexón.....	22
Figura 8: Gráfico representativo de la curva de <i>melting</i> de la detección del gen fibra para el tipo C2 de AdvH, por PCR en tiempo real.....	23
Figura 9: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el gen fibra de AdvH C2.....	24
Figura 10: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo C2 de AdvH, gen fibra.....	25
Figura 11: Gráfico representativo de la curva de <i>melting</i> de la detección del gen hexón para el tipo B3 de AdvH, por PCR en tiempo real.....	26
Figura 12: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el gen hexón de AdvH B3.....	27
Figura 13: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo B3 de AdvH, gen hexón.....	28
Figura 14: Gráfico representativo de la curva de <i>melting</i> de la detección del gen fibra para el tipo B3 de AdvH, por PCR en tiempo real.....	29
Figura 15: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el gen fibra de AdvH B3.....	30
Figura 16: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo B3 de AdvH, gen fibra.....	30
Figura 17: Gráfico representativo de la curva de <i>melting</i> de la detección del gen hexón para el tipo B7 de AdvH, por PCR en tiempo real.....	32
Figura 18: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el gen hexón de AdvH B7.....	32
Figura 19: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo B7 de AdvH, gen hexón.....	33
Figura 20: Gráfico representativo de la curva de <i>melting</i> de la detección del gen fibra para el tipo B7 de AdvH, por PCR en tiempo real.....	34
Figura 21: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el gen fibra de AdvH B7.....	35

Figura 22: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo B7 de AdvH, gen fibra.....	35
Figura 23: Gráfico representativo de la curva de <i>melting</i> de la detección del tipo B66 de AdvH, por PCR en tiempo real..	37
Figura 24: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el tipo B66 de AdvH.	37
Figura 25: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo B66 de AdvH..	38
Figura 26: Número de muestras positivas para AdvH C2 detectadas por períodos. ...	43
Figura 27: Número de muestras positivas para AdvH B3 detectadas por períodos	44
Figura 28: Número de muestras positivas para AdvH B7 detectadas por períodos. ...	44
Figura 29: Número de muestras positivas para AdvH B66 detectadas por períodos ..	45
Figura 30: Tipificaciones para muestras no AdvH C2, B3, B7 ni B66 por períodos.....	45
Figura 31: Gráfico del resumen de la cantidad de tipificaciones por tipo viral y por períodos.	46
Figura 32: Alineación de los partidores de AdvH B66 en el genoma del tipo B114.....	48
Figura 33: Árbol filogenético de secuencias de AdvH B3, B7, B66 y B114, analizadas en Mega 11.....	49
Figura 34: Distancia por pares de secuencias de AdvH B3, B7, B66 y B114, analizadas en Mega 11.....	49
Figura 35: Árbol filogenético de secuencias de AdvH B3, analizadas en Mega 11.	50
Figura 36: Distancia por pares de secuencias de AdvH B3, analizadas en Mega 11 ..	51
Figura 38: Distancia por pares de secuencias de AdvH B3 y AdvH B114, analizadas en Mega 11.....	51
Figura 37: Árbol filogenético de secuencias de AdvH B3 y AdvH B114, analizadas en Mega 11.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número de casos positivos de virus respiratorios por año (2019-2023) provenientes de la vigilancia epidemiológica del ISP	1
Tabla 2: Clasificación AdvH y asociación a gravedad.....	6
Tabla 3: Tipos recombinantes descritos para las especies B y C de AdvH, en la literatura.	8
Tabla 4: Concentración de reactivos en la reacción de PCR tiempo real para la detección del gen ADA exón 5.....	14
Tabla 5: Programa de amplificación para la detección del gen ADA exón 5 humano, por PCR tiempo real.	15
Tabla 6: Secuencias de referencia usadas para el diseño de partidores con el correspondiente tamaño del producto amplificado mediante PCR tiempo real.....	16
Tabla 7: Secuencias de partidores utilizados para la detección del tipo de AdvH mediante PCR tiempo real.....	19
Tabla 8: Concentración de reactivos en la reacción de PCR en tiempo real, utilizado para la detección de cada gen y tipo AdvH específico.	20
Tabla 9: Programa de amplificación para la detección del gen hexón para el tipo C2 de AdvH, por PCR tiempo real.	20
Tabla 10: Programa de amplificación para la detección del gen fibra para el tipo C2 de AdvH, por PCR tiempo real.	23
Tabla 11: Programa de amplificación para la detección del gen hexón para el tipo B3 de AdvH, por PCR tiempo real.	26
Tabla 12: Programa de amplificación para la detección del gen fibra para el tipo B3 de AdvH, por PCR tiempo real.	29
Tabla 13: Programa de amplificación para la detección del gen hexón para el tipo B7 de AdvH, por PCR tiempo real.	31
Tabla 14: Programa de amplificación para la detección del gen fibra para el tipo B7 de AdvH, por PCR tiempo real.	34
Tabla 15: Programa de amplificación para la detección del gen fibra para el tipo B7 de AdvH, por PCR tiempo real.	36
Tabla 16: Caracterización demográfica de la población pediátrica con diagnóstico positivo para AdvH genérico.....	41
Tabla 17: Datos clínicos de los pacientes del período 2022-2023.	41
Tabla 18: Categorización inicial del grupo pediátrico incluido en el período 2022-2023.	42
Tabla 19: Número de muestras tipificadas con coinfección entre AdvH analizados por períodos.	47
Tabla 20: Resultado del análisis realizado con Blastn del partidador forward de B66 contra la base de datos de la NCBI.	48
Tabla 21: Resultado del análisis realizado con Blastn del partidador reverse de B66 contra la base de datos de la NCBI.	48

ABREVIATURAS

ADA: Adenosina desaminasa
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AdVH: Adenovirus humano
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
CAR: Receptor de coxsackievirus y adenovirus
CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
COLMED: Colegio Médico
Ct: Ciclo umbral
DSG2: Desmogleína 2
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
HCL: Hospital Lucio Córdova
HEGC: Hospital Exequiel González Cortés
HRR: Hospital Roberto del Río
ICBM: Instituto de Ciencias Biomédicas
IFD: Inmunofluorescencia directa
IFI: Inmunofluorescencia indirecta
IRA: infecciones respiratorias agudas
ISP: Instituto de Salud Pública
ITR: Repeticiones terminales invertidas
kDa: Kilodalton
kpb: Kilo pares de bases
N/A: No amplifica
NCBI: Nacional Center for Biotechnology Information
Nm: Nanómetros
ORF: Marco de lectura abierto
Pb: pares de bases
PCR-RFLP: PCR y cortes con enzimas de restricción
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
SDS: Dodecilsulfato sódico
SML: Servicio Médico Legal

Ta: Temperatura de alineamiento

Tm: Temperatura de *melting*

UCI: Unidad de cuidados intensivos

UPC: Unidad de paciente crítico

UTI: Unidad de tratamiento intermedio

VRS: Virus respiratorio sincial

RESUMEN

Introducción: Los Adenovirus humanos (AdVH) son virus ADN de doble hebra lineal, sin manto, que producen cuadros respiratorios especialmente en población pediátrica de evolución leve; aunque hay casos graves y fatales. El diagnóstico de la infección se realiza mediante inmunofluorescencia y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pero sin discriminar el tipo viral. Se ha reportado asociación de los tipos AdVH-B3 y AdVH-B7 a cuadros más graves. No existen datos epidemiológicos actuales de los tipos circulantes en la población pediátrica chilena, especialmente asociados a gravedad. En otras regiones se reportan cambios en la circulación de AdVH aumentando los tipos C2, B3 y B7, en los últimos años.

Objetivo: Comparar la circulación de los tipos C2, B3, B7 y B66 de AdVH en población infantil con enfermedad respiratoria grave por este virus, en Santiago de Chile entre los períodos 1998-2005 y 2022-2023.

Metodología: Se utilizaron 34 muestras de autopsias de infantes fallecidos por neumonía adquirida en la comunidad, recolectadas por el grupo Dr. L.F. Avendaño entre los años 1998 y 2005, provenientes de los hospitales Roberto del Río (HRR) y Exequiel González Cortés (HEGC) y del Servicio Médico Legal (SML), todas positivas para AdVH. Se incorporaron al estudio 54 muestras respiratorias positivas para AdVH obtenidas de población pediátrica consultante en Servicio de Urgencia en los hospitales HRR y HEGC entre agosto 2022 a agosto 2023 y que desarrollaron un curso grave de la enfermedad. Se obtuvo el ADN de las muestras respiratorias respectivas y se tipificaron mediante PCR en tiempo real con partidores específicos para los genes fibra y hexón de los tipos C2, B3 y B7 de AdVH, y para la región genómica del gen de la glicoproteína de 20.5 kDa y gen E3 para el tipo B66 de AdVH. Estos ensayos se diseñaron y optimizaron en el laboratorio. Se utilizó prueba de Fisher en variables categóricas. Se realizó un análisis *in silico* para comparaciones de secuencias de B3, B7 y B66 con el nuevo tipo reportado: B114 (Mega 11®). La obtención de muestras fue aprobada por los Comités de ética respectivos.

Resultados: En el período 1998-2005, la mediana de edad de la población estudiada fue de 3 meses y el 73% se agrupó entre 1 a 6 meses y en el período 2022-2023 fue de 12 meses y el 42% presentó una edad entre 24 a 36 meses. En el diagnóstico clínico hay mayor proporción de neumonía en el periodo 2022-2023 que en 1998-2005. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la detección de los tipos C2 (8,8% a 32,1%) y B66 (91,2% a 35,9%) entre los períodos, mientras que, los cambios en la detección de B3 y B7 no fueron significativos, de 32,4% a 35,9 % y de 14,7% a 1,9%, respectivamente entre los períodos analizados. La tasa en la coinfección entre tipos cambió significativamente de un 55,9% a un 39,6%.

Conclusión: La frecuencia de detección de los tipos estudiados de AdvH fue distinta entre los períodos 1998-2005 y 2022-2023 en población pediátrica grave con enfermedad respiratoria con un aumento de la detección del tipo AdvH-C2 y disminución de AdvH-B66. Con la metodología utilizada no se puede discriminar si las coinfecciones B3 y B66 corresponderían al nuevo tipo B114 recientemente descrito.

ABSTRACT

“FREQUENCY OF DETECTION OF HUMAN RESPIRATORY ADENOVIRUS TYPES C2, B3, B7 AND B66 IN SEVERE PEDIATRIC PATIENTS WITH PNEUMONIA IN TWO EPIDEMIOLOGICAL PERIODS: 1998-2005 AND 2022-2023 IN SANTIAGO, CHILE”

Introduction: Human adenoviruses (HAV) are linear, double-stranded DNA viruses without a coat that cause respiratory symptoms, especially in the pediatric population, with a mild course; although there are severe and fatal cases. The diagnosis of the infection is made by immunofluorescence and polymerase chain reaction (PCR) but without discriminating against the viral type. Association of HAV-B3 and HAV-B7 types with more severe symptoms has been reported. There are no current epidemiological data on the circulating types in the Chilean pediatric population, especially associated with severity. In other regions, changes in the circulation of HAV have been reported, with an increase in types C2, B3, and B7 in recent years.

Objective: To compare the circulation of HAV types C2, B3, B7, and B66 in the pediatric population with severe respiratory disease caused by this virus in Santiago, Chile, between the periods 1998-2005 and 2022-2023.

Methodology: 34 autopsy samples from infants who died from community-acquired pneumonia were used, collected by the Dr. L.F. Avendaño group between 1998 and 2005, from the Roberto del Río (HRR) and Exequiel González Cortés (HEGC) hospitals and the Legal Medical Service (SML), all positive for AdVH. 54 positive respiratory samples for AdVH obtained from the pediatric population consulting the Emergency Service at the HRR and HEGC hospitals between August 2022 and August 2023 and who developed a severe course of the disease were incorporated into the study. DNA was obtained from the respective respiratory samples and typed by real-time PCR with specific primers for the fiber and hexon genes of the C2, B3 and B7 types of AdVH, and for the genomic region of the 20.5 kDa glycoprotein gene and E3 gene for the B66 type of AdVH. These assays were designed and optimized in the laboratory. Fisher's test was

used on categorical variables. An in silico analysis was performed for sequence comparisons of B3, B7 and B66 with the newly reported type: B114 (Mega 11®). The sampling was approved by the respective Ethics Committees.

Results: In the period 1998-2005, the median age of the studied population was 3 months and 73% were grouped between 1 to 6 months and in the period 2022-2023 it was 12 months and 42% were between 24 to 36 months. In the clinical diagnosis there is a higher proportion of pneumonia in the period 2022-2023 than in 1998-2005. Significant differences ($p < 0.05$) were found in the detection of types C2 (8.8% to 32.1%) and B66 (91.2% to 35.9%) between the periods, while the changes in the detection of B3 and B7 were not significant, from 32.4% to 35.9% and from 14.7% to 1.9%, respectively, between the periods analyzed. The rate of co-infection between types changed significantly from 55.9% to 39.6%.

Conclusion: The detection frequency of the studied types of AdvH was different between the periods 1998-2005 and 2022-2023 in a pediatric population with severe respiratory disease, with an increase in the detection of the AdvH-C2 type and a decrease in AdvH-B66. With the methodology used, it is not possible to discriminate whether the B3 and B66 co-infections would correspond to the recently described new type B114.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de las enfermedades respiratorias virales

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son un problema de salud pública relevante a nivel mundial, debido a su morbilidad, alta transmisibilidad y potencial fatalidad, particularmente en grupos de alto riesgo, como adultos mayores, infantes e inmunosuprimidos. En Chile, las IRA son la segunda causa de muerte en población pediátrica, y la tercera causa de muerte en adultos, además de ser la primera causa de consultas ambulatorias y hospitalizaciones (Avendaño, L.F, 2011). Se han determinado varios agentes etiológicos virales que producen estas IRAs. En Chile, actualmente, los cuatro principales agentes detectados en infantes son virus respiratorio sincicial (VRS), adenovirus, virus influenza A y B, y metapneumovirus humano (MPVH) (sintesis.med.uchile.cl, 2023). Adenovirus fue el segundo agente viral circulante en 2023 en Chile, según la vigilancia epidemiológica del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) (ISP, 2023) como se muestra en la **Tabla 1**. En esta tabla se observa el aumento de la circulación de adenovirus con el transcurso de los años hasta llegar a ser el segundo agente etiológico, en Chile según la vigilancia epidemiológica del ISP.

Tabla 1: Número de casos positivos de virus respiratorios por año (2019-2023) provenientes de la vigilancia epidemiológica del ISP

Año	Total casos	VRS	AdVH	Para	Infl A	Infl B	MPVH	SARS-CoV-2
2023	51489	13142	8581	7830	6733	2690	6455	6058
2022	39975	9282	3188	5265	11319	92	5587	5242
2021	5299	3523	343	1299	76	0	58	-
2020	1355	74	518	332	188	63	180	-
2019	20949	8615	1820	2514	3944	2592	1464	-

(Adaptado de (ISP, 2023)) VRS: Virus sincicial respiratorio, AdVH: Adenovirus humano. Para: Virus parainfluenza. Infl A: Virus influenza A. Infl B: Virus influenza B. MPVH: Metapneumovirus

1.2 Generalidades de adenovirus humanos

Los adenovirus humanos (AdVH) presentan una circulación anual (Moriyama, M, 2020) y actualmente son el segundo agente viral más frecuente detectado en las IRA bajas en menores de dos años que requieren hospitalización (Avendaño, L.F, 2011) (Moriyama, M y cols, 2020) (Liu, C. y cols, 2012), luego del VRS (ISP, 2023). Las infecciones por AdVH son potencialmente mortales (sintesis.med.uchile.cl, 2023), éstas se relacionan además a importantes brotes intrahospitalarios, constituyendo un problema en salud pública que no se debe desatender (Flores, C. y cols, 2013).

AdVH fue aislado en los años 50 a partir de cultivo de tejido adenoideo (Rowe, WP y cols, 1953). A través del estudio de su ciclo replicativo se descubrió el mecanismo de corte y empalme del ARNm, trabajo que llevó a uno de sus autores a obtener el premio Nobel de Medicina en 1993 (Chow LT. y cols, 1977). También ha permitido comprender los procesos de presentación de antígenos a las células T y su utilización como vector en la entrega de ADN heterólogo, en terapia génica para patologías como cáncer, y en el desarrollo de vacunas (Lion, T. y cols, 2014).

1.3 Características estructurales, replicación y organización genómica de AdVH

Los AdVH pertenecen a la familia *Adenoviridae* y al género *Mastadenovirus* este virus posee una alta variabilidad y se han descrito 8 especies (A-G), en las cuales se distribuyen los 116 tipos con diferentes tropismos tisulares y manifestaciones clínicas que se han descrito hasta la fecha y nombrados como AdVH y un número correlativo según su publicación. Los tipos reportados hasta el número 51, se denominan serotipos, debido a que su tipificación fue realizada mediante técnicas inmunológicas, diferenciados mediante inhibición de la hemaglutinación y/o neutralización con antisueros específicos a los tipos de adenovirus descritos hasta el año 1999. Desde el tipo 52 en adelante se han tipificado mediante secuenciación y comparación de algunos de sus genes, por lo que se les llama genotipos (De Jong, JC. Y cols, 1999) (Echaverría, M., 2008) (Lii, JPL. y cols, 2016). De manera general serán denominados “tipos”. El genoma de AdVH está

compuesto por ADN de doble hebra lineal de entre 25 a 48 kpb, según la especie, sin manto, con un diámetro de 70 a 100 nm. Además, estos virus poseen una cubierta proteica externa icosaédrica, constituida principalmente por la proteína viral más abundante, el hexón. Cinco proteínas de base pentón forman capsómeros individuales, donde cada uno soporta una proteína de fibra trimérica de tamaño variable la cual se proyecta desde el vértice de la cápside y permite la unión del virus al receptor en la célula (Saint-Pierre, G. y cols, 2023). Su estructura se muestra en la **Figura 1**. La mayoría de los AdvH infectan células epiteliales del sistema respiratorio, digestivo o urinario (dependiendo del tipo), uniéndose al receptor clásico de adenovirus “Receptor de coxsackievirus y adenovirus” (CAR), aunque algunos usan el cofactor de membrana CD46 y/o la proteína de adhesión celular desmogleína 2 (DSG2) como receptor de unión (Lion, T. y cols, 2014).

