



Instituto de Medicina Tropical

"Pedro Kourí"

Vice-Dirección de Microbiología,
Departamento de Virología

"Infecciones por Adenovirus en Cuba (2000-2008)"

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en
Ciencias de la Salud

Autor: Lic. Grehete González Muñoz, MSc

La Habana
2012

Instituto de Medicina Tropical

"Pedro Kourí"

Vice-Dirección de Microbiología,
Departamento de Virología

"Infecciones por Adenovirus en Cuba (2000-2008)"

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en
Ciencias de la Salud

Autor: Lic. Grehete González Muñoz, MSc

Asesores: Prof. Clara Savón Valdés, DrC

Prof. Odalys Valdés Ramírez, DrC

La Habana

2012

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- Ac:** Anticuerpos
- AcNt:** Anticuerpos neutralizantes
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- AdV:** Adenovirus
- APP:** Antecedente patológico personal
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- ATCC:** Siglas del inglés *American Type Culture Collection*
- CAR:** Receptor de coxsackie y adenovirus, siglas del inglés *coxsackie adenovirus receptor*
- CDC:** Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta, siglas del inglés *Center for Diseases Control*
- CHA:** Conjuntivitis hemorrágica aguda
- CMV:** Citomegalovirus
- CTL:** Linfocitos T citotóxicos, siglas del inglés *cytotoxic T lymphocyte*
- DR:** Distres respiratorio
- ECP:** Efecto citopático
- ED:** Enfermedad diseminada
- ENF:** Exudados nasofaríngeos
- ES:** Enfermedad subyacente
- EUA:** Estados Unidos de América
- FFC:** Fiebre faringo-conjuntival
- HLA:** Antígeno leucocitario humano, siglas del inglés *Human Leukocyte Antigen*
- IC:** Intervalo de confianza
- IF:** Inmunofluorescencia
- IFI:** Inmunofluorescencia Indirecta
- IL:** Interleuquina, siglas del inglés *Interleukin*
- IPK:** Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
- IRA:** Infección respiratoria aguda
- IRAG:** Infección respiratoria aguda grave
- ITR:** Infecciones del tracto respiratorio
- ITRI:** Infecciones del tracto respiratorio inferior
- ITRS:** Infecciones del tracto respiratorio superior
- ITU:** Infecciones del tracto urinario
- LBA:** Lavados broncoalveolares
- LCR:** Líquido cefalorraquídeo

LNRE: Laboratorio Nacional de Referencia de Enterovirus

LNRVR: Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios

MCD: Miocardiopatía dilatada

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad, siglas del inglés *Major Histocompatibility Complex*

MVA: Miocarditis viral aguda

NK: Células asesinas naturales, siglas del inglés *Natural killer*

OR: Coeficiente de riesgo relativo, siglas del inglés *Odds Ratio*.

p: Valor de significación estadística

pb: Pares de bases

QCE: Queratoconjuntivitis hemorrágica

RCP: Reacción en cadena de la polimerasa

RCP-TR: Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real

SDRA: Síndrome de distres respiratorio agudo

SFP: Síndrome febril prolongado

SIDA ó Sida: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SNC: Sistema nervioso central

SNI: Síndrome neurológico infeccioso

SSP: Síndrome similar al pertusis

TGI: Tracto gastrointestinal

Th: Células T cooperadoras, siglas del inglés *T helper*

TR: Tracto respiratorio

TRI: Tracto respiratorio inferior

UCI: Unidad de cuidados intensivos

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VIH+: Individuos seropositivos al VIH

