

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Incidencia de los Adenovirus en las conjuntivitis virales

Dra. Gisset Torres Rojas,¹ Dr. Ángel Goyenechea,² Lic. Clara Savón,³ Lic. Odalys Valdés⁴ y Dra. Isabel Oropesa⁵

RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio de incidencia de los Adenovirus en las conjuntivitis virales, para lo cual se realizó un diseño muestral y se tomaron muestras de exudado conjuntival a 150 pacientes con diagnóstico de conjuntivitis de presuntiva causa viral, en el Hospital Oftalmológico "Ramón Pando Ferrer" en el período comprendido entre julio y diciembre de 1994. Las muestras fueron inoculadas en cultivo celular y a las que presentaron un efecto citopatogénico sugestivo de infección por Adenovirus, se les realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se usaron anticuerpos monoclonales contra Adenovirus, lo que permitió identificarlas como pertenecientes a la familia Adenoviridae. Se utilizó la técnica de hemaglutinación, con hematies de monos y ratas como sistema indicador, para agrupar los aislamientos previamente identificados mediante la técnica de IFI, después se les realizó el análisis por enzimas de restricción del genoma viral, lo cual posibilitó la clasificación en tipos. Los resultados de este estudio mostraron una incidencia de los Adenovirus en las conjuntivitis virales de 20 %, con un intervalo de confianza del 14-26 %, y un índice de confiabilidad de 95 %. Se demostró que el serotipo 37 fue el que produjo conjuntivitis con mayor frecuencia.

Descriptores DeCS: CONJUNTIVITIS VIRAL/etiología; INFECCIONES HUMANAS POR ADENOVIRUS/epidemiología; TECNICA DEL ANTICUERPO FLUORESCENTE INDIRECTA/métodos; TESIS DE HEMAGLUTINACION/métodos; GENOMA VIRAL; ADENOVIRUS HUMANO/genética; ADENOVIRUS HUMANO/aislamiento & purificación.

Los Adenovirus fueron reportados por primera vez como agentes virales en 1953, durante intentos por establecer una línea celular continua procedente de tejido tonsilar y adenoideo.¹ En la actualidad se reconocen 42 serotipos, que producen afecciones en humanos al nivel de los sistemas respiratorio, cardiovascular, digestivo y urinario, entre otros.² Al nivel ocular pueden producir clínicamente 3 grandes síndromes: queratoconjuntivitis epidémica (QCE), fiebre faringo-conjuntival y conjuntivitis folicular aguda no específica, todas estas entidades tienen en común la presencia de conjuntivitis caracterizada por enrojecimiento de la conjuntiva, edema, lagrimeo, fotofobia, sensación de cuerpo extraño y frecuentes adenopatías preauriculares.³ Las conjuntivitis infecciosas y dentro de ellas las virales, constituyen una

importante causa de morbilidad y sustanciales pérdidas económicas, dentro de ellas los Adenovirus desempeñan una función importante desde el punto de vista causal.⁴

Desde que en 1980, *Wadell* y otros⁵ establecieron los patrones de restricción para los diferentes serotipos de Adenovirus, se ha logrado un avance notable en el campo de la epidemiología molecular de estos agentes, lo que ha permitido aumentar el conocimiento acerca del origen de diferentes entidades clínicas y ha posibilitado un diagnóstico eficaz y rápido de epidemias y brotes.

Hasta el momento, no existen reportes en nuestro país que permitan conocer la incidencia de los Adenovirus en las conjuntivitis virales, ni el serotipo más frecuentemente implicado en esta afección, por lo cual conocer estos datos fue nuestro objetivo fundamental,

¹ Master en Ciencias. Especialista de I Grado en Microbiología.

² Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular.

³ Doctora en Ciencias Biológicas. Licenciada en Microbiología. Investigadora Titular.

⁴ Licenciada en Bioquímica. Investigadora Aspirante.

⁵ Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Auxiliar.

se utilizaron técnicas como inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación y el análisis del genoma viral con endonucleasas de restricción.