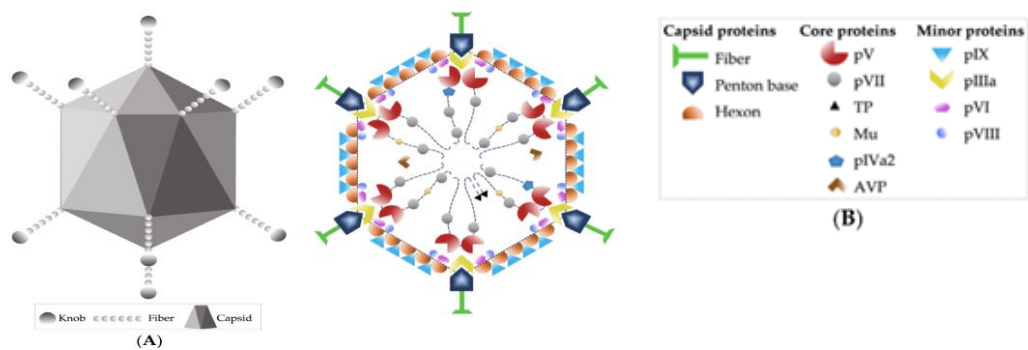


Figura 1: Estructura general de una partícula viral de AdvH. (A) Esquema del exterior del virión AdvH-5. (B) Imagen esquemática de la estructura del ADN y las proteínas dentro de la cápside viral. Adaptado de Saint-Pierre, G. y cols, 2023

En la **Figura 2** se muestra la organización del genoma viral basada en el tipo 5 de la especie C de AdvH, que incluye 4 genes tempranos (E1-E4) y 5 genes tardíos (L1-L5) (Saint-Pierre, G. y cols, 2023). El gen temprano inmediato (E1A) se expresa después de la infección por AdvH y es el activador transcripcional más importante para la expresión génica viral posterior. Los genes tardíos codifican proteínas virales estructurales de la cápside (pentón, hexón y fibra) y proteínas virales centrales (p. ej., proteína VII y proteasa). Finalmente, en ambos extremos del genoma, existen terminaciones repetidas invertidas (ITR) de 145 pares de bases de longitud, que flanquean dos marcos de lectura

abiertos (ORF), E1 y E4. Las ITR constituyen las secuencias virales necesarias en *cis* para la replicación y encapsidación del ADN (Saint-Pierre, G. y cols, 2023). El hexón, el pentón y la fibra son los principales genes blanco para la identificación por biología molecular de este virus y para la identificación del tipo viral (Lii, JPL. y cols, 2016). Debido a procesos de recombinación entre tipos, como se describe posteriormente, habitualmente su diagnóstico es genérico más que tipo específico.

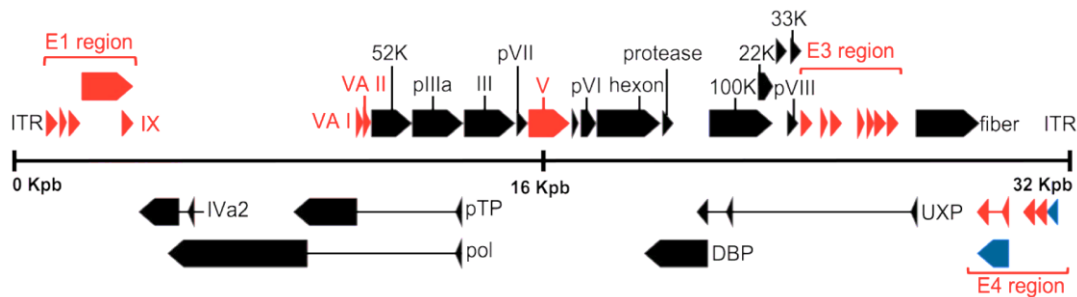


Figura 2: Organización del genoma de adenovirus humano C5. Las flechas de colores representan genes conservados en todos los géneros (negro), presentes en más de un género (azul) o restringidos al género Mastadenovirus (rojo).

1.4 Infección por AdVH

La transmisión de las infecciones por AdVH respiratorios son causadas por la exposición a individuos infectados mediante la inhalación de gotas en aerosol o la inoculación conjuntival directa. La transmisión también puede ocurrir por contacto con tejido infectado, filtros de flujo de aire o superficies ambientales. Algunos tipos virales producen enfermedades gastrointestinales (AdVH digestivos) cuya propagación es fecal-oral, incluido el contacto con aguas de piscinas, agua del grifo contaminada (Soller, JA. Y cols, 2010) (Wan, GH. Y cols, 2012) (Russell, KL. y cols, 2006).

Estas infecciones son habitualmente autolimitadas y generan inmunidad tipo específica (Echaverría, M., 2008). Los AdVH tienen mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero, tales como: inhibición de las funciones del interferón por medio del ARNm viral y los genes de transcripción temprana E1A, asociados al virus, inhibición de la apoptosis celular intrínseca en las células infectadas por el virus y prevención de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I en la superficie celular (Mahr Gooding, LR. 1999).

La enfermedad respiratoria se manifiesta luego de un período de incubación de 5-7 días, el individuo infectado puede desarrollar fiebre, faringitis, laringitis, traqueítis y/o tos no

productiva; el proceso inflamatorio puede extenderse a los bronquios, bronquiolos y parénquima pulmonar. La enfermedad se resuelve en un período de 8 a 36 días. Las complicaciones más graves, como desarrollo de neumonía, se presentan en el 10-20% de los casos especialmente pediátricos (Bernaola, G y Luque, W.).

1.5 Diagnóstico de AdvH en cuadros respiratorios

El diagnóstico de las infecciones por AdvH se realiza principalmente por métodos directos. Entre éstos, están el aislamiento del virus en cultivo celular, la detección de genoma por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) individual o en reacciones múltiples, la detección de antígenos mediante inmunoensayos de flujo lateral o inmunofluorescencia. Aunque esta última está disponible, técnica de PCR se ha transformado en la más utilizada a nivel clínico. El diagnóstico indirecto mediante la detección de anticuerpos es poco útil debido a la baja sensibilidad, por respuestas heterotípicas o la producción inadecuada de anticuerpos, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Además, como es una infección aguda con desarrollo rápido de síntomas, la producción de anticuerpos no permite discriminar tempranamente la infección en el ámbito clínico (Russell, KL. y cols, 2006). La confirmación diagnóstica de cuadros respiratorios producidos por AdvH en servicios de salud, se realiza más habitualmente mediante PCR genérico para AdvH, sin discriminar específicamente el tipo viral. Este diagnóstico no permite tener datos epidemiológicos de los tipos circulantes, y aunque se tienen datos de mayor gravedad asociado a algún tipo en específico, no se pueden tomar medidas preventivas para este tipo de casos antes de su evolución a mayor gravedad (ISP, 2023).

Actualmente existen paneles sindrómicos, los cuales se utilizan para determinar la presencia de varios agentes infecciosos a la vez, aunque este método tiene un costo monetario más elevado, está siendo utilizado en clínica para tener un diagnóstico más amplio de los posibles agentes respiratorios. En esta detección múltiple se incluye el AdvH (Marcone, D. N. y cols, 2015).

1.6 Manifestaciones clínicas, gravedad, circulación y tipos de AdVH

Los adenovirus provocan síntomas parecidos a los del resfriado común, como rinorrea, tos y dolor de garganta, aunque las infecciones de las vías respiratorias inferiores, como la bronquitis, la bronquiolitis y la neumonía, pueden ser graves e incluso mortales (Avenidaño, L.F, 2011). Los tipos de la especie C (C1, C2, C6, C7 y C57) se asocian generalmente con infecciones respiratorias agudas leves y en algunos casos se ha descrito desarrollo de infecciones persistentes latentes en pacientes inmunocomprometidos (Lii, JPL. y cols, 2016). Por otro lado, en pacientes inmunocomprometidos los tipos ya mencionados, además de algunos de la especie A (A12 y A31) y de la especie B (B3, B7, B11, B16, B34 y B35) se asocian a mayor morbilidad y mortalidad (Marcone, D. N. y cols, 2015). Se sabe además que los tipos de la especie D generan enfermedades oculares y gastrointestinales y que los tipos de las especies A, F y G están asociados mayoritariamente a gastroenteritis (Wu, X. y cols, 2014) (**Tabla 2**)

Tabla 2: Clasificación AdVH y asociación a gravedad. Modificado de Saint-Pierre, G. y cols. (2023)

Especies	Tipos	Enfermedades asociadas	Tipo AdVH en cuadros graves o mortales
A	12, 18, 31.	Infección entérica críptica.	Desconocido
B	3, 7, 11, 14, 16, 31, 34, 35, 50, 66, 114.	Conjuntivitis, Enfermedad respiratoria aguda, Cistitis hemorrágica, Enfermedades del sistema nervioso central.	Tipo 3 y 7
C	1, 2, 5, 6.	Infecciones endémicas, Síntomas respiratorios.	Tipo 5
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54.	Queratoconjuntivitis en pacientes inmunocomprometidos y con SIDA.	Desconocido
E	4.	Conjuntivitis, Enfermedad respiratoria aguda.	Desconocido
F	40, 41.	Diarrea infantil.	Desconocido
G	52.	Gastroenteritis.	Desconocido

En la **Tabla 2** se destacan los tipos B3, C5 y B7 como causantes de enfermedades graves.

La mayoría de los estudios han asociado la especie viral con gravedad, en donde se ha visto que los tipos de la especie B (Palomino, MA. Y cols, 2000) se relacionan a una estadía hospitalaria mayor. Por otro lado, se ha reportado en los últimos años en Latinoamérica una mayor detección de los tipos virales B3, B7, B66 y C2 en población hospitalizada (Marcone, D. N. y cols, 2021); sin embargo, son pocos los estudios que han determinado el tipo viral específico de AdVH en población con una enfermedad más grave (Marcone, D. N. y cols, 2015) (Xu, D. y cols, 2022) (Kajon, AE. Y cols, 2019). Debido a la alta transmisibilidad de este virus, si hay genotipos que producen cuadros más graves, su detección sería muy relevante en brotes hospitalarios, especialmente para evitar la infección en pacientes inmunocomprometidos e infantes y tomar medidas preventivas a tiempo. Poder implementar un diagnóstico en clínica con buena sensibilidad y costo-beneficio es uno de los desafíos para lograr tener un mayor control de los brotes, conociendo la gravedad asociada al tipo específico (Lii, JPL. y cols, 2016).

Luego de la implementación de la genotipificación mediante amplificación por PCR y cortes con enzimas de restricción (PCR-RFLP), en el año 1984 Palominos y colaboradores realizaron un estudio en Chile entre los años 1995 y 2000. Se estudiaron 101 infantes y se identificó el tipo B7h en 57 de estos. Este tipo viral se asoció a una mayor estadía hospitalaria, secuelas pulmonares y muerte (21). Actualmente, este tipo viral se denomina B66 (Dehghan, S. y cols, 2012) y es un recombinante que presenta la fibra del AdVH3 (B3), el hexón de AdVH7 (B7), mientras que el pentón sería característico de este tipo viral (B66).

En la literatura encontramos distintos tipos de AdVH recombinantes, principalmente de las familias B y C, éstos se desarrollan cuando se encuentran dos o más tipos diferentes infectando a una misma célula, de esta manera, eventualmente, la ADN polimerasa del AdVH de uno de los tipos ocupa como molde parte del genoma del otro tipo disponible en las células, generando un genoma recombinante (Barrios, JC. Y cols, 2016). Se ha reportado en la literatura que los genes hipervariables hexón, fibra y pentón son sitios

susceptibles a los eventos de recombinación, pudiendo ocurrir en regiones intragénicas, o en las zonas flanqueantes a los genes (Robinson, CM. y cols, 2013). En la **Tabla 3** se describen los tipos recombinantes de especie B y C encontrados en la literatura y publicados en la página “HAdV Working Group” donde se incluyen a qué tipo viral se asocian los genes de hexón, fibra y pentón de cada recombinante (HAdV Working Group, 2023). No se conoce el mecanismo molecular exacto de las recombinaciones, pero se sugiere que puede ser debido a la presión selectiva del sistema inmune sobre la cápside viral (Robinson, CM. Y cols, 2009).

Tabla 3: Tipos recombinantes descritos para las especies B y C de AdVH, en la literatura.

Genotipo AdVH	Nombre	# Acceso Genbank	Año publicación	Pentón	Hexón	Fibra
HAdV-B55	P14H11F14/2006/CHN	FJ643676	2009	14	11	14
HAdV-C57	P1H57F6/2001/RUS	HQ003817	2011	1	57	6
HAdV-B66	P7H7F3/1987/ARG	JN860676	2012	7	7	3
HAdV-B68	P16H3F16/2004/ARG	JN860678	2011	16	3	16
HAdV-B76	P21H21F16/DEU	KF633445	2013	21	21	16
HAdV-B77	P35H34F7/1985/DEU	KF268328	2013	35	34	7
HAdV-B78	P11H11F7/2013/USA	KT970441	2016	11	11	7
HAdV-B79	P11H34F11/2015/JPN	LC177352	2016	11	34	11
HAdV-C89	P89H2F2/2015/DEU	MH121097	2019	89	2	2
HAdV-C104	P1H1F2/2017/CHN	MH558113	2021	1	1	2
HAdV-B106	P11H11F35	ON393912	2020	11	11	35
HAdV-C108	P1H2F2	N/A	2014	1	2	2
HAdV-B114	P7H3F3	OR853835	2023	7	3	3

Aparte de los procesos de recombinación señalados, se ha descrito que la prevalencia geográfica de las especies y tipos de AdVH va cambiando durante el tiempo (Lion, T. y cols, 2014). Actualmente, los tipos virales más frecuentes encontrados en casos hospitalarios en el mundo son el C1, C2, B3 y B7 (Robinson, CM. y cols, 2013) (Marcone, D. N. y cols, 2015). Por otro lado, se han descrito cambios de la distribución de los tipos

encontrados con mayor frecuencia en el tiempo, como lo descrito por Marcone y colaboradores en 2021 (Marcone, D. N. y cols, 2021). En este estudio realizado en Argentina se observan cambios en la distribución de los tipos de AdVH entre los años 2000 y 2018, evidenciando que desde el año 2014 no se identifican muestras de la especie B, mientras que sólo entre el 2000 y el 2005 se detectó el tipo B66. La detección de los tipos de la especie C, como el tipo C2, se ve aumentada en los últimos años de investigación (Marcone, DN. Y cols, 2021). En 2023, en Chile se realizó un estudio sobre los tipos de AdVH circulantes de los casos incluidos en el sistema de vigilancia de virus respiratorios por el ISP. En este informe, el tipo con mayor circulación fue B3 en un 71% de los casos, seguido del tipo C2 en un 13% de los casos (ISP, 2023). En un estudio realizado en China por Liu y colaboradores del 2015 (Liu, C. y cols, 2007), entre los años 2007 y 2012, se observó un cambio en la distribución de los genotipos como, por ejemplo, la desaparición del genotipo B55 en los años 2009 y 2010 y una prevalencia del tipo C2 en el último tramo temporal del estudio (Wu, X. y cols, 2023). Actualmente se desconocen los factores que favorecen la circulación de uno u otro tipo viral y su relevancia en cuanto a la gravedad. Sin embargo, los cambios en la circulación implicarán mayores posibilidades que el hospedero no tenga respuesta inmune de memoria para ese nuevo tipo viral con posible sintomatología más compleja, especialmente, en población con factores de riesgo como lactantes, adultos mayores e inmunosuprimidos.

Según estudios anteriores (ISP, 2023) (Marcone, D. N. y cols, 2015) (Marcone, D. N. y cols, 2021) que un individuo se infecte con uno u otro tipo de adenovirus podría cambiar su pronóstico de gravedad, y por ende saber con qué tipo viral está infectado nos ayuda a saber si es necesario un plan de contención mayor de los síntomas y un seguimiento más acucioso de lo normal. Por otro lado, se sabe que la circulación de AdVH cambia en el tiempo, lo que es importante para saber si la población está expuesta a un tipo viral que genera un curso más o menos grave de enfermedad. Todo lo anterior nos lleva a plantear que sería relevante la tipificación de AdVH en la clínica, para tener un plan de contención de los síntomas de los pacientes según el tipo viral con el que esté infectado.

2. HIPÓTESIS

“Los tipos C2, B3 y B7 de AdvH se detectan con una mayor frecuencia en el período 2022-2023 en comparación al período 1998-2005 que el tipo B66 de AdvH, en muestras respiratorias de población pediátrica con enfermedad respiratoria grave o mortal, en Santiago de Chile”.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si en muestras respiratorias de población pediátrica de Santiago de Chile con enfermedad grave o mortal por AdvH se detecta más frecuentemente los tipos C2, B3 y B7 de AdvH que B66 de AdvH en el período 2022-2023 en comparación al período 1998-2005.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1 Determinar la frecuencia de detección de los tipos C2, B3, B7 y B66 de AdvH, en los períodos 1998-2005 y 2022-2023, en muestras respiratorias de población pediátrica con enfermedad respiratoria grave o mortal.

4.2 Comparar la frecuencia de detección de los tipos de AdvH C2, B3, B7 y B66 entre los distintos períodos estudiados, para determinar los cambios entre esos períodos.

5. MÉTODOS

5.1 Población incluida en el estudio, criterios de inclusión y muestras

Se realizó el siguiente muestreo por conveniencia:

Período 1998-2005

Para este período se incorporaron pacientes, menores de 3 años, fallecidos por neumonía adquirida en la comunidad, sin inmunosupresión registrada, entre los años 1998 y 2011, incluidos en proyectos de investigación previos (investigador responsable Dr. Luis Avendaño, Programa de Virología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile). La población fue reclutada desde los hospitales Roberto del Río (HRR), Exequiel González Cortés (HEGC) y del Servicio Médico Legal (SML).

Se recolectaron muestras de tejido de pulmón y aspirado traqueal de autopsias de esta población pediátrica. La obtención de estas muestras fue parte del proyecto Fondecyt n° 1980892. Mediante estudios anatomopatológicos realizados en dicho proyecto se estableció que el fallecimiento había sido por AdvH. Las muestras fueron mantenidas a -80°C en las dependencias del Programa de Virología del ICBM. De los 273 casos, 43 fueron positivos para AdvH mediante PCR anidado, cultivo viral o inmunofluorescencia indirecta (IFI), y de esta población se tenían disponibles muestras de 34 casos para su análisis en esta tesis.

Período 2022-2023

Para este período se incorporaron pacientes menores de 3 años, consultantes en servicio de urgencia por cuadros respiratorios en los hospitales HRR y HEGC. El diagnóstico de consulta incluyó uno de los siguientes códigos según la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10): Enfermedades infecciosas del tracto respiratorio superior (J00-J06), gripe y neumonía (J10-J18), enfermedades infecciosas de las vías respiratorias inferiores (J20-J22) (Cázares-Ramírez E. y Acosta-Bastidas MA., 2014). Se incluyeron pacientes con coinfección respiratoria viral o bacteriana. Se excluyeron pacientes con comorbilidades específicas como genopatía, malformación

pulmonar/vía aérea, postración o dependiente de oxigenoterapia crónica según lo registrado en la ficha clínica.