SINTESIS

Las infecciones por adenovirus causan un variado espectro clínico en el hombre, con un rango que incluye desde la infección asintomática hasta la enfermedad diseminada con peligro para la vida. En el presente estudio, se analizó el comportamiento de las infecciones por adenovirus en síndromes de etiología viral como la infección respiratoria aguda, la miocarditis viral, la conjuntivitis hemorrágica y el síndrome neurológico infeccioso. Además, se estudió la participación de estos agentes en los síndromes gastrointestinal y respiratorio en pacientes seropositivos al VIH. Los adenovirus constituyeron el 16,4 % de todas las IRA investigadas (n=1200) y la infección se asoció significativamente a los niños menores de cinco años, sin un patrón estacional definido, pero asociado a parámetros meteorológicos como la temperatura y las precipitaciones. La neumonía constituyó el principal diagnóstico clínico (34%). Se demostró la participación de los adenovirus dentro de la miocarditis viral aguda y en la conjuntivitis hemorrágica con porcentajes de 58,3% y 40%, respectivamente. Se demostró la participación de los adenovirus en los síndromes gastrointestinal (25%) y respiratorio (48%) en pacientes seropositivos al VIH. La asociación de este virus con manifestaciones severas y casos fatales, la aparición de complicaciones que involucran al sistema nervioso central, avalan la importancia de este patógeno y su impacto en la morbilidad de las infecciones por adenovirus en la población cubana.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Antecedentes	1
I.2 Hipótesis.....	5
I.3 Objetivos	5
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
II.1 Los adenovirus.....	6
II.1.1 Reseña histórica.....	6
II.1.2 Clasificación, estructura y composición	7
II.1.3 Principales antígenos.....	9
II.1.4 Propiedades biológicas	10
II.2 Agente infeccioso.....	11
II.2.1 Patogenia y patología.....	11
II.2.2 Entrada al hospedero.....	11
II.2.2.1 Receptores celulares que median la entrada del virus.....	12
II.2.3 Diseminación del virus dentro del hospedero.....	14
II.2.4 Latencia y persistencia.....	15
II.2.5 Respuesta inmune.....	15
II.3 Epidemiología.....	17
II.3.1 Prevención y Control de las Infecciones.....	18
II.4 Serotipos emergentes.....	19
II.5 Manifestaciones Clínicas de la Infección por los AdV.....	21
II.5.1 Infecciones del Tracto Respiratorio Superior e Inferior.....	21
II.5.2 Infecciones Oculares.....	22
II.5.3 Infecciones del tracto gastrointestinal.....	23
II.5.4 Infecciones en el tracto urinario.....	25
II.5.5 Infecciones en el sistema nervioso central.....	25
II.5.6 Infecciones del miocardio.....	26
II.5.7 Enfermedades asociadas al paciente inmunocomprometido.....	27
II.5.7.1 Infección en receptores de trasplante de células hematopoyéticas...	27
II.5.7.2 Infecciones en receptores de trasplante de órganos sólidos.....	28
II.5.7.3 Infecciones en el paciente VIH/SIDA.....	29
II.6 Diagnóstico virológico y caracterización.....	30
II.7 Opciones terapéuticas.....	32
II.8 Vacunas.....	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	36
III.1 Caracterizar la infección por adenovirus en pacientes con diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda.....	37
III.1.1 Tipo de estudio.....	37
III.1.2 Universo de Estudio.....	37
III.1.3 Muestras y población de estudio.....	37
III.1.4 Metodología empleada.....	41
III.1.4.1 Diagnóstico de la infección por adenovirus.....	41
III.1.4.2 Identificación de los aislamientos.....	43
III.1.4.3 Caracterización de las cepas de AdV.....	44

III.1.4.3.1 Determinación de las especies de AdV.....	44
III.1.4.3.2 Determinación de los serotipos de AdV.....	44
III.1.4.4 Análisis Estadístico.....	46
III.2. Determinar la participación de los adenovirus en la miocarditis viral, la conjuntivitis hemorrágica y el síndrome neurológico infeccioso	47
III.2.1 Miocarditis Viral aguda (MVA).....	47
III.2.1.1 Tipo de estudio.....	47
III.2.1.2. Universo de estudio.....	47
III.2.1.3 Tamaño Muestral y características de la población estudiada.....	47
III.2.1.4. Diagnóstico de Laboratorio.....	48
III.2.1.5 Caracterización en especies y serotipos.....	48
III.2.2 Conjuntivitis hemorrágica aguda (CHA).....	48
III.2.2.1 Tipo de estudio.....	48
III.2.2.2 Universo de estudio.....	48
III.2.2.3 Diagnóstico Viroológico.....	48
III.2.2.4 Caracterización en especies y serotipos.....	49
III.2.3 Síndrome neurológico infeccioso (SNI).....	49
III.2.3.1 Tipo de estudio.....	49
III.2.3.2 Universo de estudio.....	49
III.2.3.3 Tamaño muestral y población estudiada.....	49
III.2.3.4 Diagnóstico Viroológico.....	50
III.3 Determinar la prevalencia de la infección por AdV en el tracto gastrointestinal y su asociación con los síndromes gastrointestinal y respiratorio en pacientes seropositivos al VIH	50
III.3.1 Infección por AdV en muestras del tracto gastrointestinal.....	50
III.3.1.1 Tipo de estudio.....	50
III.3.1.2 Muestras y Pacientes.....	50
III.3.1.3 Detección de AdV en las muestras.....	51
III.3.1.3.1 Aislamiento viral.....	51
III.3.1.4 Caracterización de las cepas de AdV.....	51
III.3.1.4.1 Determinación de las especies de AdV.....	51
III.3.1.4.2 Determinación de los serotipos de AdV.....	52
III.3.1.5 Estimación de la carga viral.....	53
III.3.1.6 Datos clínicos.....	53
III.3.1.7 Análisis estadístico.....	53
III.3.2 Infección por AdV en el Tracto Respiratorio.....	53
III.3.2.1 Tipo de estudio.....	53
III.3.2.2 Universo de estudio.....	53
III.3.2.3 Tamaño muestral y características de la población.....	53
III.3.2.4 Diagnóstico virológico.....	54
III.3.2.4.1 Detección del genoma viral de AdV.....	54
III.3.2.4.2 Aislamiento en cultivo celular e identificación de AdV.....	54
III.3.2.5 Caracterización en especies y serotipos.....	54
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
IV.1 Caracterizar la infección por adenovirus en pacientes con diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda.....	55
IV.1.1 Diagnóstico y frecuencia de la infección por adenovirus.....	55
IV.1.2 Frecuencia de la infección por grupos de edades y sexos.....	57