MÉTODOS

Pacientes y muestras. Para realizar este estudio se escogió el Hospital Oftalmológico "Ramón Pando Ferrer", que reporta el mayor número diario de atenciones de enfermedades oculares, al nivel provincial. Se realizó un diseño muestral que tenía en cuenta la frecuencia de los casos de conjuntivitis virales en años anteriores y los reportes de la literatura, que señalan una incidencia de los Adenovirus en las conjuntivitis virales entre 20 y 80 %.^{6,7} El diseño consistió en un muestreo simple aleatorio, con 95 % de confiabilidad y precisión de $\pm 0,05$ y se calculó el tamaño de la muestra, la cual quedó constituida por 150 pacientes, que cumplieron los requisitos siguientes:

1. Diagnóstico de conjuntivitis de presuntiva causal viral, basado en la presencia de inflamación de la conjuntiva, lagrimeo, prurito, fotofobia, folículos y adenopatías preauriculares.
2. Tiempo de evolución de aproximadamente 5 d.
3. No uso previo de antivirales.
4. Ausencia de otra enfermedad ocular acompañante.

Conociendo el promedio reportado anteriormente, que fue de 33 casos mensuales, se decidió tomar muestra a 25 casos por mes, y se completó a 150 en el semestre estudiado, de julio a diciembre de 1994. Para conocer la incidencia de *Adenovirus* en las conjuntivitis agudas con diagnóstico presuntivo de causa viral, se utilizó la fórmula de proporción y se estimó su error.

A estos pacientes se les realizó exudado conjuntival con hisopo estéril; para el traslado de la muestra se utilizó solución Hanks con lactoalbúmina y antibióticos: 150 U de penicilina, 150 mg de estreptomycinina y 5 mg de anfotericín B/mL a 4 °C. Las muestras se conservaron a -70 °C hasta su inoculación.

Aislamiento viral. Para la inoculación de las muestras se utilizaron cultivos de células procedentes de carcinoma humano cervical (HELA-ATCC) en medio esencial mínimo con glutamina, suero de ternera fetal al 2 % y antibióticos (se utilizaron como controles positivos, los serotipos 3, 7, 9 y 15; y como controles negativos, cultivo celular sin inocular). Se realizó la incubación de las muestras a 37 °C, y se observó diariamente en busca de la aparición de efecto citopático (ECP); en caso de no observarse se realizaron 3 pases ciegos, antes de reportar una muestra como negativa.

Identificación viral por inmunofluorescencia indirecta y hemaglutinación. Se realizó la técnica de IFI, a partir del cultivo celular inoculado con las muestras que presentaron ECP, según el protocolo descrito por Knight y otros.⁸ Se usaron anticuerpos monoclonales antihexón (*Chemicon Light Diagnostic*, EE.UU.) de *Adenovirus* de acuerdo con las indicaciones del productor, se consideró positiva la presencia de 5 o más células fluorescentes por campo.

A las muestras positivas por IFI se les realizó la técnica de hemaglutinación, con hematíes de mono y rata según el protocolo descrito por Hierholzer⁹ (con el fin de clasificarlas en grupos hemaglutinantes). Para la interpretación de la prueba se consideró la presencia o ausencia de hemaglutinación, de acuerdo con los patrones propuestos por el anterior autor, para los serotipos productores de conjuntivitis.

Extracción del ADN y análisis de restricción. El ADN de los aislamientos fue extraído a partir de cultivos de células HELA infectadas, según el método descrito por Hirt y otros.¹⁰ Para comprobar la calidad y concentración del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, se utilizó como *buffer* de corrida el Tris-Borato EDTA. Se estimó la concentración de ADN correspondiente a cada muestra, para su posterior digestión se consideró como adecuada la concentración de 2 µg. Se digirió cada una de las muestras en una mezcla que incluyó ADN extraído y 25 unidades de la enzima (Hind III Promega), teniendo en cuenta las indicaciones del productor), en un volumen final de 50 µL de agua bidestilada, y se mantuvo 3 h a 37 °C.¹¹

Para la detección del producto digerido se realizó una electroforesis (se aplicaron 20 µL de la mezcla), en un gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidium. Se dejó migrar a 80 V por 3 h. Se utilizaron marcadores de pesos moleculares (Lambda ADN digerido con ECORI-Hind III y Lambda ADN digerido con Hind III) y 2 controles positivos que correspondieron a ADN extraídos de cepas de Adenovirus 3 y 7, con los cuales se siguió igual procedimiento.