Las muestras respiratorias fueron obtenidas por torulado nasofaríngeo entre agosto 2022 y agosto 2023. Este protocolo forma parte del proyecto de investigación COLMED cuyo investigador responsable es el Dr. Gustavo Saint-Pierre y forma parte de su tesis de Magíster en Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Se incorporaron a este estudio sólo aquellas muestras previamente positivas para AdvH genérico. Este diagnóstico etiológico fue realizado en cada laboratorio hospitalario mediante PCR tiempo real (kit ARVI Screen Real-TM® o NxTAG® Panel de Patógenos Respiratorios de Luminex®) o por inmunofluorescencia directa (IFD; IFD D3 Ultra 8™ Respiratory virus screening & identification kit) según protocolo de cada Institución. La utilización de estas muestras para el estudio específico de AdvH fue aprobada por el comité de ética del Servicio Metropolitano Sur (resolución Memorandum N° 010/2023) y autorizado por ambas direcciones hospitalarias (HRR y HEGC).

Aquellas muestras con un resultado positivo para AdvH, fueron retiradas de los centros clínicos y almacenadas a -20°C en el Programa de Virología del ICBM y fueron rotuladas con un número correlativo para su manejo en el laboratorio. El número entregado por el laboratorio hospitalario se mantuvo para permitir la trazabilidad hacia la ficha clínica de los y las pacientes. Posterior a obtener esa información se eliminó el número del centro hospitalario en la base de datos y en la muestra. Se incluyeron 54 muestras en este estudio de este período.

5.1.2. Información registrada de las historias clínicas electrónicas y/o dato de atención del servicio de urgencia

Muestras del período 1998-2005: Debido a la fecha de la obtención de estas muestras se utilizaron registros previamente confeccionados donde está consignado: fecha de obtención de la muestra, edad, sexo, fecha del deceso, diagnóstico clínico y resultados de pruebas de diagnóstico virológico (aislamiento viral, IFI, PCR anidada). No se tienen antecedentes de otros datos clínicos o demográficos.

Muestras del período 2022-2023: A través de las historias clínicas electrónicas, se registraron los siguientes datos: tiempo de hospitalización, evolución de la hospitalización, edad, sexo, comorbilidades, tratamientos farmacológicos crónicos, tratamiento médico indicado durante la hospitalización, estadía en la unidad de pacientes críticos (UPC), uso de antivirales, requerimientos de oxigenoterapia, tiempo en el que se requirió oxigenoterapia, desenlace de hospitalización (traslado a UPC, alta domiciliaria, fallecimiento dentro de 30 días desde el ingreso).

5.1.3. Categorización de gravedad

En este estudio toda muestra del período 1998-2005 se consideró proveniente de un/a paciente grave.

En el caso de las muestras obtenidas del período 2022-2023 se consideró proveniente de un/a paciente grave al cumplir con uno o más de los siguientes criterios:

- Al ingreso al recinto hospitalario ser clategorizado según los criterios del "triángulo de gravedad" de la evaluación pediátrica siendo como C1 o C2 (Kajon, AE. y cols, 2019)
- Ingreso a la UPC
- Requerimiento de oxigenoterapia por más de 4 días
- Fallecimiento durante la hospitalización como resultado del diagnóstico.

UPC se define como una unidad de cuidados críticos que incluye unidad de tratamiento intermedio (UTI) y unidad de cuidados intensivos (UCI).

5.2 Extracción de material genético

El material genético de las muestras del período 1998-2005, se extrajo previamente mediante una metodología líquido-líquido utilizando fenol saturado básico, fenol-cloroformo y cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, con previo tratamiento con proteinasa K, dodecilsulfato sódico (SDS) y *buffer* TNE (Tris-HCl, NaCl, EDTA).

Por otro lado, el material genético de las muestras del período 2022-2023, se extrajo mediante un sistema de columnas de sílica, utilizando el kit de extracción de Epicentre, MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification kit, y el kit de extracción de GeneAll, GeneAll® Exgene™ Blood SV Mini Kit siguiendo las indicaciones del fabricante. El material genético se cuantificó utilizando el espectrofotómetro EPOCH de BioTek.

5.3 Calidad de la extracción de ácido nucleico

Para determinar que la extracción fue realizada de forma satisfactoria, teniendo material genético amplificable en las muestras y que no existieran posibles diferencias en el rendimiento de ambas técnicas de extracción se realizó un análisis mediante PCR tiempo real amplificando un sector de un gen celular. Se realizó la amplificación del exón 5 del gen celular ADA cuya detección ya estaba implementada en el laboratorio utilizando el kit KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit y partidores previamente diseñados. Considerando que el gen ADA está codificado en todas las células, en todas las muestras extraídas se debería obtener un producto amplificado. Esto también permitió determinar que no existían interferentes o inhibidores de la reacción de PCR tiempo real. Los componentes finales de la reacción se describen en la **Tabla 4** y las temperaturas y tiempo utilizado se describen en la **Tabla 5**.

Tabla 4: Concentración de reactivos en la reacción de PCR tiempo real para la detección del gen ADA exón 5

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final en la reacción	Volumen (µL) por reacción
Kapa SYBR Fast	2x	1x	5
Partidor ADA EV F1	10 µM	200 nM	0,2
Partidor ADA EV R1	10 µM	200 nM	0,2
Agua			2,6
Vol Total mix			8
Muestra			2
Volumen total			10

Tabla 5: Programa de amplificación para la detección del gen ADA exón 5 humano, por PCR tiempo real.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Nº ciclos
Activación de la Enzima	95	180	1
Desnaturación Inicial	95	15	45
<i>Annealing</i>	60	60	
Curva de <i>Melting</i>	55°C - 95°C		

En la **Figura 3**, se observa la derivada de la curva de *melting* para obtener la T_m del ensayo de amplificación del exón 5 del gen ADA. En todas las muestras extraídas se obtuvo un sólo producto a la misma temperatura que el control positivo, por lo cual se consideran que en todas las muestras había material genético y no habría inhibidores de la reacción. No hubo diferencias entre las muestras extraídas entre los dos períodos.

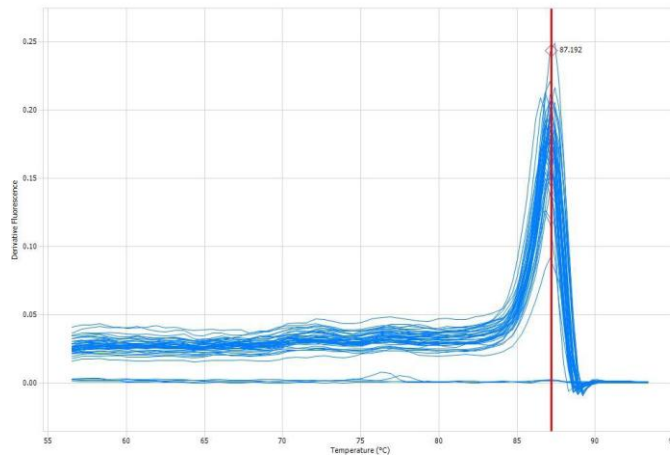


Figura 3: Derivada de la curva de la temperatura de *melting* (T_m) del ensayo de PCR tiempo real con partidores del exón 5 de ADA. T_m : 87,1°C.

Por otro lado, se seleccionaron muestras del período 1998-2005, y se realizó una extracción por columnas de sílica (GeneAII® Exgene™ Blood SV Mini Kit), para luego

realizar una PCR tiempo real (KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit) de un gen específico de AdvH para verificar que los resultados no fueran alterados por la diferencia en la técnica de extracción de las muestras de los distintos períodos. Los resultados fueron similares independiente de la técnica de extracción.

5.4 Estandarización de las reacciones para la tipificación de AdvH C2, B3, B7 y B66 mediante PCR tiempo real

Se diseñaron partidores para cada gen (hexón y fibra de C2, B3 y B7, y sector de E3 de B66), basándose en las secuencias de referencias señaladas en la **Tabla 6**. Estos diseños se realizaron por integrantes del laboratorio utilizando el programa *Beacon Designer 8* (Premier Biosoft int. ®)

Las reacciones de PCR tiempo real fueron optimizadas antes de la tipificación de las muestras. Se utilizó los datos de temperatura de alineamiento (Ta) de los partidores entregados por el programa *Beacon Designer* y el tamaño del amplicón para determinar, mediante ensayo y error, la temperatura, el tiempo de alineamiento y las concentraciones de los partidores adecuados para cada sector amplificado. En la **Tabla 6** se indican los tamaños esperados de cada una de las amplificaciones.

Tabla 6: Secuencias de referencia usadas para el diseño de partidores con el correspondiente tamaño del producto amplificado mediante PCR tiempo real.

Tipo de AdvH	Gen blanco	Secuencia de referencia	Tamaño amplificado (pb)
C2	Hexón	AF542118	117
C2	Fibra	MW024792	75
B3	Hexón	X76549	130
B3	Fibra	DQ086466	90
B7	Hexón	AF51814	86
B7	Fibra	AC00001	80
B66	Gp - E3	JN860676	242

pb: pares de bases.

Aunque las reacciones se estandarizaron para PCR tiempo real con agente intercalante, para comprobar el tamaño del producto amplificado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3%. En la **Figura 4** se muestra un gel representativo con amplificadores obtenidos en PCR tiempo real para C2, B3, B7 y B66.

Electroforesis en gel de agarosa al 3%. En cada carril se cargaron 10 μ L de producto amplificado con 2 μ L de buffer de carga 6x. Se indica tipo viral y gen

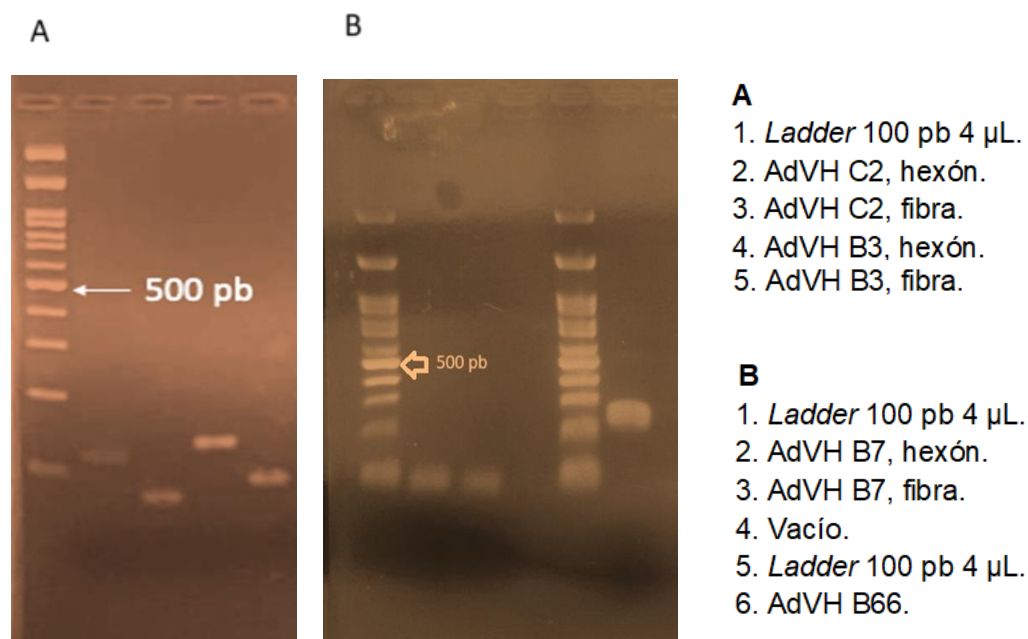


Figura 4: Análisis en gel de agarosa de productos amplificados mediante PCR tiempo real con controles positivos de AdVH C2 y B3 para su estandarización.

Como se muestra en la **Figura 4 A** y **B**, los tamaños de amplificadores obtenidos son los esperables según la información compilada en la **Tabla 6**.

Para los ensayos de optimización y posteriores validaciones de cada PCR tiempo real, se utilizó ADN extraído de controles AdVH positivos donados por el Dr L. Avendaño y provenientes del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Fragmentos amplificados de los genes hexón y pentón de los controles de C2, B3, B7 y B66 fueron secuenciados corroborando su especificidad.

Las condiciones finales de las reacciones de PCR tiempo real para cada tipo y gen viral se detallan en la siguiente sección.

Posterior a la optimización de tiempo, temperatura y concentraciones de partidores para la amplificación mediante PCR tiempo real, se realizaron dos ensayos con cada tipo de AdVH y gen estudiado: un ensayo de eficiencia, utilizando diluciones seriadas de los controles (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000, 1:1.000.000); y un ensayo de especificidad, para definir reacciones cruzadas con otros tipos de AdVH. Las amplificaciones, curvas de Tm y curvas de eficiencia se detallan en cada uno de los genes amplificados.

5.5 Detección de los tipos C2, B3, B7, B66 de AdVH en muestras respiratorias de pacientes para ambos períodos

La tipificación de las muestras de pacientes se realizó mediante PCR en tiempo real cualitativo amplificando los genes fibra y hexón para los tipos virales C2, B3, B7 y la región del genoma viral comprendida entre los sectores que codifican la glicoproteína de 20,5 kDa y la proteína E3 de 6,6 kDa para el genotipo B66. Se utilizaron dos sectores para la tipificación de C2, B3 y B7 para mejorar la discriminación.

Todas las reacciones de PCR tiempo real se realizaron en el equipo Eco Real Time PCR de Illumina utilizando el reactivo KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) (Kapa Biosystem).

Se consideró como una amplificación positiva para un gen determinado, aquellos productos amplificados que presentaron una Tm similar a la Tm obtenida en el amplificado del control positivo aceptando una desviación de $\pm 0.6^{\circ}\text{C}$. Además, debía presentar un *peak* claro de Tm en el programa del equipo utilizado. Para considerar que una muestra es positiva para un tipo de AdVH en particular, debía obtenerse un valor de Cq (valor entregado por el equipo, análogo a Ct) similar entre los dos genes amplificados para el mismo tipo viral (hexón y fibra) aceptando una diferencia menor a ≤ 2 ciclos entre ambas amplificaciones.

En la **Tabla 7** se muestran los partidores utilizados para cada gen y tipo.

Tabla 7: Secuencias de partidores utilizados para la detección del tipo de AdVH mediante PCR tiempo real.

Tipo	Gen	Partidor	Secuencia (5' - 3')
C2	Hexón	<i>Forward</i>	CGAGATCAGGCTACTAAGAA
		<i>Reverse</i>	AGGTTTAGCTTGTGTTTCTG
	Fibra	<i>Forward</i>	CCTCCGCACCACTTACAA
		<i>Reverse</i>	CGCCGCTAGTAACTATCAGAG
B3	Hexón	<i>Forward</i>	GACATTACCATACTGAAGGAGAA
		<i>Reverse</i>	GGGCTCTTCCACCAAACCT
	Fibra	<i>Forward</i>	AACGCCTGCCAGATAGTC
		<i>Reverse</i>	GGGTTGCCTGAGTAGTTTCT
B7	Hexón	<i>Forward</i>	AGTAACACCAACCGAAGGAGATG
		<i>Reverse</i>	AAGCGTCAGCCAGCTTCTCTAC
	Fibra	<i>Forward</i>	CATATTGTATTCGTCGTGTAACCTGGT
		<i>Reverse</i>	GGTGACTAGGGTAGTAGCA
B66	E3-Gp	<i>Forward</i>	ATCATTACTGCCGTGGTA
		<i>Reverse</i>	GAATTTCTATGAACATTGTATGC

En la **Tabla 8** se describen los componentes finales de las reacciones de PCR utilizadas en cada tipificación posterior a su optimización. Todas las determinaciones se realizaron en duplicado, excepto los ensayos eficiencia que se desarrollaron en triplicado.

Tabla 8: Concentración de reactivos en la reacción de PCR en tiempo real, utilizado para la detección de cada gen y tipo AdvH específico.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final en la reacción	Volumen (µL) por reacción
Kapa SYBR Fast	2x	1x	5
Partidor <i>Forward</i> Gen y Tipo específico*	10 µM	200 nM	0,2
Partidor <i>Reverse</i> Gen y Tipo específico*	10 µM	200 nM	0,2
Agua			2,6
Volumen Total del mix			8
Volumen de la extracción de ácido nucleico			2
Volumen total en pocillo			10

* Detallado en **Tabla 8**.

A continuación, se describe cada una de las reacciones de PCR tiempo real para la tipificación de C2, B3, B7 y B66.

5.5.1.1 Detección del gen hexón de AdvH C2 por PCR en tiempo real

Los partidores utilizados para esta reacción se describen en la **Tabla 7** y los componentes finales en la **Tabla 8**. En la **Tabla 9** se describen las temperaturas y los tiempos utilizado para esta amplificación. En la **Figura 5** se muestra un gráfico representativo de la curva de fusión de la reacción.

Tabla 9: Programa de amplificación para la detección del gen hexón para el tipo C2 de AdvH, por PCR en tiempo real.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Nº ciclos
Activación de la Enzima	95	180	1
Desnaturación Inicial	95	5	40
<i>Annealing</i>	58	60	
Curva de <i>Melting</i>	55°C - 95°C		

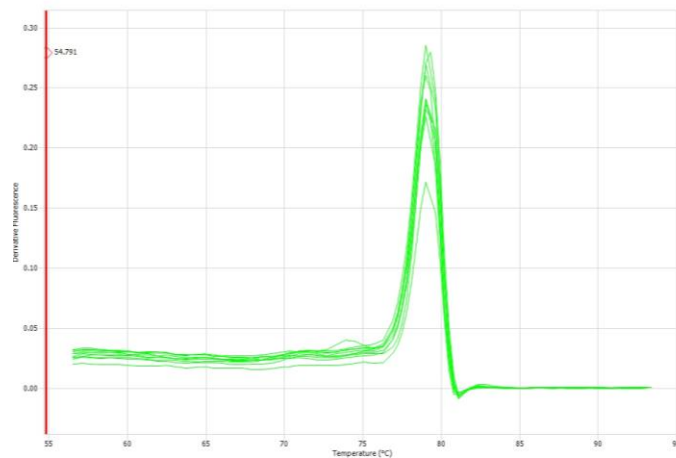


Figura 5: Gráfico representativo de la curva de *melting* de la detección del gen hexón para el tipo C2 de AdvH, por PCR tiempo real. La T_m observada es de 79°C.