IV.1.3 Estacionalidad.....	59
IV.1.4 Principales diagnósticos clínicos asociados a la infección por AdV.....	62
IV.1.5 Casos de pacientes fallecidos asociados a la infección por AdV	65
IV.1.6 Caracterización en especies y serotipos.....	66
IV.2 Determinar la participación de los adenovirus en la miocarditis viral, la conjuntivitis hemorrágica y el síndrome neurológico infeccioso.....	70
IV.2.1 Miocarditis viral aguda.....	70
IV.2.2 Conjuntivitis hemorrágica aguda.....	72
IV.2.3 Síndrome neurológico infeccioso.....	75
IV.3 Determinar la prevalencia de la infección por AdV en el tracto gastrointestinal y su asociación con los síndromes gastrointestinal y respiratorio en pacientes seropositivos al VIH.....	76
IV.3.1 Identificación de los AdV en muestras del TGI.....	76
IV.3.2 Infección por AdV en el tracto respiratorio.....	79
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	82
VI. CONCLUSIONES	89
VII. RECOMENDACIONES	90
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

I INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

Estudios basados en la vigilancia de las infecciones respiratorias agudas (IRA), realizados fundamentalmente en los Estados Unidos hace más de 40 años, concluyeron que las infecciones por adenovirus (AdV) eran muy comunes entre los niños, siendo asintomáticas en el 50% de los casos, mientras que las sintomáticas se manifestaban de forma típicamente leve y eran resueltas sin secuelas (Jordan *et al.*, 1957; Fox *et al.*, 1969; Hall *et al.*, 1971; Fox *et al.*, 1977). A diferencia de esto, la experiencia descrita entre la población militar era la de numerosas epidemias con manifestaciones clínicas severas, que incluían neumonía y encefalitis, especialmente causadas por los serotipos 4 y 7, lo que trajo como consecuencia el desarrollo de vacunas que se utilizaron con eficacia entre la población militar. De esta manera, la infección por AdV se consideró una infección sin consecuencias significativas a excepción de la morbilidad que causaban en la población militar (Gray *et al.*, 2007).

Sin embargo, mucho ha cambiado desde aquellos primeros estudios epidemiológicos, donde en comparación con la actualidad, pocos serotipos se habían descubierto. Hoy, los AdV constituyen una extensa y difundida familia viral, donde están contenidos los 51 serotipos capaces de infectar al hombre (Wold y Horwitz, 2007). Cada serotipo constituye una plétora de genotipos, algunos de ellos con múltiples variantes genéticas de diferente distribución geográfica, períodos de tiempo y manifestaciones clínicas (Chang *et al.*, 2008; Mahadevan *et al.*, 2010; Carr *et al.*, 2011). Esta variabilidad genómica demuestra el cambio en los patrones evolutivos y explica el dramático ascenso en la incidencia de las infecciones adenovirales con

una morbilidad significativa entre la población susceptible (Landry *et al.*, 2009; Rebelo de Andrade *et al.*, 2010)

A medida que se ha ido conociendo que la mayoría de los serotipos correlacionan con los diferentes síntomas clínicos y que la aparición de nuevas variantes genéticas podrían estar asociadas con la severidad, el valor de la serotipificación y la caracterización de los aislamientos se ha incrementado como tareas esenciales para el fortalecimiento de la vigilancia de laboratorio (Lee *et al.*, 2010). Esto permite alertar oportunamente al sistema nacional de salud sobre los cambios en la prevalencia de un determinado serotipo, que deberá ser evaluado como un indicador de la emergencia de una nueva cepa. Adicionalmente, resulta importante y estrictamente necesario monitorear los patrones epidémicos e investigar la extensión de las infecciones para identificar, controlar y prevenir futuras epidemias, teniendo en cuenta que la vacunación no está disponible (Ren *et al.*, 2009).

Las enfermedades que los AdV causan en el humano tienen un variado espectro clínico que depende sustancialmente del serotipo infectante (Stroparo *et al.*, 2010). Este espectro es amplio, con un rango que incluye desde la infección asintomática, infección respiratoria (leve, moderada y severa), conjuntivitis, miocarditis, cistitis hemorrágica, meningoencefalitis, gastroenteritis, hepatitis, hasta la enfermedad diseminada (ED) con peligro para la vida (Louie *et al.*, 2008).

La morbilidad y mortalidad asociadas a las infecciones por virus respiratorios han determinado que las IRA constituyan una prioridad dentro de los retos a resolver por los sistemas de salud a nivel mundial (WHO, 2004). Las IRA del tracto inferior son unas de las principales causas de mortalidad entre los niños del mundo, particularmente en países pobres y en vías de desarrollo, causando aproximadamente un tercio de todas las muertes estimadas en niños menores de 5 años (Williams *et al.*, 2002).