Las bandas fueron visualizadas en transiluminador de luz ultravioleta (*Transiluminator 2001 Macrowe*) y fotografiadas.

RESULTADOS

En este trabajo se encontró que de las 150 muestras inoculadas, en 30 se observó un efecto citopático sugestivo de infección por Adenovirus, "racimos de uvas". Al realizarse la IFI para identificar los aislamientos como pertenecientes a la familia Adenoviridae,

encontramos 100 % de coincidencia entre la observación de los cambios morfológicos celulares y la positividad de las muestras por la IFI. Estos resultados permitieron conocer (según los métodos antes descritos), que la incidencia de Adenovirus en las conjuntivitis virales en el presente estudio, fue de 20 %, con un intervalo de confianza de 14 a 26 % y un índice de confiabilidad de 95 %.

Al realizar la técnica de hemaglutinación a las muestras previamente identificadas por IFI, todas quedaron incluidas dentro de los grupos hemaglutinantes I y II; por lo tanto se decidió utilizar la enzima Hind III, que permite diferenciar entre los serotipos productores de conjuntivitis de estos 2 grupos y distinguir las diferentes variantes que existen dentro de un mismo serotipo.¹² En la figura, en el canal 1, se encuentra el marcador de peso molecular Lambda ADN digerido con ECOR I - Hind III, y en los canales 18 y 19 se encuentra el marcador de peso molecular Lambda ADN digerido con Hind III. Los patrones de restricción que se observan en los canales 2 y 11, se corresponden con los Adenovirus 7 y 3, respectivamente, que se usaron como controles positivos (la utilización de esta enzima permitió identificar al control positivo de Adenovirus 7, como la variante 7a de acuerdo con *Kajon* y otros).¹² Según los patrones

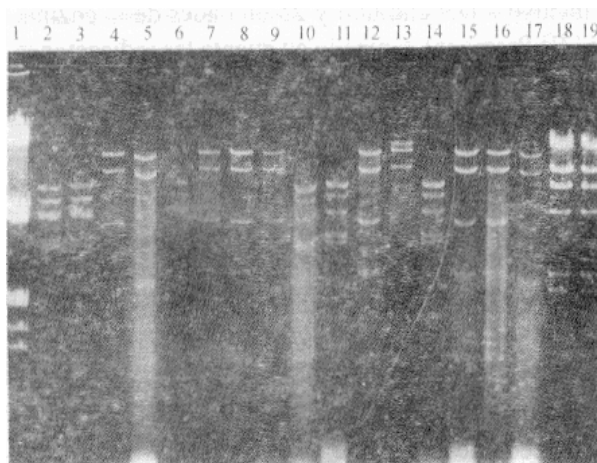


Fig. Gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidium, donde se muestran los diferentes patrones obtenidos de la digestión de los genomas virales procedentes de casos clínicos.

Canal:

1. Marcador de peso molecular Lambda ADN digerido con Hind III-ECOR I.
- 18, 19. Marcador de peso molecular Lambda ADN digerido con Hind III.
2. Cepa prototipo de Adenovirus 7a (previamente descrita).
11. Cepa prototipo de Adenovirus 3 (previamente descrita).
- 3, 6. Casos clínicos correspondientes al serotipo 7.
- 10, 14. Casos clínicos correspondientes al serotipo 3.
- 4, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16 y 17. Se encuentran casos clínicos cuyos patrones se corresponden con 2 variantes del serotipo 37.

propuestos por el anterior autor en 1992,¹² por *Johansson* en 1993,¹³ y por *Wigand* y otros en 1989,¹⁴ 4 de las muestras aplicadas presentaron patrones idénticos a los observados en las posiciones 10 y 14, las cuales corresponden al serotipo 3, 4 muestras correspondieron al serotipo 7a (canales 3 y 6), y en el resto de los canales, se observan patrones que pertenecen a variantes del serotipo 37, que se obtuvieron en 21 muestras. Al realizarse la digestión una muestra se degradó (tenía un patrón I de hemaglutinación).