5.5.1.1.a Ensayo de eficiencia

Para el ensayo de eficiencia se realizó un PCR tiempo real utilizando diluciones seriadas en base 10 del control positivo del tipo C2 con las condiciones optimizadas del ensayo, y cada punto en triplicado. Se obtuvieron los datos de eficiencia del ensayo, la pendiente del gráfico (dilución versus Ct) y el coeficiente de correlación de la regresión lineal obtenida del gráfico mencionado (**Figura 6**). Según la información de literatura, los datos de eficiencia óptimos deben ser cercanos al 100% ($\pm 10\%$) (Aguilera, P. y cols, 2014) y la pendiente cercana a -3.32 ($\pm 10\%$) (Termo Fisher Scientific, 2024).

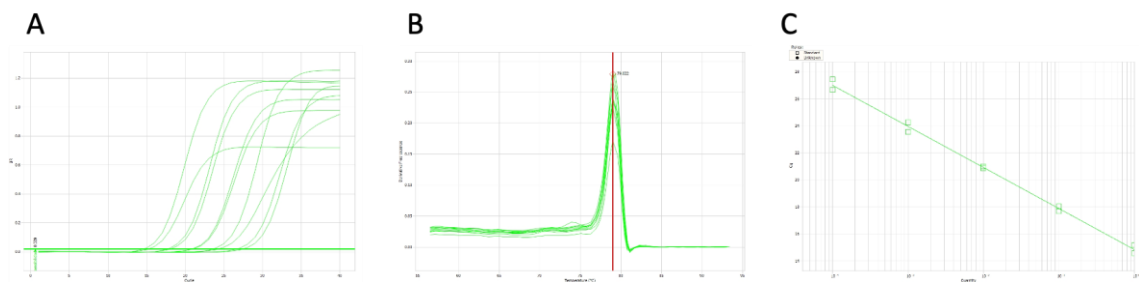


Figura 6: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el gen hexón de AdvH C2. A. Perfil de amplificación. B. Perfil de T_m del ensayo, T_m : 79°C. C. Gráfico dilución versus Ct

Los resultados obtenidos en este ensayo se indican a continuación.

- Eficiencia: 113,12%
- Pendiente: -3,04
- R²: 0,995
- T_m: 79°C

5.5.1.1.b Ensayo de especificidad

Se realizaron ensayos de especificidad utilizando los controles positivos para los tipos virales de AdVH C1, C2, B3, E4, C5, B7, B66 (B7h) y B14. Se utilizó una dilución cuya Ct obtenida en la reacción específica estuviera entre 24 a 27. Se realizó un PCR tiempo real con los partidores específicos para el hexón del tipo C2 de AdVH y con los controles antes señalados. Las amplificaciones y curva de T_m se muestran en la **Figura 7**.

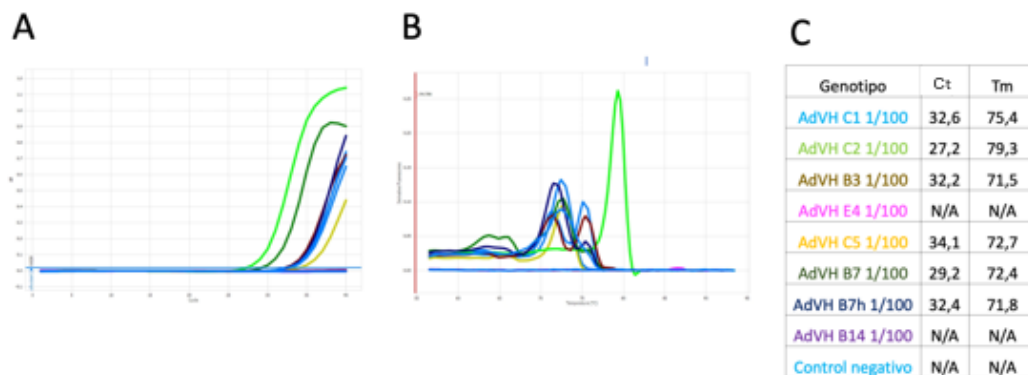


Figura 7: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo C2 de AdVH, gen hexón. A. Perfil de amplificación del ensayo. B. Perfil de T_m del ensayo. C. Resultados de Ct y T_m de cada tipo.

En la **Figura 7** se observa un amplificado positivo para el control AdVH C2 (línea verde). A pesar de que se observa amplificación y curvas de T_m en los controles de C1, B3, B7 y B7h, estas curvas tienen una T_m menor al control positivo de C2 (**Figura 7C**). Los amplificados fueron analizados en una electroforesis en gel de agarosa y corresponden a dímeros de partidores.

5.5.1.2 Detección del gen fibra de AdvH C2 por PCR tiempo real

Los partidores utilizados para esta reacción se describen en la **Tabla 7** y los componentes finales en la **Tabla 8**. En la **Tabla 10** se describen las temperaturas y los tiempos utilizado para esta amplificación. En la **Figura 8** se muestra un gráfico representativo de la curva de fusión de la reacción.

Tabla 10: Programa de amplificación para la detección del gen fibra para el tipo C2 de AdvH, por PCR tiempo real.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Nº ciclos
Activación de la Enzima	95	180	1
Desnaturación Inicial	95	15	40
<i>Annealing</i>	56	60	
Curva de <i>Melting</i>	55°C - 95°C		

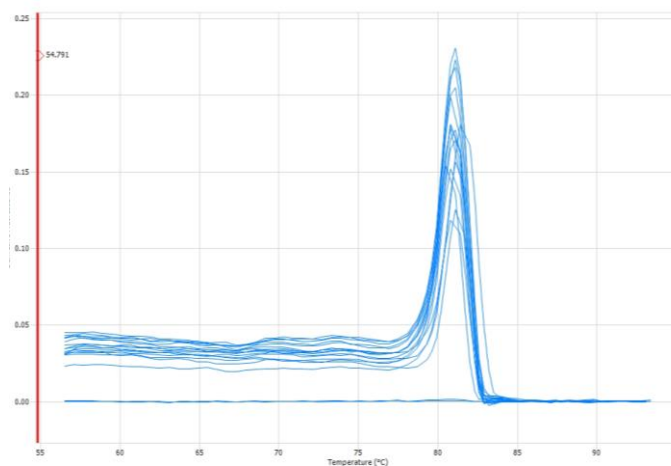


Figura 8: Gráfico representativo de la curva de *melting* de la detección del gen fibra para el tipo C2 de AdvH, por PCR en tiempo real. La Tm observada es de 79°C.

5.5.1.2.a Ensayo de eficiencia

Como se mencionó en el apartado 5.5.1.1.a, se realizó un ensayo de eficiencia para este gen, los resultados se muestran en la **Figura 9**.

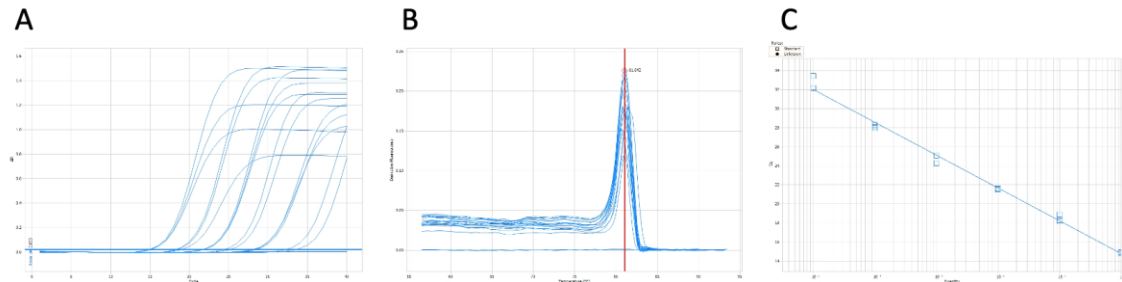


Figura 9: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el gen fibra de AdVH C2. A. Perfil de amplificación. B. Perfil de Tm del ensayo, Tm: 81,1°C. C. Gráfico de dilución versus Ct.

Los resultados obtenidos en este ensayo se indican a continuación.

- Eficiencia: 95,27%
- Pendiente: -3,44
- R²: 0,992
- TM: 81,1°C

5.5.1.2.b Ensayo de especificidad

De manera similar a lo descrito en el punto **5.5.1.1.b** se realizó un PCR tiempo real con los partidores específicos para la fibra del tipo C2 de AdVH y con los controles positivos de los tipos virales anteriormente señalados. Las amplificaciones y curva de Tm se muestran en la **Figura 10**.

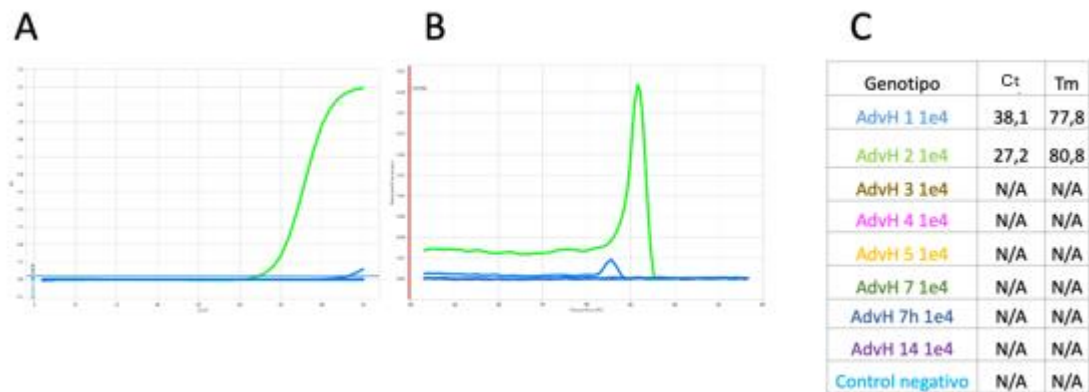


Figura 10: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo C2 de AdvH, gen fibra. A. Perfil de amplificación del ensayo. B. Perfil de Tm del ensayo. C. Resultados de Ct y Tm de cada tipo.

En la **Figura 10** se aprecia la amplificación del control positivo de C2, fibra (línea verde), y una pequeña amplificación del tipo C1. La Tm de este producto no corresponde a la Tm específica y presenta un alto Ct (**Figura 10C**), corroborado mediante análisis en gel de agarosa.

5.5.2 Tipificación AdvH B3 por PCR tiempo real

Las muestras se analizaron mediante PCR tiempo real, utilizando partidores específicos para el gen hexón y fibra de AdvH tipo B3 de manera independiente. Las condiciones para la amplificación de este tipo fueron estandarizadas y se detallan a continuación.

5.5.2.1 Detección del gen hexón de AdvH B3 por PCR tiempo real

Los partidores utilizados para esta reacción se describen en la **Tabla 7** y los componentes finales en la **Tabla 8**. En la **Tabla 11** se describen las temperaturas y los tiempos utilizado para esta amplificación. En la **Figura 11** se muestra un gráfico representativo de la curva de fusión de la reacción.

Tabla 11: Programa de amplificación para la detección del gen hexón para el tipo B3 de AdvH, por PCR tiempo real.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Nº ciclos
Activación de la Enzima	95	180	1
Desnaturación Inicial	95	15	40
<i>Annealing</i>	60	60	
Curva de <i>Melting</i>	55°C - 95°C		

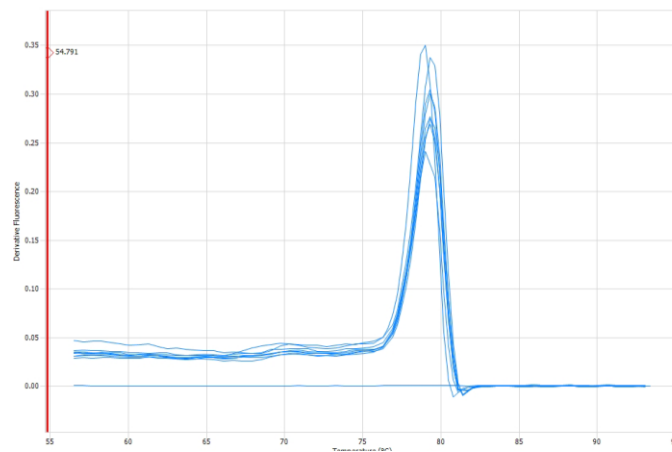


Figura 11: Gráfico representativo de la curva de *melting* de la detección del gen hexón para el tipo B3 de AdvH, por PCR en tiempo real. La Tm observada es de 79°C.

5.5.2.1.a Ensayo de eficiencia

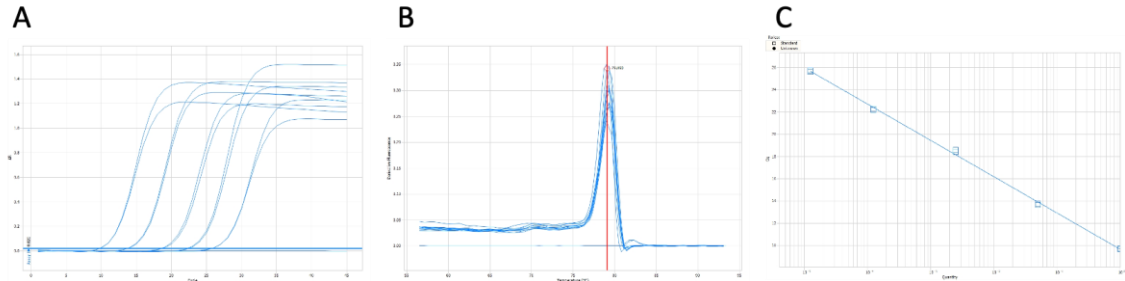


Figura 12: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el gen hexón de AdVH B3. A. Perfil de amplificación. B. Perfil de Tm del ensayo, Tm: 79°C C. Gráfico de dilución versus Ct.

De manera similar a lo mencionado en el apartado 5.5.1.1.a, se realizó un ensayo de eficiencia para este gen, los resultados se muestran en la **Figura 12**.

Los resultados obtenidos en este ensayo se indican a continuación.

- Eficiencia: 107,71%
- Pendiente: -3,15
- R2: 0,997
- TM: 79°C

5.5.2.1.b Ensayo de especificidad

De manera similar a lo descrito en el punto **5.5.1.1.b** se realizó un PCR tiempo real con los partidores específicos para el hexón del tipo B3 de AdVH y con los controles antes señalados. Las amplificaciones y curva de Tm se muestran en la **Figura 13**.

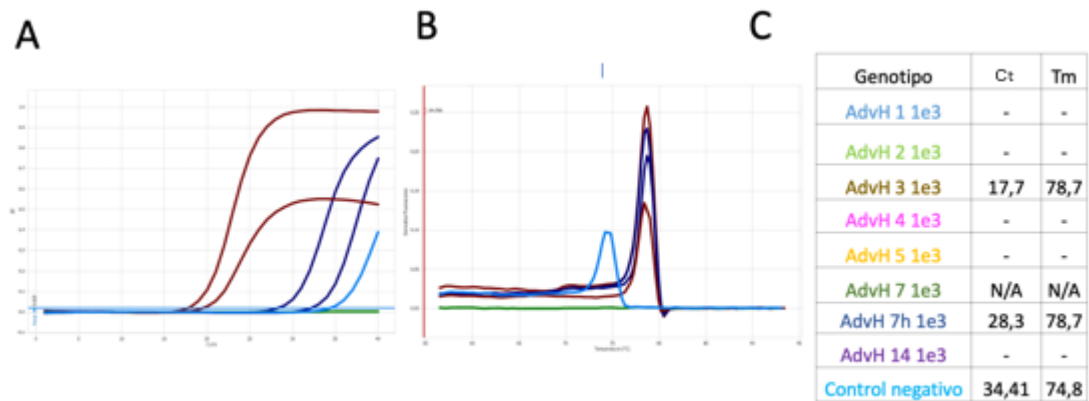


Figura 13: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo B3 de AdvH, gen hexón. A. Perfil de amplificación del ensayo. B. Perfil de Tm del ensayo. C. Resultados de Ct y Tm de cada tipo

En la **Figura 13** se aprecia una curva positiva para el amplificado del control de AdvH B3 (línea café). Además, curvas de Tm en el control negativo y en el control de B66 (**Figura 13C**). El amplificado de B66 se produce en un ciclo alto en comparación al control positivo, lo que podría definirse como contaminación del ambiente, mientras que el amplificado del control negativo se analizó mediante gel de agarosa y corresponden a dímeros de partidores.

5.5.2.2 Detección de la fibra de AdvH B3 por PCR tiempo real

Los partidores utilizados para esta reacción se describen en la **Tabla 7** y los componentes finales en la **Tabla 8**. En la **Tabla 12** se describen las temperaturas y los tiempos utilizados para esta amplificación. En la **Figura 14** se muestra un gráfico representativo de la curva de fusión de la reacción.

Tabla 12: Programa de amplificación para la detección del gen fibra para el tipo B3 de AdvH, por PCR tiempo real.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Nº ciclos
Activación de la Enzima	95	180	1
Desnaturación Inicial	95	15	40
<i>Annealing</i>	60	60	
Curva de <i>Melting</i>	55°C - 95°C		

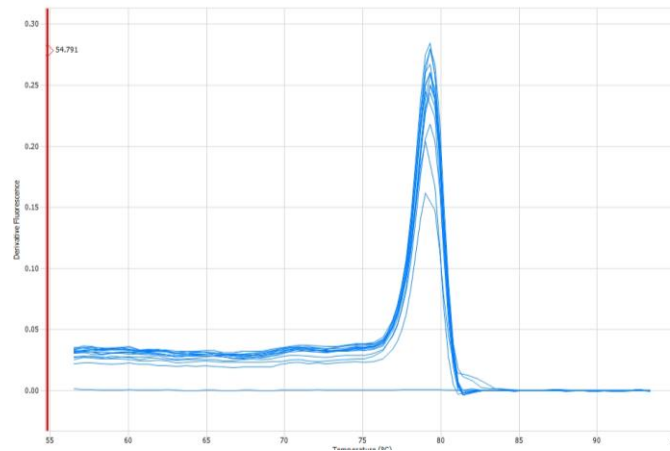


Figura 14: Gráfico representativo de la curva de *melting* de la detección del gen fibra para el tipo B3 de AdvH, por PCR en tiempo real. La Tm observada es de 79°C.

5.5.2.2.a Ensayo de eficiencia

Como se mencionó en el apartado 5.5.1.1.a, se realizó un ensayo de eficiencia para este gen, los resultados se muestran en la **Figura 15**.