Los AdV constituyen uno de los virus respiratorios que aportan un peso importante a la etiología de estas infecciones, causando el 10% de las IRA que requieren hospitalización dentro de la población pediátrica, siendo considerado uno de los virus respiratorios que más muertes produce en niños (Hong *et al.*, 2001). Ellos se asocian

con infecciones esporádicas, endémicas, así como a brotes comunitarios en instituciones escolares y unidades hospitalarias cerradas con una elevada mortalidad entre pacientes y personal médico (Gerber *et al.*, 2001; Ghanaïem *et al.*, 2011). Aunque los AdV pueden causar diversas manifestaciones clínicas dentro del tracto respiratorio inferior, es sin duda la neumonía, la enfermedad de mayor gravedad, con frecuente admisión en unidades de cuidados intensivos (UCI) y necesidad de ventilación mecánica, dejando importantes secuelas de daño pulmonar residual como las bronquiectasias y la bronquiolitis obliterante (Gupta *et al.*, 2010; Odivre *et al.*, 2011).

Además de los neonatos, niños pequeños, adultos jóvenes y reclutas, que son los más frecuentemente afectados, la significación de la infección por AdV en pacientes inmunocomprometidos está sólidamente establecida, hoy se reconocen entre los muchos patógenos que contribuyen al deterioro y a enfermedades que amenazan la vida del paciente inmunocomprometido (Tebruegge y Curtis, 2010). Estas infecciones tienen el potencial de causar ED, con índices de mortalidad superiores al 50%, y se consideran un gran problema en el cuidado de estos pacientes (Ison y Green, 2009; Lindemans *et al.*, 2011). El manejo de estas infecciones es aún difícil en términos de prevención y tratamiento, aunque se han hecho progresos con respecto al diagnóstico temprano de la infección y de sus complicaciones, basados en la detección del ácido desoxiribonucleico (ADN) de AdV en plasma, particularmente mediante ensayos cuantitativos que permiten predecir la diseminación y evaluar una terapéutica antiviral adecuada (Hoffman, 2009; Lion *et al.*, 2010).

Al ser el AdV el único de los virus respiratorios capaz de propagarse a otros órganos más allá del sistema respiratorio, fuera de su contexto habitual se describen como agentes causales de enfermedades oculares, como la conjuntivitis folicular, la fiebre faringo conjuntival (FFC), la queratoconjuntivitis epidémica (QCE) y la conjuntivitis hemorrágica aguda (CHA) que aunque no representan un peligro para la vida, son enfermedades de un gran impacto social y elevado costo económico (Sethuraman y Kamat, 2009)

Además de las infecciones oculares, los AdV califican dentro de los virus cardiotrópicos y junto a los enterovirus se consideran agentes principales de miocarditis viral aguda (MVA) (Knowlton y Lim, 2009). Esta enfermedad que continúa siendo un reto desde el punto de vista clínico y terapéutico, se considera la causa más frecuente de fallo cardíaco en niños, con una alta mortalidad en este grupo de edad (Calabrese *et al.*, 2002; Camargo *et al.*, 2011). Se plantea además, que la infección persistente del miocardio por este virus, es un factor importante en el curso hacia la miocardiopatía dilatada (MCD), la cual puede ocurrir como una secuela tardía de la MVA. La progresión hacia esta enfermedad es posible aun con una baja carga viral, ya sea por un daño viral directo producto de la infección temprana o por un daño indirecto después de la infección mediado por el sistema inmune (Debiasi *et al.*, 2010).

Las técnicas moleculares contribuyen significativamente a la pronta identificación de este virus asociado a diferentes cuadros clínicos, permitiendo la adopción rápida de medidas terapéuticas y estrategias de prevención y control, que eviten la diseminación de estas infecciones de alto grado de transmisibilidad, disminuyendo su impacto en la morbilidad y la mortalidad (Stroparo *et al.*, 2010).

En Cuba, no existe información acerca de los patrones de circulación de los AdV, ni de los factores de riesgo que condicionan la gravedad, las complicaciones clínicas y la mortalidad que este virus produce dentro de la infección respiratoria aguda grave, que constituye la primera causa de muerte dentro de las enfermedades infecciosas (MINSAP, 2011). Tampoco existen estudios previos que reflejen la incidencia de este virus fuera del ámbito respiratorio en otras enfermedades de etiología viral como la MVA y la CHA, así como también se desconoce cuál es el alcance y trascendencia de estas infecciones en el paciente inmunocomprometido, particularmente los afectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Este trabajo pretende aportar un mejor conocimiento sobre la dimensión de la infección por los AdV en nuestro país y que nuevas tareas debemos enfrentar para disminuir su incidencia, lo cual es de suma importancia.