DISCUSIÓN

En estudios de incidencia de Adenovirus en conjuntivitis virales, autores como *Bueno* y otros⁴ en 1993, obtuvieron un resultado de 63 %, con una buena correlación clínico-microbiológica, estudios previos realizados por *Irving* en 1981,⁶ *Aoki* en 1982⁷ y *Mc Minn* en 1991,¹⁵ señalan porcentajes de aislamientos de 20, 80 y 60 %, respectivamente. Las variaciones de incidencia observadas en los diferentes reportes, pueden justificarse por las condiciones epidemiológicas específicas de cada país, y por los cambios anuales, que pueden ocurrir dentro de una misma zona. Los serotipos de Adenovirus causantes de conjuntivitis producen tantos casos esporádicos como epidémicos, y dependiendo de esta situación habrá también fluctuaciones en el número de aislamientos.

El análisis de restricción del genoma viral permite clasificar con alta especificidad a los Adenovirus, y ha contribuido a esclarecer las reacciones cruzadas que se observan por otras técnicas; posibilita además, el incremento del conocimiento sobre la epidemiología molecular de estos agentes. La utilización de esta técnica permitió tipificar nuestros aislamientos, nuestros resultados son similares a los de otros autores,^{16,17} que plantean que los serotipos 3, 7 y 37 están entre los principales productores de enfermedad ocular. De acuerdo con lo reportado en la literatura, los aislamientos de los serotipos 3 y 7 son más frecuentes en el verano, y los del serotipo 37 se mantienen constantes durante todo el año.¹⁸ En el presente estudio, la distribución de los aislamientos del serotipo 37 coincide con lo reportado; sin embargo, en el caso de los serotipos 3 y 7 no se pudo establecer la estacionalidad. Estos resultados no son concluyentes, ya que para precisar la relación entre la circulación de los diferentes serotipos de Adenovirus y la época del año, es necesario realizar un estudio longitudinal en un período mayor. Hay que tener en cuenta además, que los trabajos que reportan esa relación fueron realizados en zonas geográficas con estaciones bien delimitadas, lo cual no sucede en nuestro país.

Al corresponder el 70 % de nuestros aislamientos a 2 variantes del serotipo 37, se confirma lo planteado por Kemp en 1983,¹⁹ e Higuchi en 1990,²⁰ en cuanto a los cambios en la causa de las queratoconjuntivitis, y la posibilidad del serotipo 37 y de sus variantes de provocar casos esporádicos y epidémicos, en niños y adultos. El grupo D, al que pertenece el serotipo 37, exhibe una gran variabilidad, con 29 variantes reconocidas.²¹ Es característico en este grupo la presencia de cepas serológicamente intermedias; es comprensible por tanto, la necesidad de utilizar endonucleasas de restricción para distinguir entre los aislamientos.

En la epidemiología de las QCE, ocupan un lugar importante los casos esporádicos de conjuntivitis y queratoconjuntivitis (como los que reportamos en el presente estudio), ya que son ellos los que mantienen a los virus productores de epidemias circulando en la comunidad, y al unirse este factor a la violación de las normas de higiene individual y colectiva, se favorece el desencadenamiento de las epidemias.²²

En nuestro país no existían estudios previos de incidencia de los Adenovirus en las conjuntivitis virales, por lo cual este trabajo constituye el primer reporte, con el serotipo 37 como el agente que con mayor frecuencia fue aislado, seguido de los serotipos 3 y 7.

SUMMARY

A study about the incidence of Adenovirus on viral conjunctivitis was conducted. A sample design was made and samples of conjunctival exudate were taken from 150 patients with diagnosis of apparently viral conjunctivitis at the "Ramón Pando Ferrer" Ophthalmological Hospital from July to December, 1994. Samples were inoculated in cell culture and the indirect immunofluorescence technique was applied to those with a cytopathogenic effect that suggested infection due to Adenovirus. Monoclonal antibodies were used against Adenovirus allowing to identify them as part of the Adenoviridae family. The hemoagglutination technique was used with erythrocytes of monkeys and rats as an indicator system in order to group the isolates previously identified by the indirect immunofluorescence technique. Later on, it was made an analysis by restriction enzymes of the viral genome to enable typing. The results of this study showed an incidence of Adenovirus on viral conjunctivitis of 20 %, with a confidence interval between 14 and 26 % and a reliability index of 95 %. It was proved that serotype 37 caused conjunctivitis more frequently.