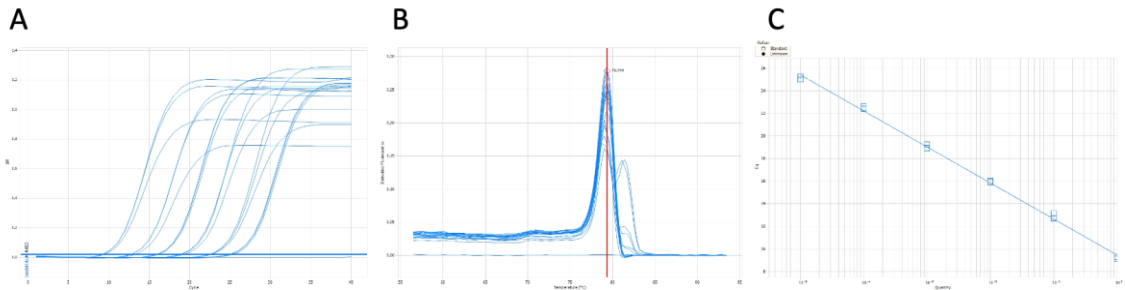


Figura 15: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el gen fibra de AdvH B3. A. Perfil de amplificación. B. Perfil de Tm del ensayo, Tm: 79,3°C. C. Gráfico de dilución versus Ct.

Los resultados obtenidos en este ensayo se indican a continuación.

- Eficiencia: 105,98%
- Pendiente: -3,19
- R2: 0,998
- TM: 79,3°C

5.5.2.2.b Ensayo de especificidad

De manera similar a lo descrito en el punto 5.5.1.1.b se realizó un PCR tiempo real con los partidores específicos para la fibra del tipo B3 de AdvH y con los controles antes señalados. Las amplificaciones y curvas de Tm se muestran en la **Figura 16**.

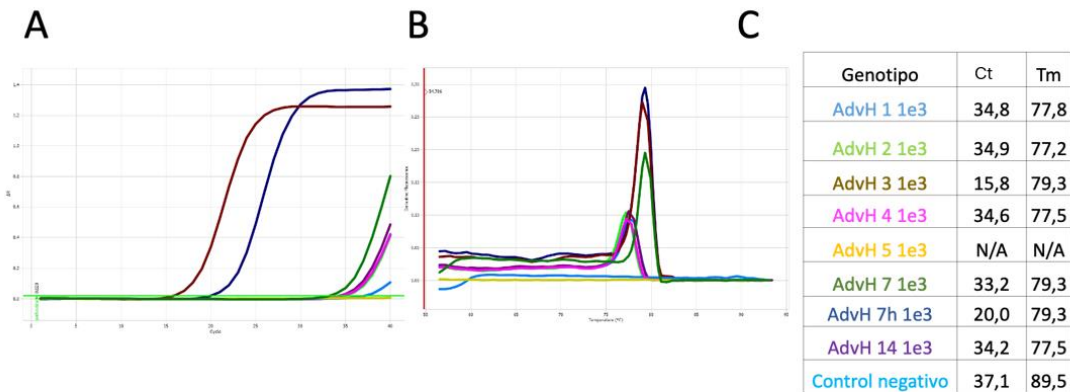


Figura 16: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo B3 de AdvH, gen fibra. A. Perfil de amplificación del ensayo. B. Perfil de Tm del ensayo. C. Resultados de Ct y Tm de cada tipo.

En la **Figura 16** se aprecia una curva positiva obtenida en la amplificación del control de AdvH B3 (línea café). Además amplificación y curvas de Tm en los controles de B7 y B66 (B7h); la amplificación B66 era esperable, por su genética recombinante con B3 en el gen de la fibra, por otro lado, el producto de amplificación de B7 se produce en un ciclo alto (**Figura 16C**) en comparación al producto del control positivo, por lo que se puede definir como contaminación ambiental.

5.5.3 Tipificación AdvH B7 por PCR tiempo real

Las muestras se analizaron mediante PCR tiempo real, utilizando partidores específicos para el gen hexón y fibra de AdvH tipo B7 de manera independiente. Las condiciones estandarizadas se detallan a continuación.

5.5.3.1 Detección del gen hexón de AdvH B7 por PCR tiempo real

Los partidores utilizados para esta reacción se describen en la **Tabla 7** y los componentes finales en la **Tabla 8**. En la **Tabla 13** se describen las temperaturas y los tiempos utilizado para esta amplificación. En la **Figura 17** se muestra un gráfico representativo de la curva de fusión de la reacción.

Tabla 13: Programa de amplificación para la detección del gen hexón para el tipo B7 de AdvH, por PCR tiempo real.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Nº ciclos
Activación de la Enzima	95	180	1
Desnaturación Inicial	95	15	40
<i>Annealing</i>	60	60	
Curva de <i>Melting</i>	55°C - 95°C		

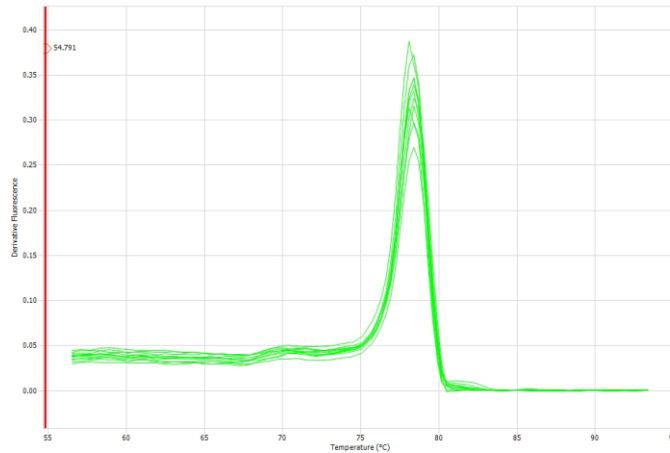


Figura 17: Gráfico representativo de la curva de *melting* de la detección del gen hexón para el tipo B7 de AdvH, por PCR en tiempo real. La T_m observada es de 79°C.

5.5.3.1.a Ensayo de eficiencia

Como se mencionó anteriormente en el apartado 5.6.1.1.a, se realizó un ensayo de eficiencia para este gen, los resultados se muestran en la **Figura 18**.

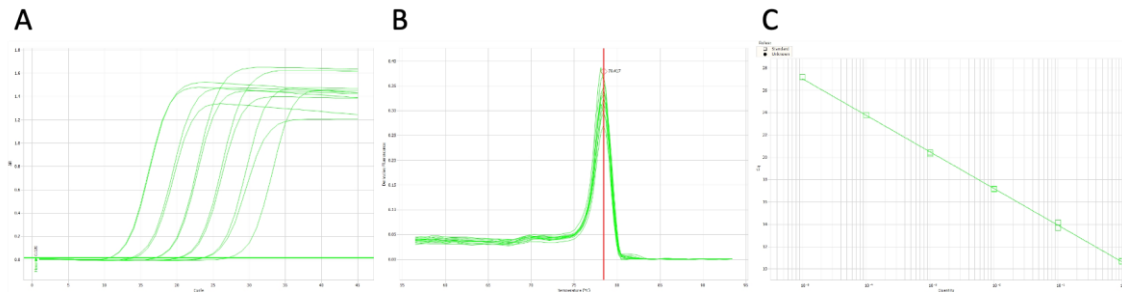


Figura 18: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el gen hexón de AdvH B7 A. Perfil de amplificación. B. Perfil de T_m del ensayo, T_m : 78,4°C C. Gráfico de dilución versus Ct.

Los resultados obtenidos en este ensayo se indican a continuación.

- Eficiencia: 101,85 %
- Pendiente: -3,24
- R2: 0,999
- T_M : 78,4°C

5.5.3.1.b Ensayo de especificidad

De manera similar a lo descrito en el punto 5.5.1.1.b se realizó un PCR tiempo real con los partidores específicos para el hexón del tipo B7 de AdvH y con los controles antes señalados. Las amplificaciones y curva de Tm se muestran en la **Figura 19**.

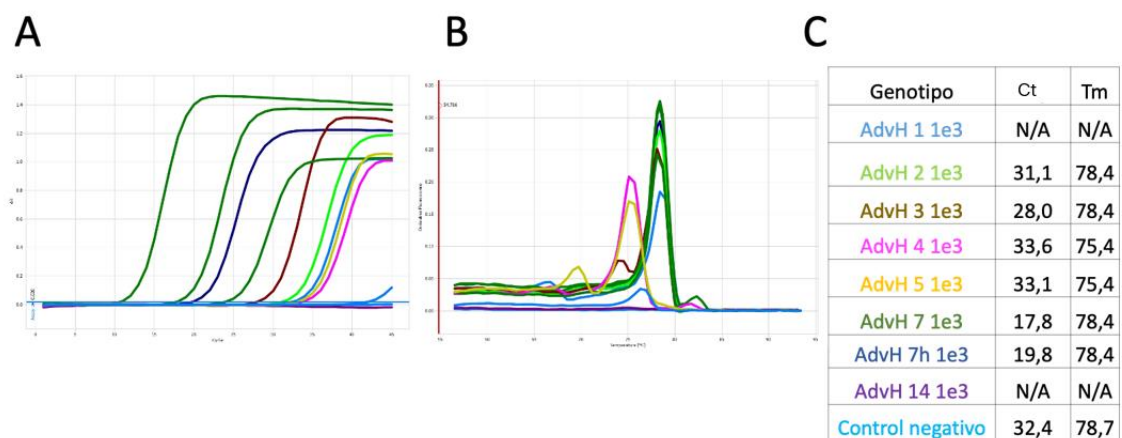


Figura 19: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo B7 de AdvH, gen hexón. A. Perfil de amplificación del ensayo. B. Perfil de Tm del ensayo. C. Resultados de Ct y Tm de cada tipo.

En la **Figura 19** se aprecia una curva positiva obtenida con el control de AdvH B7 (línea verde oscuro). Además, se obtuvo una curva similar con el control de B66 (B7h), esto se condice con la recombinación de este tipo que es hexón 7. Vemos también amplificación y curvas de Tm (**Figura 19C**) para los tipos AdvH E4, C5 y E14, de menor tamaño que el control positivo, corroborados con análisis en gel de agarosa y corresponden a dímeros de partidor, y producto de amplificado para los tipos C2 y B3 en un ciclo alto en comparación del control positivo, lo que podría definirse como contaminación del ambiente.

5.5.3.2 Detección del gen fibra de AdvH B7 por PCR tiempo real.

Los partidores utilizados para esta reacción se describen en la **Tabla 7** y los componentes finales en la **Tabla 8**. En la **Tabla 14** se describen las temperaturas y los tiempos utilizado para esta amplificación. En la **Figura 20** se muestra un gráfico representativo de la curva de fusión de la reacción.

Tabla 14: Programa de amplificación para la detección del gen fibra para el tipo B7 de AdvH, por PCR tiempo real.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Nº ciclos
Activación de la Enzima	95	180	1
Desnaturación Inicial	95	15	40
<i>Annealing</i>	60	60	
Curva de <i>Melting</i>	55°C - 95°C		

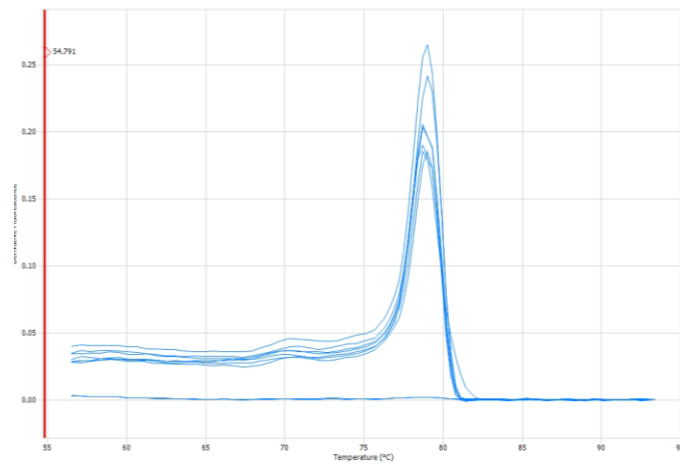


Figura 20: Gráfico representativo de la curva de *melting* de la detección del gen fibra para el tipo B7 de AdvH, por PCR en tiempo real. La Tm observada es de 79°C.

5.5.3.2.a Ensayo de eficiencia

Como se mencionó en el apartado 5.5.1.1.a, se realizó un ensayo de eficiencia para este gen, los resultados se muestran en la **Figura 21**.

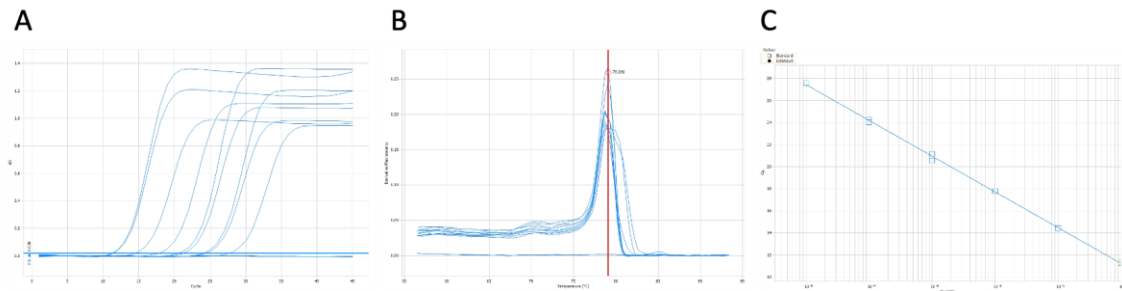


Figura 21: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el gen fibra de AdVH B7 A. A. Perfil de amplificación. B. Perfil de Tm del ensayo, Tm: 79°C. C. Gráfico de dilución versus Ct.

Los resultados obtenidos en este ensayo se indican a continuación.

- Eficiencia: 103,64%
- Pendiente: -3,28
- R2: 0,999
- TM: 79°C

5.5.3.2.b Ensayo de especificidad

De manera similar a lo descrito en el punto 5.5.1.1.b se realizó un PCR tiempo real con los partidores específicos para la fibra del tipo B7 de AdvH y con los controles antes señalados. Las amplificaciones y curva de Tm se muestran en la **Figura 22**.

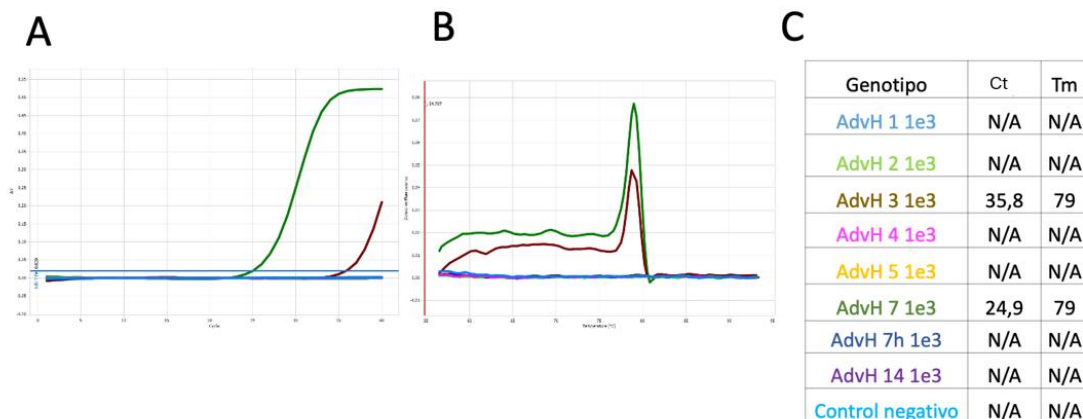


Figura 22: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo B7 de AdvH, gen fibra. A. Perfil de amplificación del ensayo. B. Perfil de Tm del ensayo. C. Resultados de Ct y Tm de cada tipo

En la **Figura 22** se aprecia una amplificación para el control positivo de AdvH B7 (línea verde oscura), además de una amplificación y curva de Tm para el tipo B3 (**Figura 22C**); sin embargo, el Ct obtenido es alto en comparación al control positivo, esto podría definirse como contaminación del ambiente.

5.5.4 Tipificación AdvH B66 por PCR tiempo real

Las muestras se analizaron mediante PCR tiempo real, utilizando partidores específicos para la región genómica que codifica para la glicoproteína de 20,5 kDa y proteína E3 de 6,6 kDa de AdvH tipo B66. Las condiciones estandarizadas se detallan a continuación.

5.5.4.1 Detección de la región genómica que codifica la glicoproteína de 20.5 kDa y proteína E3 de 6.6 kDa por PCR tiempo real

Los partidores utilizados para esta reacción se describen en la **Tabla 7** y los componentes finales en la **Tabla 8**. En la **Tabla 15** se describen las temperaturas y los tiempos utilizado para esta amplificación. En la **Figura 23** se muestra un gráfico representativo de la curva de fusión de la reacción.

Tabla 15: Programa de amplificación para la detección del gen fibra para el tipo B7 de AdvH, por PCR tiempo real.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Nº ciclos
Activación de la Enzima	95	180	1
Desnaturación Inicial	95	15	40
<i>Annealing</i>	52	60	
Curva de <i>Melting</i>	55°C - 95°C		

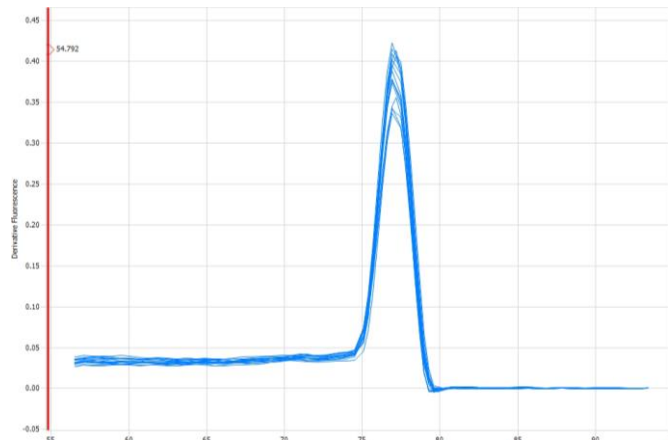


Figura 23: Gráfico representativo de la curva de *melting* de la detección del tipo B66 de AdvH, por PCR en tiempo real. La Tm observada es de 76,9°C.

5.5.4.1.a Ensayo de eficiencia.

Como se mencionó en el apartado 5.5.1.1.a, se realizó un ensayo de eficiencia para este gen, los resultados se muestran en la **Figura 24**.

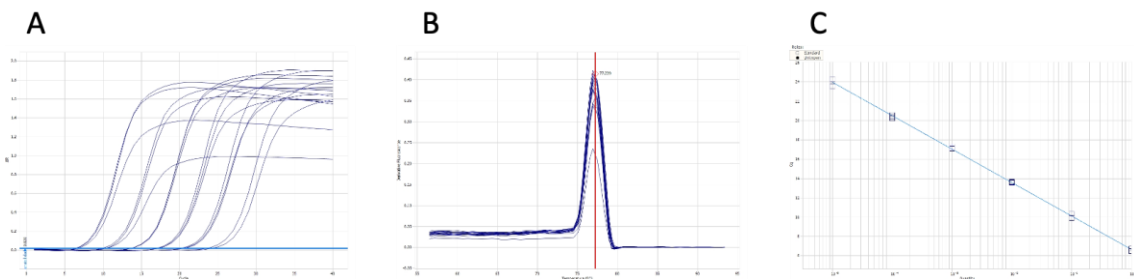


Figura 24: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la eficiencia de la detección para el tipo B66 de AdvH. A. Perfil de amplificación. B. Perfil de Tm del ensayo, Tm: 76,9°C. C. Gráfico de dilución versus Ct.