Sospechar tempranamente esta infección e implementar estrategias que incluyan el diagnóstico rápido y la caracterización virológica podrían evitar la infección nosocomial en niños hospitalizados, la evolución grave de los casos secundarios que ocurre en pacientes con factores de riesgo y el uso innecesario de antibióticos, disminuyendo el costo adicional que representa para el paciente y el sistema nacional de salud el alto porcentaje de secuelas luego de una IRA del tracto inferior por AdV (Tregoning y Schwarze, 2010).

I.2 Hipótesis.

Las infecciones por las diferentes especies y serotipos de adenovirus que circulan en Cuba, están asociadas a una variedad de manifestaciones clínicas en diferentes grupos de pacientes.

I.3 Objetivos

General

Identificar a los adenovirus como agentes causales de infecciones relevantes asociadas a diferentes cuadros clínicos.

Específicos:

1. Caracterizar la infección por adenovirus en pacientes con diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda.
2. Determinar la participación de los adenovirus en la miocarditis, la conjuntivitis hemorrágica y el síndrome neurológico infeccioso.
3. Determinar la prevalencia de la infección por AdV en el tracto gastrointestinal y su asociación con los síndromes gastrointestinal y respiratorio en pacientes seropositivos al VIH.

II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Los Adenovirus

II.1.1 Reseña histórica

Durante la década de los cincuenta, Rowe y colaboradores reconocieron a un agente transmisible que causaba degeneración de las células del tejido epitelial de amígdalas y adenoides, extraídos quirúrgicamente de niños. De este modo, los AdV se cultivaron y describieron por primera vez como nuevos virus. Casi simultáneamente, agentes similares se aislaron de personal militar mientras se establecía la etiología de un síndrome febril respiratorio. Estos virus morfológicamente indistinguibles fueron clasificados como agentes “degeneradores” de adenoides, agentes adeno-faringo-conjuntivales y agentes de infección respiratoria aguda (Rowe *et al.*, 1953; Hilleman y Werner, 1954).

La nomenclatura para los AdV se adoptó en el año 1956 (Enders *et al.*, 1956) y más tarde se reclasificaron en 1999 (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Posteriormente, se comprobó que este nuevo virus tenía múltiples serotipos, relacionados antigénicamente por un grupo-específico de antígenos fijadores del complemento. El número de serotipos de AdV creció rápidamente durante 1960 - 1970 y hasta hoy se reconocen 51 (Berk, 2007), aunque una nueva especie, G-52 (Jones *et al.*, 2007) y nuevos serotipos, D-53 (Ishiko y Aoki, 2009), D-54 (Robinson *et al.*, 2009) y B-55 (Yang *et al.*, 2009), se aceptan como nuevos candidatos. La sorprendente diversidad de los AdV humanos se reconoció tempranamente al igual que sus propiedades biológicas, muchas de las cuales tienen una obvia influencia en la patogenicidad y se usaron como base para establecer las subdivisiones que actualmente conocemos (Benko, 2008).

II.1.2 Clasificación, estructura y composición

Los AdV pertenecen a la familia Adenoviridae, que está dividida en cuatro géneros: *Aviadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Siadenovirus* y *Atadenovirus* (Davison *et al.*, 2003). Los AdV humanos, se encuentran incluidos dentro del género *Mastadenovirus* y están subdivididos en 6 especies, de la A – F (Tabla I.1), sobre la base de criterios inmunológicos, bioquímicos y de acuerdo a su tropismo, en estas 6 especies están contenidos los 51 serotipos que infectan al hombre (Wold y Horwitz, 2007).

Tabla I.1 Clasificación de los AdV humanos de acuerdo al tropismo

ESPECIES	SEROTIPOS	TROPISMO
A	12,18,31	Intestino
B:1	3,7,16,21	Tracto Respiratorio, Conjuntiva, Tracto Intestinal
B:2	11,14,34,35, 50	Tracto Urinario, Tracto Respiratorio
C	1,2,5,6	Tracto Respiratorio, Tracto Intestinal
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 22-30 32, 33, 36-39, 42-49, 51	Conjuntiva, Tracto intestinal
E	4	Tracto Respiratorio, Conjuntiva
F	40, 41	Intestino

Fuente: Wold y Horwitz, 2007

Los AdV son virus icosaédricos, desnudos, de aproximadamente 90 nm de diámetro, cuyo virión contiene ADN (13%), proteínas (87%) y pequeñas cantidades de carbohidratos (Berk, 2007). La cápside externa está conformada por 252 subunidades de proteínas denominadas capsómeros (Figura II.1), de las cuales 240 son hexonas y 12 son pentonas, desde cuya base se proyectan las fibras donde se encuentran las glicoproteínas responsables de la adhesión a las células endoteliales y responsables de su capacidad hemaglutinante (Harrach, 2008).