Subject headings: CONJUNCTIVITIS, VIRAL/etiology; ADENOVIRUS INFECTIONS, HUMAN/epidemiology; FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE, INDIRECT/methods; HEMAGGLUTINATION TESTS/methods; GENOME, VIRAL; ADENOVIRUSES, HUMAN/genetics; ADENOVIRUSES, HUMAN/isolation & purification.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;84:570-3.
- Murray P, Drew W, Kobayashi G, Thompson J. *Microbiología médica*. Barcelona: Mosby-Year-Book de España, 1992: 491-9.
- Bennett FM, Law BB, Hamilton W, Mc Donald A. Adenovirus eye infections in Aberdeen. *Lancet* 1957;2:670-3.
- Bueno JL, Pérez-Santonja JJ, Gadea I. Etiología de conjuntivitis agudas atendidas en un servicio de urgencias oftalmológicas. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1993;64:289-94.
- Wadell G, Hammarkjold ML, Winberg G, Varsangi TM, Sundell G. Genetic variability of adenoviruses. *Ann NY Acad Sci* 1980; 354:16-42.
- Irving L, Kennett M, Lewis F, Birch C, Donaldson A. Adenovirus eye infections in an Australian city, 1972-9. *J Hyg* 1981;86:95-103.
- Aoki K, Kato M, Ohtsuda H, Ishil K, Narazono N. Clinical and etiological study of adenovirus conjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 1982;66:776-80.
- Knight V, Brasier F, Greenberg SB, Jones DB. Immunofluorescent diagnosis of acute viral infection. *South Med J* 1975;68:764-6.
- Hierholzer JC, Suggs MT, Hall EC. Standardized viral hemagglutination and hemagglutination-inhibition tests: II, description and statistical evaluation. *Appl Microbiol* 1969;18:824-33.
- Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* 1967;26:365-9.
- Johansson ME, Brundin M, Adamson L, Grillner L, Landquist M. Characterization of two genome types of adenovirus type 31 isolated in Stockholm during 1987. *J Med Virol* 1989;28: 63-8.
- Kajon A, Wadell G. Characterization of adenovirus genome type 7h: analysis of its relationship to other members of serotype 7. *Intervirology* 1992;33:80-90.
- Johansson MA, Ahrel-Andersson M, Gudnadottir S. Molecular epidemiology of adenoviruses isolated in Iceland during 1988-1990. *J Virol Methods* 1993;42(2):193-206.
- Wigand R, Adrian T. Intermediate adenovirus strains of subgenus D occur in extensive variety. *Med Microbiol Immunol* 1989;178:37-44.
- Mc Minn PC, Stewart J, Burrell CJ. A community outbreak of epidemic Keratoconjunctivitis in Central Australia. *J Infect Dis* 1991;164:1113-8.
- Tsai JC, Garinghouse G, Mc Donnell PJ, Trousdale MD. An experimental animal model of Adenovirus induced ocular disease. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1167-70.
- Ford E, Nelson KE, Warren D. Epidemiology of epidemic kerato-conjunctivitis. *Epidemiol Rev* 1987;9:245-61.
- Schmitz H, Wignad R, Heinrich W. Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 1983; 117:455-66.
- Kemp M, Hierholzer JC, Cabradilla C. The changing etiology of epidemic Keratoconjunctivitis: antigenic and restriction enzymes of adenovirus types 19 y 37. Isolated over a 10 year period. *J Infect Dis* 1983;148:24-33.
- Higuchi M. Studies on new adenovirus types of subgenus D causing conjunctivitis-antigenic and restriction endonuclease analysis of adenovirus types 19 and 37. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1990;61:437-47.
- Hierzolzer JC, Wignad R, Anderson LJ, Adrian T, Gold JWM. Adenovirus from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43-47). *J Infect Dis* 1988;158:804-13.
- Tullo AB. Shipyard eye. *Br Med J* 1981;283:1050-7.

Recibido: 28 de agosto de 1997. Aprobado: 30 de abril de 1998.
Dra. Gisset Torres Rojas. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.