Los resultados obtenidos en este ensayo se indican a continuación.

- Eficiencia: 94,44%
- Pendiente: -3,43
- R2: 0,998
- TM: 76,9°C

5.5.4.1.b Ensayo de especificidad

De manera similar a lo descrito en el punto 5.5.1.1.b se realizó un PCR tiempo real con los partidores específicos para el sector genómico que codifica la glicoproteína de 20,5 kDa y proteína E3 de 6,6 kDa de AdvH B66 y con los controles antes señalados. Las amplificaciones y curva de Tm se muestran en la **Figura 25**.

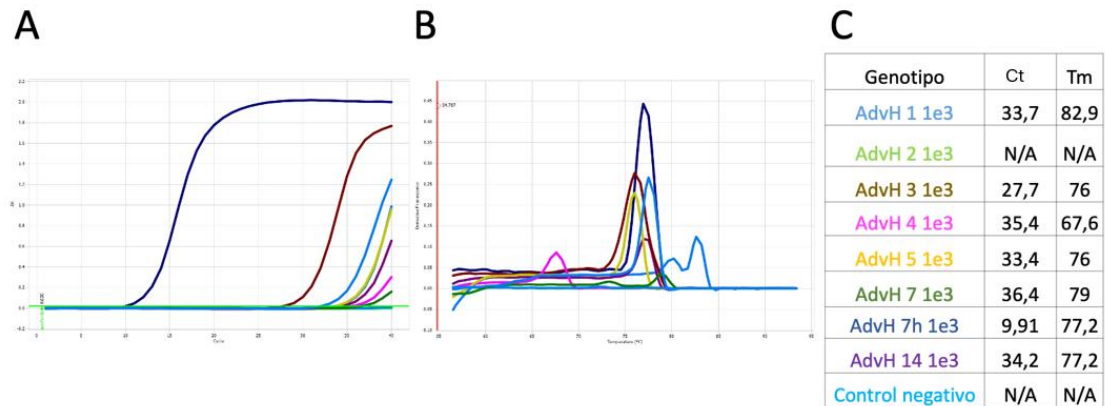


Figura 25: Ensayo de PCR tiempo real para determinar la especificidad de la detección para el tipo B66 de AdvH. A. Perfil de amplificación del ensayo. B. Perfil de Tm del ensayo. C. Resultados de Ct y Tm de cada tipo.

En la **Figura 25** se observa la curva positiva para la amplificación del control de AdvH B66 (B7h) (línea azul), además de una curva similar en la amplificación del control de B14; sin embargo, la Ct obtenida es alta, lo que podría definirse como contaminación del ambiente. Por otro lado, se tienen amplificaciones y curvas de Tm para los tipos de AdvH C1, B3, C5, B7. Las temperaturas de Tm de estas amplificaciones son distintas a la Tm del control positivo. El tamaño del producto amplificado es distinto al control positivo corroborado mediante electroforesis en geles de agarosa y serían dímeros de partidador o productos inespecíficos de mayor tamaño.

Por otra parte, se puede observar que no hay reacciones cruzadas que puedan afectar los resultados de las tipificaciones, los *peak* que no corresponden al control positivo se pueden asociar a productos inespecíficos o dímeros de partidador, si el producto es de mayor o menor tamaño que el esperado, respectivamente, por lo que los partidores son

lo suficientemente específicos en las condiciones de estandarización de las reacciones de PCR para el estudio que se llevó a cabo.

Se encuentran reacciones cruzadas esperadas en la amplificación del gen de la fibra del tipo B3 con el tipo B66 (7h), y en la amplificación del gen hexón del tipo B7 con B66 (7h) (**Figuras 16 y Figura 19** respectivamente). Esto se condice con la recombinación del tipo B66.

5.6 Análisis *in silico*

Se realizaron análisis *in silico*, utilizando la plataforma Blastn de la NCBI, se verificó el porcentaje de identidad de los partidores respectivos con las secuencias con mejor alineamiento entregado por el programa. Se verificó su complementariedad y la existencia de "gaps" según los índices entregados por el mismo programa. Posteriormente, se analizó el sector en el cual los partidores se alinean con la secuencia de B114 para determinar el tamaño del posible amplicón.

Además, se realizaron análisis en el programa Mega 11®, en dónde se alinearon las secuencias de referencia seleccionadas para analizar la cercanía filogenética de éstas, con el propósito de conocer si las secuencias de los tipos recombinantes eran cercanas filogenéticamente a las secuencias de los tipos no recombinantes (tipos B3, B7, B66, B114). Por otro lado, se compararon distintas secuencias depositadas en GenBank del mismo tipo (tipo B3), con el propósito de reconocer si las secuencias son cercanas filogenéticamente entre ellas, así concluir si éstas están clasificadas correctamente. Para estos análisis se utilizó la herramienta de alineamiento múltiple de secuencias con ClustalW. Por otro lado, los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei, incluidas en el mismo programa.

5.7 Análisis estadístico

Al ser un estudio con selección de muestra no probabilística por conveniencia, no se realizaron cálculos de tamaño muestral debido a la variabilidad en la pesquisa de pacientes entre los centros colaboradores. Las variables categóricas se describieron

como frecuencia y porcentajes. Las variables continuas se describieron con mediana y rangos intercuartiles (RIC). Se utilizó Chi-cuadrado (χ^2) para las variables categóricas y las pruebas U de Mann-Whitney y t de Student para el análisis de las variables continuas. Para la confección de la base de datos, se usó Hojas de cálculo de Google. Finalmente, para la aplicación de las pruebas estadísticas y confección de gráficos se utilizó el programa GraphPad Prism® 8.4 y la página de estadística online gratuita (www.graphpad.com/quickcalcs/).

6. RESULTADOS

6.1 Descripción de la población incluida

Se analizaron muestras de una población pediátrica con curso de enfermedad grave o mortal, menores a tres años. Del período 1998-2005, se analizaron 34 muestras previamente positivas para AdvH. Estas muestras provenían de una población con una evolución grave de la infección ya que eran muestras de autopsias de niño/as fallecido/as por neumonía. Del período 2022-2023, se analizaron 54 muestras positivas para AdvH genérico provenientes de una población pediátrica con una enfermedad respiratoria grave. Esta selección se realizó posterior de la revisión de las fichas clínicas (apoyo Dr. Gustavo Saint-Pierre) según los criterios señalados en la metodología.

Tabla 16: Caracterización demográfica de la población pediátrica con diagnóstico positivo para AdvH genérico.

	1998-2005 (n=34)	2022-2023 (n=54)
Edad (meses) (n,%)		
Mediana grupo [RIC]	3 [2-6]	12 [12-24]
1-6	25 (73,5%)	7 (13%)
7-12	5 (14,7%)	23 (42,3%)
13-18	2 (5,88%)	1 (1,85%)
24-36	0	23 (42,3%)
Sin datos	2 (5,88%)	0
Diagnóstico Clínico al ingreso de la hospitalización		
Bronquitis	0	23
Neumonía	29	39
Fiebre no especificada	0	8
Amigdalitis	0	10
Conjuntivitis	0	9
Muerte intradomiciliaria	4	0
Sepsis	1	0
Entrada a UPC (n,%)	Sin datos	19 (35,2%)

Tabla 17: Datos clínicos de los pacientes del período 2022-2023.

n=54	Min	Máx	Promedio	Mediana
Frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto)	24	72	43,8	41,0
Saturación oxígeno (% saturación)	88%	100%	95%	95%
Tiempo oxigenoterapia (días)	0	65	8,5	5,0
Tiempo de hospitalización (días)	0	158	15,3	8,0

Tabla 18: Categorización inicial del grupo pediátrico incluido en el período 2022-2023.

Categorización	n (%)
C1	3 (5,6)
C2	46 (85,1)
C3	3 (5,6)
C4	2 (3,7)
C5	0

Se observa que demográficamente hay una diferencia en la distribución de las edades, ya que en el período 1998-2005 la mayoría de los pacientes tiene una edad menor a 6 meses al momento del estudio, mientras que en el período 2022-2023 la mayoría de los pacientes tiene una edad mayor a los 24 meses al momento del estudio, en un análisis de los datos mediante el test de Fisher, se obtiene un valor de $p < 0.0001$, por lo que hay una diferencia significativa en la distribución de las edades entre períodos.

Por otro lado, en el diagnóstico clínico hay mayor proporción de neumonía en el periodo 2022-2023 que en 1998-2005, en un análisis de los datos mediante el test de Fisher, se obtiene un valor de $p < 0.0001$, por lo que hay una diferencia significativa en la distribución de los diagnósticos clínicos entre períodos.

6.2 Tipificación viral de AdvH de las muestras de pacientes por PCR tiempo real

Se realizó la detección de los tipos C2, B3 y B7 de AdvH mediante la amplificación de los sectores de los genes fibra y hexón de AdvH y B66 mediante la amplificación del sector génico que codifica la glicoproteína de 20,5 kDa y proteína E3 de 6,6 kDa de AdvH en las 88 muestras respiratorias de ambos períodos. En las siguientes figuras, se muestran los resultados obtenidos, considerando como positivas aquellas muestras que tenían una T_m con un valor de $\pm 0.6^\circ\text{C}$ respecto del control positivo y un C_t similar entre los dos genes del mismo tipo. Este criterio permite apoyar la detección específica de ese tipo viral. Las muestras reportadas como “sin clasificar”, son aquellas que para los PCR

tiempo real no dieron un resultado positivo para ninguno de los tipos estudiados. Cabe destacar que todas las muestras tuvieron una amplificación positiva cuando para el estudio del sector del gen celular ADA, indicando que había ADN y no había inhibidores de la reacción de PCR.

6.2.1 Tipificación para AdvH C2

Se detectaron 3 muestras (8,8%) del período 1998-2005 y 17 muestras (32,1%) del período 2022-2023 positivas para AdvH C2. Al comparar ambos períodos, el número de muestra positivas es estadísticamente diferente ($p=0,0005$; test de Fisher). Estos datos se muestran en la **Figura 26**.

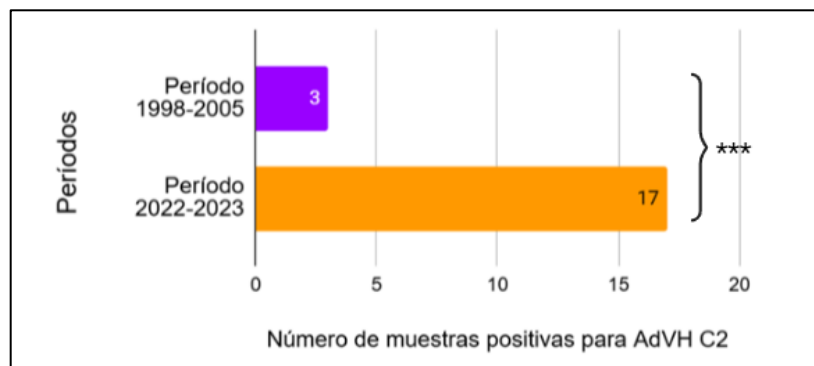


Figura 26: Número de muestras positivas para AdvH C2 detectadas por períodos.

6.2.2 Tipificación para AdvH B3

Se detectaron 11 muestras (32,4%) del período 1998-2005 y 19 muestras (35,9%) del período 2022-2023 positivas para AdvH B3. Las diferencias de detección entre ambos períodos no son estadísticamente significativas ($p=0,1409$; test de Fisher). Los datos se muestran en la **Figura 27**.

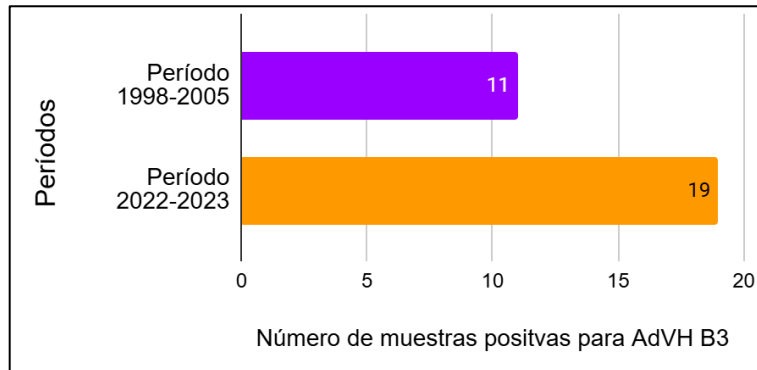


Figura 27: Número de muestras positivas para AdVH B3 detectadas por períodos

6.2.3 Tipificación para AdVH B7

Se detectaron 5 muestras (14,7%) del período 1998-2005 y 1 muestra (1,9%) para el período 2022-2023 positivas para AdVH B7. Las diferencias de detección entre ambos períodos no son estadísticamente significativas ($p=0,0960$; test de Fisher). Los datos se muestran en la **Figura 28**.

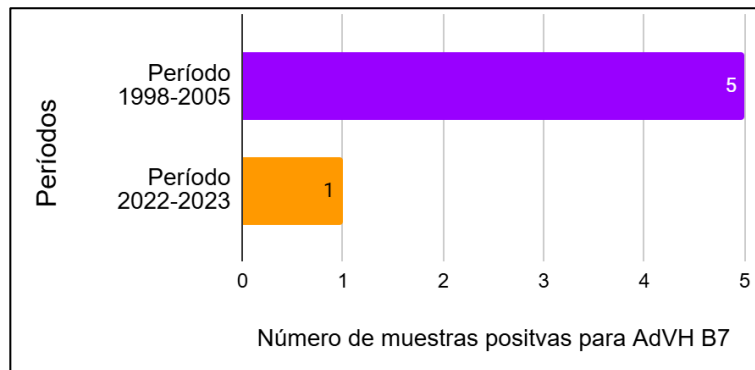


Figura 28: Número de muestras positivas para AdVH B7 detectadas por períodos.

6.2.4 Tipificación para AdVH B66

Se detectaron 31 muestras (91,2%) del período 1998-2005 y 19 muestras (35,9%) para el período 2022-2023 positivas para AdVH B66. Al comparar ambos períodos, el número

de muestra positivas es estadísticamente diferente ($p < 0,0001$; test de Fisher). Los datos se muestran en la **Figura 29**.

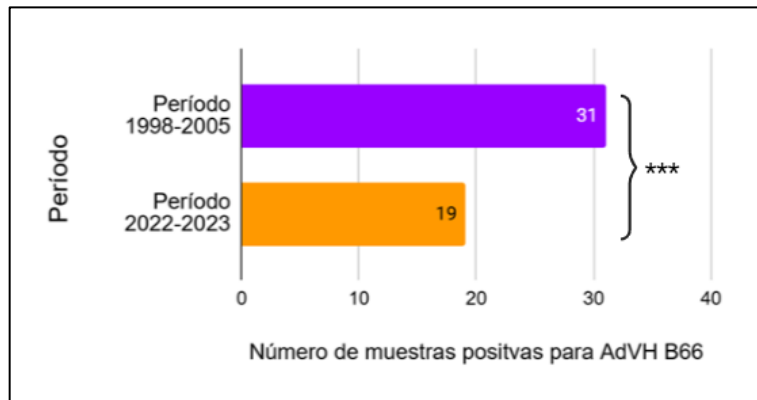


Figura 29: Número de muestras positivas para AdVH B66 detectadas por períodos

6.2.5 Muestras no AdVH C2, AdVH B3, AdVH B7 ni AdVH B66

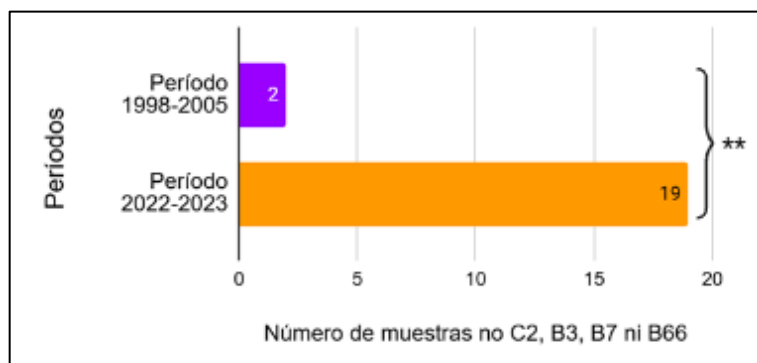


Figura 30: Tipificaciones para muestras no AdVH C2, B3, B7 ni B66 por períodos.

Se muestra en la **Figura 30**, la cantidad de muestras positivas para AdVH genérico, que no cumplen con las condiciones para ser categorizadas como C2, B3, B7 ni B66, ya mencionadas, se detectaron 2 muestras (5,9%) para el período 1998-2005 y 19 muestras (35,9%) para el período 2022-2023. Al comparar ambos períodos, el número de muestra positivas es estadísticamente diferente ($p = 0,0017$; test de Fisher).

En la **Figura 31** se muestra un resumen de las tipificaciones por tipo y período de todas las muestras estudiadas. La sumatoria de casos en este gráfico no es 100%, debido a la existencia de coinfecciones.

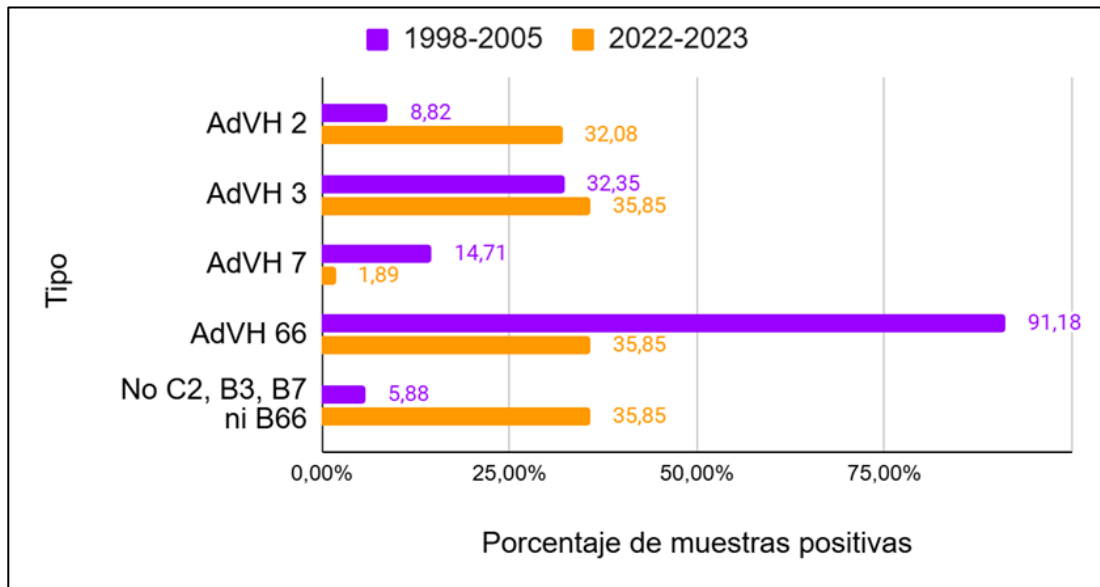


Figura 31: Gráfico del resumen de la cantidad de tipificaciones por tipo viral y por períodos.