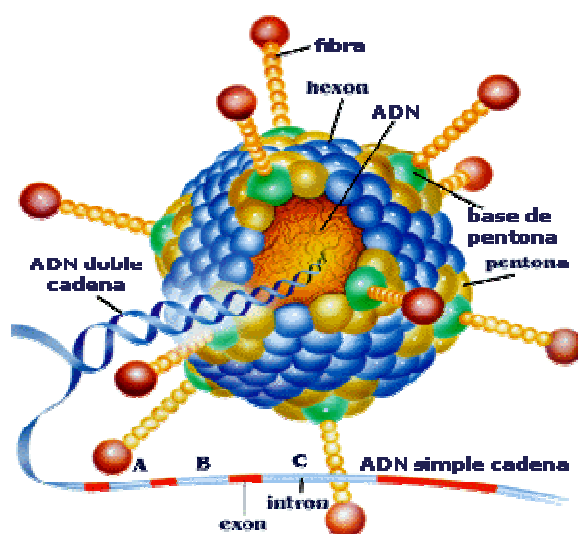


Figura II.1 Estructura de un adenovirus

El genoma de AdV es una molécula lineal de ADN de doble cadena y 36.000 pares de bases (pb) aproximadamente que codifica para 11 proteínas estructurales, numeradas convencionalmente de II-IX, IIIa, μ , proteína terminal y la proteasa viral p23. El genoma de los AdV humanos tiene cinco unidades de transcripción inmediata temprana (E1A, E1B, E2, E3 y E4), tres unidades de transcripción temprana (IX, IVa2 y E2 tardía) y una unidad principal de transcripción tardía (MLTU, según sus siglas en inglés), que generan cinco familias de ARNm tardíos (L1-L5) (Berk, 2007). Estas unidades de transcripción codifican para polipéptidos cuyas funciones están relacionadas entre sí, por ejemplo, la unidad E1A codifica para dos proteínas que activan la transcripción e inducen a la célula hospedera a entrar en la fase S del ciclo celular; E1B codifica para dos proteínas que bloquean la apoptosis; E2 codifica para tres proteínas cuya función está directamente relacionada con la replicación del ADN (Benko, 2008). La región E3 codifica para productos que modulan la respuesta inmune del hospedero a la infección (Fu *et al.*, 2011), dentro de los que se encuentran las proteínas: gp-12.5K, la "Adenovirus death protein" (ADP, según sus siglas en inglés), 6.7K, gp-19K y 14.7K y los receptores de internalización y degradación (complejo RID) (Wold y Horwitz, 2007). La familia de los ARNm tardíos codifica para productos relacionados con la producción y el ensamblaje de los componentes de la cápside. La unidad E4 codifica para disímiles funciones, como son, regular la transcripción y la traducción, mediar la salida del ARNm del núcleo, modular la replicación y la apoptosis (Benko, 2008).

II.1.3 Principales antígenos

Las proteínas de AdV que son útiles clínicamente son las tres proteínas de la cápside: el hexón, la base del pentón y la fibra. La mayoría de los epítopes reconocidos por los anticuerpos neutralizantes (AcNt) se encuentran contenidos dentro de estas proteínas. Se ha estimado que del 85 al 90% de los AcNt están dirigidos contra las regiones hipervariables del hexón (Figura II. 2) (Ebner *et al.*, 2005). Los epítopes de grupo y tipo- específicos están localizados en los lazos 1 y 2 y se conocen como determinante E. Los AcNt contra estos epítopes no impiden la unión y la entrada del virus a la célula, lo que sugiere que los Ac anti-hexón inhiben la replicación viral, después que estos pasos se han completados. Los epítopes responsables de la hemaglutinación se encuentran en la fibra y se les denomina determinantes I (Wold y Horwitz, 2007).

Infecciones experimentales en humanos, utilizando vectores adenovirales de replicación defectiva, muestran que la respuesta de Ac contra la fibra y la base del pentón tienen un efecto sinérgico en los ensayos de neutralización (Gahery-Segard *et al.*, 1998). Las diferencias de infectividad viral en la neutralización son la base para la clasificación de los diferentes serotipos, de este modo, un serotipo es definido tanto, cuando no exhibe reacción cruzada con otro, o cuando la proporción del título homólogo/heterólogo es mayor de 16.

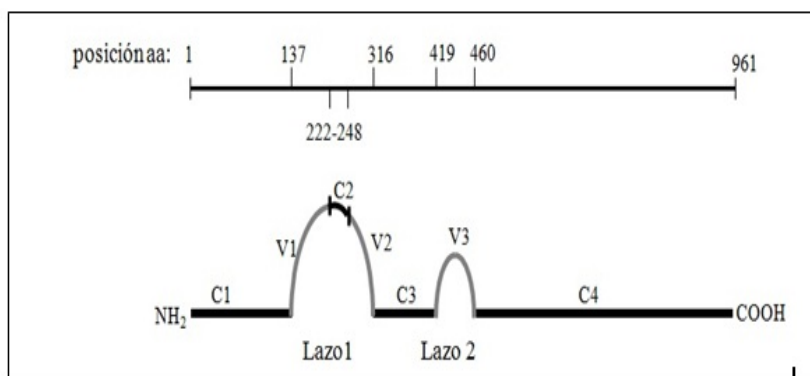


Figura II.2 Representación esquemática de la estructura del hexón de Adv-2
Fuente: Ebner *et al.*, 2005

Los antígenos que se encuentran en la superficie del virión son principalmente de tipo específico. La proteína del hexón se encuentra asociada a la neutralización, y la fibra a la neutralización e inhibición de la hemaglutinación. El antígeno específico de

género está localizado en la superficie basal del hexón, mientras que los antígenos serotipo-específicos están localizados en la parte superior del hexón (Harrach, 2008).

II.1.4 Propiedades biológicas

El rango de hospederos naturales de los AdV es usualmente confinado a una especie animal o a las estrechamente relacionadas (Harrach, 2008). Los AdV se ensamblan en el núcleo de la célula infectada y los cambios morfológicos se usan con propósitos de diagnóstico. Ellos incrementan la glucólisis en líneas celulares continuas e inducen en las células la producción de grandes cantidades de ácido. El redondeamiento de las células es causado por los componentes de la base del pentón (Figura II.3) (Wold y Horwitz, 2007).

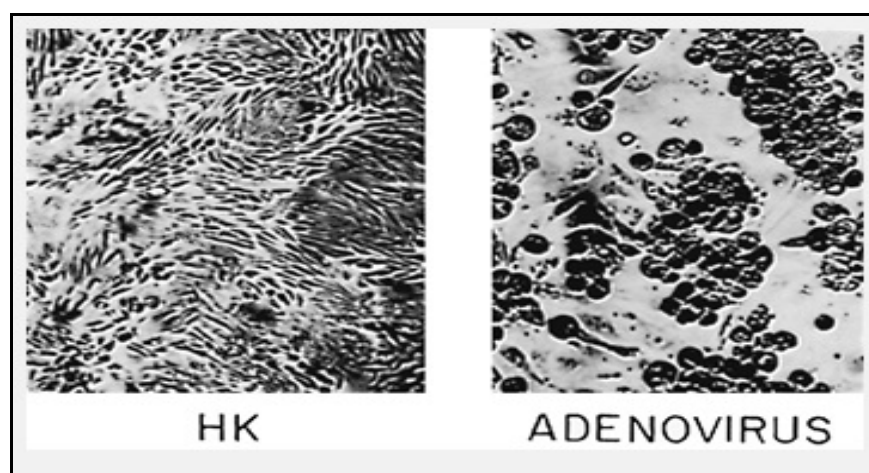


Figura II.3 Efecto citopático de AdV en cultivo de células de riñón humano.

HK: Control de células sin infectar (Fuente: Wold y Horwitz, 2007).

Los AdV por su característica de ser virus desnudos, son resistentes a los solventes orgánicos como el éter y el cloroformo, además son capaces de sobrevivir por largos períodos en medios líquidos o en superficies (Horwitz, 2001).

Los cambios nucleares después de la infección con las especies C y B incluyen alargamiento y aparición de inclusiones. Aunque estos cambios no son patognomónicos de la infección por AdV, son útiles para el diagnóstico histopatológico de biopsias y permiten diferenciarlos de otros agentes virales en cultivo de tejidos (Wold y Horwitz, 2007).

II.2 Agente infeccioso

II.2.1 Patogenia y patología

La infección por AdV causa inhibición del ADN celular, del ARNm y de la síntesis de proteínas. En cultivo, las células infectadas no muestran características típicas de apoptosis. Las células del epitelio respiratorio que son afectadas durante la neumonía contienen cuerpos de inclusión. Estas células son referidas como células "manchadas" (del inglés, smudge cells) y son muy útiles en el diagnóstico de los tejidos de biopsias y autopsias. No hay formación de sincitios ni células gigantes multinucleadas. Las células epiteliales son el objetivo primario de la citopatología *in vivo* (Wold y Horwitz, 2007). Los cambios inducidos a nivel de una célula, se reflejan en altos niveles de toxicidad del órgano durante la invasión tisular. Una de las proteínas estructurales, la base del pentón, que es sintetizada en exceso se une a las integrinas y causa el desprendimiento rápido de las células de la monocapa, sugiriendo el papel de esta proteína en la patogénesis (Nemerow *et al.*, 2009). Aunque en humanos no está definido este papel, esta proteína se ha encontrado en la sangre de individuos fallecidos con neumonía por AdV (Henquell *et al.*, 2009).

Los AdV establecen tres tipos de interacciones con las células del huésped. La primera es la infección lítica, que corresponde al ciclo replicativo del virus y da como resultado la muerte celular, con la liberación de los viriones. La segunda es la infección latente, que afecta principalmente las células linfáticas, libera una pequeña cantidad de virus y así causa una infección no evidente. Un tercer tipo de infección, no descrita en seres humanos, consiste en la integración del genoma de AdV al ADN celular y su posterior replicación sin la producción de viriones infecciosos, relacionado con la capacidad oncogénica del virus (Wold y Horwitz, 2007).