6.2.6 Análisis de coinfecciones.

A partir de los datos de tipificación mencionados, se realizó un análisis de las coinfecciones entre tipos encontrados por período, lo que se muestra en la **Tabla 19**. Estas coinfecciones son entre distintos tipos de AdVH en una misma muestra de paciente. Principalmente se encuentran coinfecciones entre B3 y B66, en ambos períodos, y coinfecciones entre C2 y B66. Al comparar ambos períodos, el número de muestra con coinfección es estadísticamente diferente ($p=0,0049$; test de Fisher).

Tabla 19: Número de muestras tipificadas con coinfección entre AdvH analizados por períodos.

Coinfecciones		Con coinfección
Período 1998-2005	AdvH 3 - AdvH 66	2
	AdvH 2 - AdvH 66	3
	AdvH 3 - AdvH 7	1
	Total en el período	6
	% en el período	17,6%
Período 2022-2023	AdvH 3 – AdvH 66	19
	Total en el período	19
	% en el período	35,2%

6.3 Análisis *in silico*

Durante el desarrollo del trabajo de tesis, se describió en literatura un nuevo tipo de AdvH, denominado B114, recombinante entre B3 y B7, el cuál comparte hexón y fibra con el tipo B3 y pentón tipo con el B7. Considerando que B66 también comparte el hexón con B7 y la fibra con B3, en aquellas muestras que se detectó positivo para B3 y positivo para B66, es posible considerar que sean B114 más que coinfecciones. Por esta razón se decidió hacer un análisis *in silico* para determinar si con los partidores utilizados en nuestro estudio era posible discriminar los tipos B114 y B3.

En el análisis en Blastn con los partidores de B66, se obtuvo complementariedad de éstos con la secuencia del tipo B114. Las alineaciones obtenidas se muestran en la **Tabla 20** y **Tabla 21**, de los partidores *forward* y *reverse*, respectivamente.

Tabla 20: Resultado del análisis realizado con Blastn del partidador forward de B66 contra la base de datos de la NCBI.

Human adenovirus B, Type 114 (P114/H3/F3) isolate 43593/Han/1/2023, complete genome ID: OR853835.1
Query 1 ATCATTACTGCCGTGGTA 18
Sbjct 29642 ATCATTACTGCCGTGGTA 29659

Tabla 21: Resultado del análisis realizado con Blastn del partidador reverse de B66 contra la base de datos de la NCBI.

Human adenovirus B, Type 114 (P114/H3/F3) isolate 43593/Han/1/2023, complete genome ID: OR853835.1
Query 6 CAATGTTCATAGAAATTCT 24
Sbjct 29868 CAATGTTCATAGAAATTCT 29886

Luego se comparó la secuencia depositada en GenBank para el tipo B114 con los partidores diseñados para B66, teniendo como resultado una complementariedad de éstos. En la **Figura 32** se destaca las posiciones de los partidores utilizados para B66 en el sector genómico donde hibridan en la secuencia de referencia de B114

```

29581 aattggc atc attactgccg tggtagtgggg attaatgatt atatTTTTgt gcataacgta
29641 ctacgcctgc tgctatagaa aacatgaaca aaaaggatgat gcattactaa atTTTgatgt
29701 ttaatTTTT tatagaatta ttatattgtc tcaatcaaat accactaaca ctatcaatgt
29761 gcagactact ttaaactcatg acatgaaaa ccacactacc tcctatgcat acc caatgTT
29821 catagaaatt ctaaagacg tcccatctat tcttctatga ttagtgcgtcc ccatatggct
29881 ctgaatgaaa tctaagatct tTTTTTTTc tcttacagta tggTgaacat caatcatgat

```

Figura 32: Alineación de los partidores de AdvH B66 en el genoma del tipo B114.

Debido a que los partidores para el tipo B66 hibridan en el mismo sector que en su genoma, sector genómico que codifica para la glicoproteína de 20,5 kDa y E3 de 6,6 kDa, obteniendo un producto de PCR del mismo tamaño, no se podrían diferenciar B66

de B114, con los partidores estudiados.

Por otro lado, se analizó la cercanía filogenética de los genomas virales estudiados, realizando análisis filogenéticos en el *software* Mega 11, con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank. Se comparó la secuencia de referencia de genoma completo de los tipos B3, B7, B66 y B114. Los resultados se presentan en la **Figura 33** y **Figura 34**.

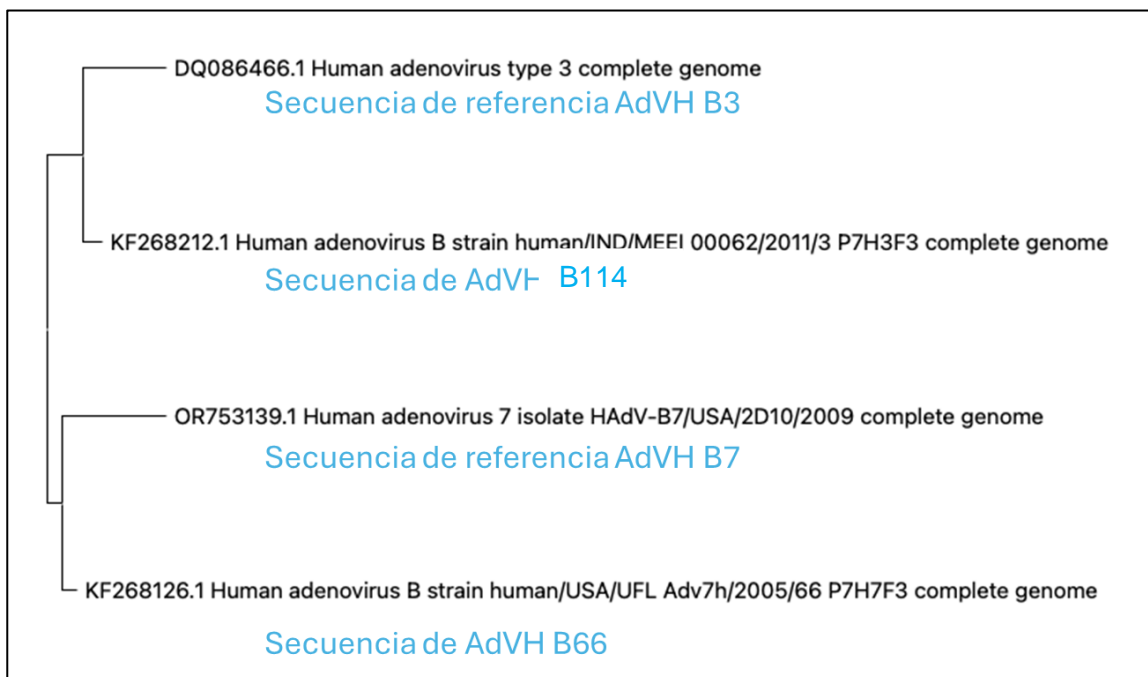


Figura 33: Árbol filogenético de secuencias de AdVH B3, B7, B66 y B114, analizadas en Mega 11

	1	2	3	4
1. DQ086466.1 Human adenovirus type 3 complete genome				
2. KF268212.1 Human adenovirus B strain human/IND/MEEI 00062/2011/3 P7H3F3 complete genome	0.0151			
3. OR753139.1 Human adenovirus 7 isolate HAdV-B7/USA/2D10/2009 complete genome	0.0346	0.0255		
4. KF268126.1 Human adenovirus B strain human/USA/UFL Adv7h/2005/66 P7H7F3 complete genome	0.0217	0.0123	0.0173	

Figura 34: Distancia por pares de secuencias de AdVH B3, B7, B66 y B114, analizadas en Mega 11.

En la **Figura 33**, se muestra que la secuencia de referencia del tipo B3 y la del tipo B114 son cercanas filogenéticamente, mientras que, la secuencia de referencia del tipo B7 y

la del tipo B66 son cercanas filogenéticamente, en base al número indicado en la **Figura 34**. Este valor indica la distancia genética entre los tipos, mientras mayor es el número, mayor es la distancia genética entre los tipos (Contreras, R. y cols, 2021). En la **Figura 34** se observan dos grupos en los que, la distancia entre los tipos de AdvH B3 y B114 es menor que la distancia entre los tipos B7 y B66,

Lo anterior es esperable, ya que el tipo B114 comparte dos genes (hexón y fibra) del tipo B3, y el tipo B66 comparte dos genes (penton y hexón) del tipo B7, por lo que es lógica su cercanía filogenética.

Con los resultados anteriores y considerando que hay varias secuencias depositadas como B3 en GenBank, se realizó un análisis filogenético proyectando a futuro la posible discriminación entre el tipo B3 y B114. En este análisis se incluyeron la secuencia de referencia de B3 y otras secuencias depositadas en GenBank por distintos autores y fechas. Los resultados se presentan en la **Figura 35** y **Figura 36**.

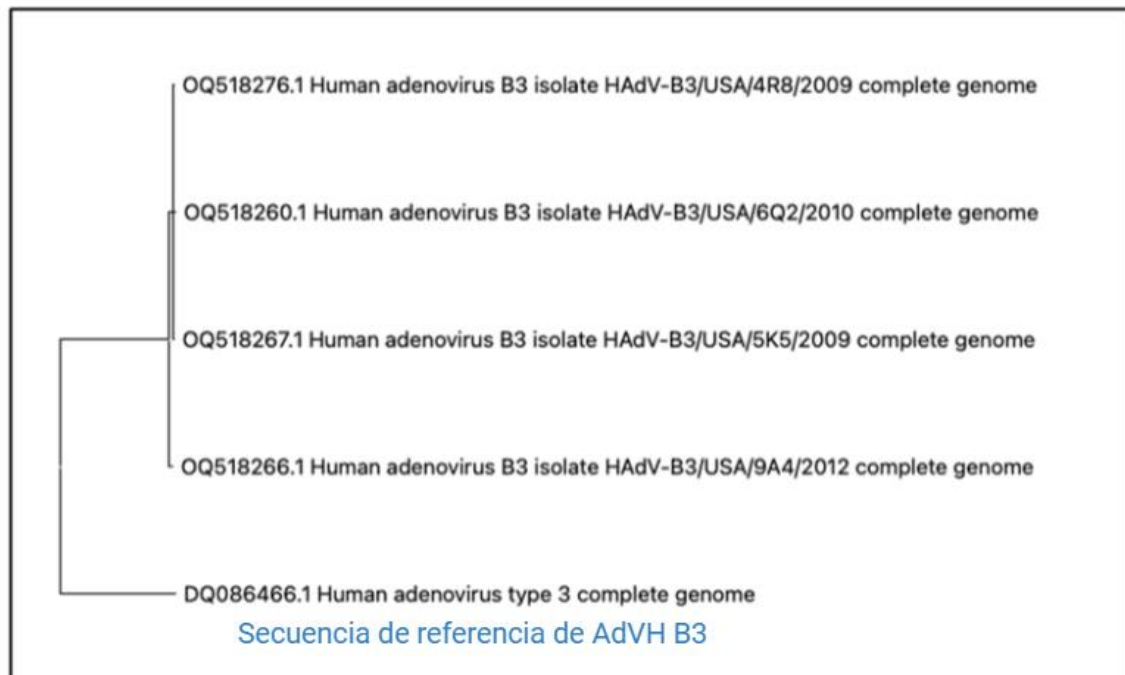


Figura 35: Árbol filogenético de secuencias de AdvH B3, analizadas en Mega 11.

	1	2	3	4	5
1. OQ518276.1 Human adenovirus B3 isolate HAdV-B3/USA/4R8/2009 complete genome					
2. OQ518267.1 Human adenovirus B3 isolate HAdV-B3/USA/5K5/2009 complete genome	0.000227				
3. OQ518266.1 Human adenovirus B3 isolate HAdV-B3/USA/9A4/2012 complete genome	0.000710	0.000710			
4. OQ518260.1 Human adenovirus B3 isolate HAdV-B3/USA/6Q2/2010 complete genome	0.000255	0.000312	0.000795		
5. DQ086466.1 Human adenovirus type 3 complete genome	0.014931	0.015218	0.014873	0.015019	

Figura 36: Distancia por pares de secuencias de AdvH B3, analizadas en Mega 11

Se aprecia en la **Figura 35**, que hay una cercanía filogenética entre las secuencias depositadas de distintos autores, pero la secuencia de referencia de GenBank para el tipo B3 se sitúa en un grupo distinto a éstas. Y en la **Figura 36**, los datos mostrados se condicen con lo anterior, en dónde hay una mayor distancia entre la secuencia de referencia y las demás secuencias estudiadas, que entre las últimas.

Se compararon las mismas secuencias del genoma completo del tipo B3 señaladas en la **Figura 35** con la secuencia del tipo B114. El análisis filogenético se presenta en las **Figuras 37 y 38**.



Figura 37: Árbol filogenético de secuencias de AdvH B3 y AdvH B114, analizadas en Mega 11.

	1	2	3	4	5
1. OQ518266.1 Human adenovirus B3 isolate HAdV-B3/USA/9A4/2012 complete genome					
2. OQ518267.1 Human adenovirus B3 isolate HAdV-B3/USA/5K5/2009 complete genome	0.000710				
3. KF268212.1 Human adenovirus B strain human/IND/MEEI 00062/2011/3 P7H3F3 complete genome	8.481916	8.503837			
4. OQ518276.1 Human adenovirus B3 isolate HAdV-B3/USA/4R8/2009 complete genome	0.000710	0.000227	8.493482		
5. OQ518260.1 Human adenovirus B3 isolate HAdV-B3/USA/6Q2/2010 complete genome	0.000796	0.000312	8.504031	0.000256	

Figura 38: Distancia por pares de secuencias de AdVH B3 y AdVH B114, analizadas en Mega 11

De este análisis se puede inferir que las secuencias de AdVH B3 de distintos autores, depositadas en GenBank son filogenéticamente cercanas entre sí, pero no con la secuencia del tipo B114.

7. DISCUSIÓN

7.1 Visión general

Los adenovirus humanos son uno de los principales agentes etiológicos detectados en infecciones respiratorias principalmente en población pediátrica. Las infecciones por este agente viral pueden llegar a ser graves o mortales (Avendaño, LF., 2011), especialmente en poblaciones más susceptible como infantes, inmunosuprimidos y adultos mayores.

Actualmente no se realiza la identificación de la especie de AdvH en recintos de salud, sólo se identifica la presencia de AdvH en la muestra respiratoria tomada al(la) paciente. Hay estudios que describen que hay tipos específicos de AdvH que generan un cuadro clínico con mayor gravedad, lo cual no se ha confirmado en nuestro país. El año 2023, el ISP informó de la circulación de los tipos de AdvH en la vigilancia epidemiológica, aunque no se tiene los datos de todos los centros hospitalarios. Esto aportaría información epidemiológica de los tipos circulantes en un momento determinado.

Este estudio tuvo como objetivo analizar la frecuencia de detección de los tipos de AdvH en población que cursa enfermedad grave por este agente viral, considerando que en la bibliografía se describe un cambio en la circulación de los AdvH en el tiempo, lo que podría estar relacionado al curso grave de la enfermedad en población infantil.

7.2 Circulación de los distintos tipos virales

Según los resultados obtenidos, la hipótesis planteada es parcialmente verdadera, ya que se observó, de manera significativa, un incremento en la frecuencia de detección del tipo C2 y una disminución en la frecuencia de detección del tipo B66 en el período 2022-2023, en comparación al período 1998-2005, en población pediátrica con curso de enfermedad grave o mortal por AdvH, en Santiago de Chile. Sin embargo, a diferencia de la lo propuesto en la hipótesis, no se encontraron cambios significativos en la frecuencia de detección de los tipos B3 y B7 entre ambos períodos. Estos cambios en la detección se encuentran en concordancia con la literatura, en donde se reporta que hay diferencias en la distribución de los AdvH en el tiempo (Moriyama, M. y cols, 2020).

Al considerar la asociación de gravedad entre los tipos virales se debe tener en cuenta que la población pediátrica estudiada en el período 2022-2023 no falleció por la enfermedad causada por la infección por AdvH, esto sugiere que la gravedad de los tipos encontrados es variable, especialmente el tipo B66. Aunque, según estudios anteriores (Palominos, MA. y cols, 2000), este tipo viral se asociaba a mayor daño pulmonar y una hospitalización más larga. En el período más reciente analizado en nuestro estudio, se detectó en menor proporción, aunque, como se discute más adelante, no se puede asegurar completamente su tipificación, debido a la descripción del tipo B114 y con nuestra metodología de identificación. Además, hay que considerar que el contexto social y de atención de salud entre los períodos son distintos y pueden generar diferencias en entre los grupos y su gravedad.

La prevalencia del tipo C2 aumenta en el período 2022-2023 en comparación al período 1998-2005. Según la literatura los tipos de la familia C se asocian a un curso de la enfermedad más grave; sin embargo, no se reporta una alta mortalidad por este tipo (Wu, X. y cols, 2014). El tipo B3, aunque tuvo una diferencia en el porcentaje de identificación, aumentó solo un 3,5% de aumento entre el período 1998-2005 y 2022-2023, sin ser significativo. Por último, el tipo B7 sólo se encuentra en una muestra en el período 2022-2023, en comparación a las 5 muestras en el período anterior, esto sugiere una circulación baja de este tipo viral, sin cambios significativos.

Aparte de la circulación de los distintos tipos virales, se determinó una disminución de las coinfecciones entre tipos de AdvH estudiados en el período 2022-2023 en comparación al período 1998-2005, este cambio es significativo entre los períodos. Las coinfecciones encontradas en el período 2022-2023, puede ser un error de tipificación debido a la posibilidad de detectar un tipo no registrado anteriormente en la circulación local de AdvH como es el tipo B114, lo cual debe ser verificado con más análisis, como PCR tiempo real utilizando partidores específicos para este tipo, lo cual será una tarea compleja teniendo en cuenta la clasificación en GenBank de las secuencias de referencias, que se discutirá más adelante. Por otro lado, se puede realizar una secuenciación de las muestras de genoma completo para identificarlas de mejor manera y saber a qué tipo corresponden.

Por otro lado, el aumento de muestras de pacientes que no fueron tipificadas en los tipos analizados fue mayor en el período 2022-2023 estudiado, lo que sugiere una distribución más variada de tipos de AdVH circulando actualmente y que no fueron incorporados en este estudio. La búsqueda de otros tipos podría incluirse en el seguimiento epidemiológico de enfermedades respiratorias por AdVH en población pediátrica, sobre todo en cursos graves de ella. Al tener un conocimiento más acabado de la gravedad relacionada con cada tipo en específico se puede llevar un manejo diferencial de los pacientes dependiendo del tipo viral que sea detectado en cada paciente, para evitar que el paciente con mayor riesgo de cursar una enfermedad grave tenga un manejo adecuado y posiblemente se disminuyan los tiempos de hospitalización y los recursos económicos asociados.

Se tiene en otros estudios realizados en el mundo (Liu, C. y cols, 2007), que la circulación de AdVH es variable en el tiempo, lo cual impacta en la clínica de los casos en un momento determinado, ya que los distintos tipos tiene asociado una complejidad del cuadro distinta (ISP, 2023) (Lii, JPL. y cols, 2016) (Marccone, D.N. y cols, 2015).

Se ha reportado una disminución de la detección de tipos de AdVH pertenecientes a la especie A a la especie B, en algunos países en distintos momentos, predominando los tipos de la especie C en enfermedades respiratorias (Wu, X. y cols, 2023). De esta manera se ha visto que los casos en los cuales se encuentra un tipo de la especie C tienen una mayor complejidad clínica en los cuales se encuentran infantes que entran con mayor frecuencia a las UPC y la necesidad de oxigenoterapia (Wu, X. y cols, 2014). Esto se relaciona con los resultados obtenidos en el estudio, en donde se encuentra que alrededor de un 30% de los pacientes estudiados dieron como resultado estar infectados con el tipo C2 en el período 2022-2023. Los resultados obtenidos muestran una disminución de la frecuencia de detección de la especie B en el período 2022-2023, en relación al período 1998-2005, observándose que en el primero hay una proporción mayor de la especie C, esto puede ser debido a que la población del período 1998-2005 son todos pacientes fallecidos, y en la literatura se asocia principalmente la especie B con una mortalidad mayor en infantes (Marccone, D. N. y cols, 2015), sin embargo, aunque se reporta gravedad asociada a la especie C, no se asocia una mayor mortalidad a esta especie (Wu, X. y cols, 2014).

Según todo lo expuesto en este trabajo, sería de utilidad la tipificación de AdvH en las urgencias de los hospitales pediátricos, tanto para conocer la epidemiología del país como la posible detección de tipos de AdvH asociados a cuadros más graves en un momento determinado. Esto permitiría generar alertas a todos los servicios de urgencia para un monitoreo más específico de ese o esa paciente

7.3 Tipos de muestras y metodología

En este estudio se utilizaron distintos tipos de muestras entre períodos y distintas técnicas para la extracción de ácidos nucleicos. Considerando estas diferencias que podían interferir en los resultados, se realizó la extracción de algunas muestras de autopsia mediante el mismo método que las muestras del grupo pediátrico del período 2022-2023 y posterior detección de un tipo viral. Este ensayo dio como resultado que la diferencia del tipo de muestra (hisopado para los pacientes del período 2022-2023, tejido de pulmón para los pacientes del período 1998-2005) no tiene mayor diferencia en los resultados de tipificación por PCR en tiempo real.

7.4 Consideraciones sobre el análisis de los tipos B3, B66 con B114 de AdvH

Con la reciente descripción del tipo B114 (código de acceso a Genbank: OR853835.1 cuya secuencia fue publicada en diciembre 2023) el cual es un recombinante de los tipos B3 y B7, siendo hexón tipo B3, fibra tipo B3 y pentón tipo B7, se reanalizaron las secuencias de los partidores utilizados en la detección de B3 y B66 AdvH. En el análisis de los partidores utilizados para tipificar B66 se encontró que hibridan parcialmente con B114. Según el análisis mediante Blastn (**Figura 33**), el producto de PCR obtenido para ambos tipos sería del mismo tamaño, por lo que no se podría discriminar entre uno y otro. Debido a esto, no se descarta que muestras consideradas positivas para B66 sean B114. Es posible que se esté identificando el tipo B114 y se debe corroborar con más análisis, por ejemplo, secuenciación del genoma completo para identificar el tipo viral que existe en la muestra. También se podrían retipificar incorporando la zona del pentón u otra zona que permita mejor discriminación incluyendo hexón y fibra.

Por otra parte, se detectaron 19 muestras del período 2022-2023 positivas tanto como

para B3 (considerando fibra B3 y hexón B3), como para B66 (considerando la región genómica que codifica la glicoproteína y el sector de E3). Sin embargo, estas muestras, si se analiza fibra y hexón, no tienen el patrón distintivo de B66, el cual debe ser hexón B7 y fibra B3, pues son positivas para hexón B3, fibra B3 y positivas para B66. Esto sugiere que no se está detectando ninguno de los tipos mencionados anteriormente (B3 o B66), sino que el nuevo tipo viral B114 publicado durante el desarrollo de esta tesis. En este caso, al ser dos tipos que comparten hexón y fibra (B66 y B114), su discriminación es difícil, sumando a esto las escasas diferencias que existen entre los pentones de los tipos, hace que la diferenciación entre ellos se haga más compleja utilizando técnicas como PCR dirigidas solo a un sector génico. En el caso de B66 se utilizó un sector comprendido entre la glicoproteína y el sector de E3, el cual lo diferencia de B3 y B7, pero con el nuevo antecedente de B114 y los resultados del análisis con Blastn (**Figura 32**) no se puede discriminar; sin embargo, al tener combinación de hexón-fibra, relacionados con el patrón encontrado en uno u otro tipo (hexón 7 - fibra 3 para B66 y hexón 3- fibra 3 para B114) es posible hacer una diferenciación entre ellos. Este análisis empírico sugiere que, en las 19 muestras encontradas en este estudio con coinfección entre B3 y B66, según el patrón obtenido pertenecen al tipo B114.

En los análisis *in silico* realizados se determinó que la filogenia de las secuencias estudiadas del tipo B3, en donde se analizaron los genomas completos de las muestras depositadas en la base de datos, se distinguen dos grupos (**Figura 36** y **Figura 37**). Estas diferencias o distanciamientos filogenéticos tienen relevancia en la utilización de una u otra secuencia para el diseño de partidores considerando que la mayoría se restringe a la zona del hexón generando identificaciones erróneas de muestras basados en esta única zona. Además, las clasificaciones basadas en técnicas inmunológicas pueden generar discrepancias con la identificación basadas en técnicas moleculares como se observa en el árbol filogenético entre la secuencia de referencia de B3 y otras secuencias más actuales reportadas (**Figura 35**)

Esto hace más difícil la identificación de los distintos tipos, ya que los partidores diseñados para este propósito se basan en las secuencias de referencia depositadas en GenBank, y si éstas no son identificadas de manera correcta, los partidores utilizados no tendrán la especificidad esperada.

7.5 Implicancias del cambio de circulación de AdVH

La infección por AdVH genera anticuerpos tipo específicos, al circular un tipo en específico, la población en ese momento crea anticuerpos para ese tipo, al cambiar la circulación a un tipo distinto, se generan anticuerpos nuevos para el nuevo tipo circulante; sin embargo, este cambio en el tiempo causa que la población quede susceptible y el curso de la enfermedad ocasionada por el tipo antiguo en esta población podría ser más grave al no tener defensas inmunológicas. Esta hipótesis sería una posible explicación del cambio en la prevalencia de un tipo u otro en la población que cursa una enfermedad grave por AdVH.

Estos cambios en la circulación, sin que desaparezcan completamente los tipos virales, pueden generar también más posibilidades de recombinantes y así aparición de tipos virales nuevos que impacten en la evolución de la enfermedad generada por la infección con ese nuevo tipo viral.

Esto apoya la necesidad de establecer la epidemiología de AdVH basadas en los tipos de AdVH circulantes que alerten de estos cambios y posibilidad de aparición de recombinantes.

7.6 Limitaciones del estudio

Este estudio se realizó con poblaciones de pacientes que son distintas en diferentes aspectos, como la edad, diagnóstico de ingreso al servicio hospitalario, evolución de la enfermedad. En el período 1998-2005 solo se tiene muestra de población fallecida, por lo cual no se puede extrapolar que los tipos de AdVH detectados en esta población fueran los mismos que se detectaban frecuentemente en la población con infección respiratoria por AdVH pero que no se hospitalizó o que se hospitalizó, pero no falleció. Por esto las comparaciones que se pueden hacer sobre circulación de AdVH entre estos grupos es limitada. Aún así, es posible encontrar una diferencia en la frecuencia de detección de los tipos virales estudiados, no podemos hablar de circulación debido a que es una población con un número de pacientes limitado, y no representaría una

epidemiología de estos tipos virales en población pediátrica en general, ya que no se tiene de datos de pacientes con un curso de enfermedad leve o moderada.

Por otro lado, se analizaron sólo 4 tipos de AdVH de los 116 que están tipificados a la fecha, esto debido a un análisis en la literatura que respalda la selección, aunque es una limitación para el estudio el estudio dirigido a sólo unos pocos tipos de AdVH; sin embargo, en la mayor parte de las muestras incluidas (76%) se logró la detección de uno de los tipos virales estudiados.

8. CONCLUSIONES

La frecuencia de detección de los tipos estudiados de AdvH fue distinta entre los períodos 1998-2005 y 2022-2023 en población pediátrica grave con enfermedad respiratoria por AdvH con un aumento de la detección del tipo AdvH-C2 y disminución de AdvH-B66.

La frecuencia de detección de los tipos estudiados de AdvH-B3 y AdvH-B7 no presentan cambios significativos entre los períodos estudiados en población grave con enfermedad respiratoria por AdvH

El porcentaje de coinfecciones entre los tipos virales estudiados disminuyó significativamente entre los períodos.

La metodología de detección utilizada no permite discriminar *in silico* si las coinfecciones B3 y B66 corresponderían al tipo B114 recientemente descrito.

La secuencia de genoma de referencia de AdvH-B3 se distancia filogenéticamente de otras secuencias de AdvH-B3 depositadas en Genbank.

9. REFERENCIAS

- Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Graciela, M., Munive, R., & Olvera, B. P. (2014). PCR en tiempo real. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. México DF: SEMARNAT, INECC, UAM-I, 175-201.
- Avendaño LF. (2011) Infecciones virales respiratorias, Capítulo 12. de Aguirre Cox. En: Virología Clínica 1era edición. p. 117-36. Mediterráneo.
- Barrios, J. C., Russomando, G., y Espínola, E. E. (2016). Diversidad de adenovirus detectados en niños menores de 5 años hospitalizados por infección respiratoria aguda baja en Paraguay, 2010-2013. *Pediatría (Asunción)*, 43(2), 115-122.
- Bernaola, G., y Luque, W. (2001). Fisiopatología de las Infecciones por Adenovirus. *Paediatrica*, 4(2), 41-47.
- Cázares-Ramírez, E., y Acosta-Bastidas, M. A. (2014). Initial assessment at the pediatric emergency room. *Acta Pediátrica de México*, 35(1), 82-87.
- Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12:1–8. doi: 10.1016/0092-8674(77)90180-5
- De Jong, J. C., Wermenbol, A. G., Verweij-Uijterwaal, M. W., Slaterus, K. W., Wertheim-Van Dillen, P., Van Doornum, G. J, y Hierholzer, J. C. (1999). Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *Journal of clinical microbiology*, 37(12), 3940-3945.
- Dehghan, S., Liu, E. B., Seto, J., Torres, S. F., Hudson, N. R., Kajon, A. E., y Seto, D. (2012). Five genome sequences of subspecies B1 human adenoviruses associated with acute respiratory disease. *Journal of Virology*, 86(1), 635-636

Díaz, R. C., González, M. G., Cruces, F. A., Arias, S. G., & Saavedra, V. P. (2021). Analysis of genetic diversity and differentiation of *Prosopis chilensis* populations between Chacabuco and San Felipe de Aconcagua provinces using microsatellite molecular markers. *Revista Bosque*, 42(3), 371-382.

Echavarría, M. (2008). Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clinical microbiology reviews*, 21(4), 704-715

Flores B, Carlos, Méndez R, Mireya, Astudillo M, Claudia, Cerda B, Hugo, Espinoza P, Tatiana, Montes F, Soledad, Flores O, Sandra, & Chateau I, Bernardita. (2013). Infección por adenovirus en hospital de niños con enfermedades respiratorias crónicas. *Revista chilena de pediatría*, 84(5), 522-526.

Graves, D., Akkerman, N., Bachus, S., y Pelka, P. (2021). Differential splicing of human adenovirus 5 E1A RNA expressed in cis versus in trans. *Journal of Virology*, 95(6), 10-1128.

HAdV Working Group. (2023) [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2023]. Disponible en: <http://hadvwg.gmu.edu/>

ISP. (2023) Genotipificación de muestras: Adenovirus. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. septiembre de 2023; Disponible en: <https://www.ispch.gob.cl/wp-content/uploads/2023/09/Genotipificacion-Adenovirus-2019-2023.pdf>

ISP. (2024) Informe de Circulación de Virus Respiratorios. Ispch.cl. Recuperado el 22 de noviembre de 2024, de <https://www.ispch.cl/wp-content/uploads/2024/01/Informe-circulacion-virus-respiratorios-SE52-02-01-2024-4.pdf>

ISP. (2023) Virus Respiratorios [Internet]. [citado 25 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://vigilancia.ispch.gob.cl/app/respiratorios>

Kajon, A. E., Lamson, D. M., y George, K. S. (2019). Emergence and re-emergence of respiratory adenoviruses in the United States. *Current opinion in virology*, 34, 63-69.

Lion, T. (2014). Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clinical microbiology reviews*, 27(3), 441-462

Liu, C., Xiao, Y., Zhang, J., Ren, L., Li, J., Xie, Z., y Shen, K. (2015). Adenovirus infection in children with acute lower respiratory tract infections in Beijing, China, 2007 to 2012. *BMC infectious diseases*, 15, 1-9.

Lynch, J. P., 3rd, & Kajon, A. E. (2016). Adenovirus: Epidemiology, global spread of novel serotypes, and advances in treatment and prevention. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37(4), 586–602

Mahr, J. A., y Gooding, L. R. (1999). Immune evasion by adenoviruses. *Immunological reviews*, 168(1), 121-130.

Marcone, D. N., Carballal, G., Ricarte, C., y Echavarría, M. (2015). Respiratory viral diagnosis by using an automated system of multiplex PCR (FilmArray) compared to conventional methods. *Revista Argentina de microbiología*, 47(1), 29-35.

Marcone, D. N., Culasso, A. C., Reyes, N., Kajon, A., Viale, D., Campos, R. H., y Echavarría, M. (2021). Genotypes and phylogenetic analysis of adenovirus in children with respiratory infection in Buenos Aires, Argentina (2000–2018). *PLoS One*, 16(3), e0248191..

Moriyama, M., Hugentobler, W. J., y Iwasaki, A. (2020). Seasonality of respiratory viral infections. *Annual review of virology*, 7(1), 83-101.4.

Palomino, M. A., Larranaga, C., y Avendano, L. F. (2000). Hospital-acquired adenovirus 7h infantile respiratory infection in Chile. *The Pediatric infectious disease journal*, 19(6), 527-531.

Pedrero, M. (2024) Infecciones respiratorias agudas bajas y sus complicaciones. Situaciones Clínicas. <https://sintesis.med.uchile.cl/condiciones-clinicas/pediatria/pediatria-situaciones-clinicas/10932-infecciones-respiratorias-agudas-bajas-y-sus-complicaciones>

Robinson, C. M., Rajaiya, J., Walsh, M. P., Seto, D., Dyer, D. W., Jones, M. S., & Chodosh, J. (2009). Computational analysis of human adenovirus type 22 provides evidence for recombination among species D human adenoviruses in the penton base gene. *Journal of Virology*, 83(17), 8980–8985.

Robinson, C. M., Singh, G., Lee, J. Y., Dehghan, S., Rajaiya, J., Liu, E. B., y Chodosh, J. (2013). Molecular evolution of human adenoviruses. *Scientific reports*, 3(1), 1812.

Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., y Ward, T. G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 84(3), 570-573.

Russell, K. L., Broderick, M. P., Franklin, S. E., Blyn, L. B., Freed, N. E., Moradi, E., y Ryan, M. A. (2006). Transmission dynamics and prospective environmental sampling of adenovirus in a military recruit setting. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(7), 877-885.

Saint-Pierre Contreras, G., Conei Valencia, D., Lizama, L., Vargas Zuñiga, D., Avendaño Carvajal, L. F., y Ampuero Llanos, S. (2023). An old acquaintance: could adenoviruses be our next pandemic threat?. *viruses*, 15(2), 330.

Soller, J. A., Bartrand, T., Ashbolt, N. J., Ravenscroft, J., y Wade, T. J. (2010). Estimating the primary etiologic agents in recreational freshwaters impacted by human sources of faecal contamination. *Water Research*, 44(16), 4736-4747.

Thermo fisher Scientific. (2024) Real-time PCR: understanding Ct. Estados Unidos, 2022. [Internet] [citado 30 de octubre de 2024] Disponible en: <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>.

Vargas, S. L., Ponce, C. A., Luchsinger, V., Silva, C., Gallo, M., René, L., y Avendano, L. F. (2005). Detection of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis and viruses in presumably immunocompetent infants who died in the hospital or in the community. *The Journal of infectious diseases*, 191(1), 122-126.

Wan, G. H., Huang, C. G., Huang, Y. C., Huang, J. P., Yang, S. L., Lin, T. Y., y Tsao, K. C. (2012). Surveillance of airborne adenovirus and *Mycoplasma pneumoniae* in a hospital pediatric department. *PLoS One*, 7(3), e33974.

Wu, X., Zhang, J., Lan, W., Quan, L., Ou, J., Zhao, W., y Zhang, Q. (2022). Molecular typing and rapid identification of human adenoviruses associated with respiratory diseases using universal PCR and sequencing primers for the three major capsid genes: penton base, hexon, and fiber. *Frontiers in Microbiology*, 13, 911694.

Xu, D., Chen, L., Wu, X., y Ji, L. (2022). Molecular typing and epidemiology profiles of human adenovirus infection among hospitalized patients with severe acute respiratory infection in Huzhou, China. *PLoS One*, 17(4), e0265987.