II.2.2 Entrada al hospedero

Dada la compleja estructura de la cápside de los AdV, no es nada sorprendente que la interacción del virus con la célula hospedera sea también compleja. La unión inicial a la célula hospedera esta mediada por la afinidad de la interacción del dominio globular de la fibra con el receptor celular, localizados en el epitelio bucal, nasofaríngeo y conjuntival, que son las tres vías de entrada de los AdV al humano (Smith *et al.*, 2010). Después de la unión al receptor, la entrada por endocitosis, está mediada por la interacción secundaria de la base del pentón con las integrinas. Este

evento se acompaña del desensamblaje parcial de la partícula viral, en la cual las proteínas de los vértices son liberadas en un ambiente acidificado por el endosoma (Nemerow *et al.*, 2009). Los eventos moleculares que tienen lugar en el desensamblaje de los AdV aun quedan por definir, pero se cree que la liberación de la proteína VI facilita la ruptura del endosoma, permitiendo la entrada de la partícula viral desencapsidada a través de los microtúbulos hasta el núcleo (Wiethoff *et al.*, 2005). Un factor clave que determina el tropismo de los AdV por los diferentes tejidos, lo constituyen los eventos iniciales de unión y entrada del virus a la célula hospedera mediada por los diferentes receptores (Arnberg, 2009).

II.2.2.1 Receptores celulares que median la entrada del virus

Receptor coxsackie-adenovirus (CAR, según sus siglas en inglés): pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y contiene dos dominios que varían en longitud dependiendo del grado de glicosilación (Tomko *et al.*, 1997) La principal función de estas proteínas, es promover la adhesión célula-célula mediante la formación de uniones estrechas entre las células epiteliales, creando homodímeros intracelulares (Fan *et al.* 2009). El CAR actúa como un receptor eficiente *in vitro* para todas las especies de los AdV, excepto para las especies B. (Roelvink *et al.*, 1998). Estudios realizados, muestran que la interacción entre los AdV y el CAR, se produce a través de los lazos de la fibra. La secuencia aminoacídica de estos lazos son conservadas dentro de los serotipos que utilizan este receptor y no existen en la especie B, que utilizan otro tipo de receptor (Nemerow *et al.*, 2009). Estudios estructurales y cinéticos revelan que hasta 3 moléculas de CAR pueden unirse a cada fibra creando interacciones de alta afinidad que facilitan la entrada del virus (Sharma *et al.*, 2011). El papel del CAR como un biomarcador y su relación con la carcinogénesis, se encuentra actualmente bajo investigación. Estudios muy recientes sugieren que elevados niveles de esta molécula están presentes en diversos tipos de cáncer (Stecker *et al.*, 2011; Dietel *et al.*, 2011), lo cual podría tener un impacto en su uso en la terapia de genes ya sea utilizando Ac contra CAR o utilizando ARN que repriman o silencien su expresión (Vindrieux *et al.*, 2011).

Factores de la coagulación: en el contexto de la terapia génica, desviar el tropismo de los vectores de AdV hacia el hígado, es crucial y al estudio de los mecanismos que rigen este fenómeno se dedican actualmente grandes esfuerzos (Zaiss *et al.*,

2011). El extremo terminal de la fibra y la depresión central del hexón son los sitios de unión a los factores IX, VII y X de la coagulación y a la proteína C4, que actúan como co-receptores (Jonsson *et al.*, 2009). A través de estos co-receptores, el virus se une a receptores lipoproteicos que se encuentran en la superficie de los hepatocitos, promoviendo una eficiente entrada del virus (Waddington *et al.*, 2008; Gimenez-Alejandre *et al.*, 2008). El grado de afinidad de estas uniones depende del serotipo y esta información resulta útil a la hora de estudiar el tropismo de la infección natural por los AdV y para seleccionar los serotipos útiles como vectores de expresión. (Hamdan *et al.*, 2011; Duffy *et al.*, 2012)

Lactoferrina: es una proteína del sistema inmune innato que usualmente actúa como un componente antibacteriano, antifúngico y antiviral (Onishi *et al.*, 2011). Investigaciones recientes demuestran que la lactoferrina se une al virión, por medio de una proteína que aun no se ha identificado y promueve la transducción de los AdV hacia las células del epitelio respiratorio haciendo de puente entre ella y la célula hospedera (García-Montoya *et al.*, 2012). La lactoferrina está presente en grandes cantidades en el fluido lagrimal y la mucosa respiratoria, lo cual es consistente con el tropismo ocular y respiratorio de las especies C, que la utilizan para la infección *in vitro* a través de mecanismos similares (Berlutti *et al.*, 2011).

CD46: perteneciente a la familia de las proteínas que regulan la activación del complemento, esta molécula se expresa en todas las células humanas nucleadas (Arnberg, 2009). Su función principal es proteger a la célula no infectada de la acción del complemento, sin embargo, es probable que actúe como un verdadero receptor para los serotipos de las especies B, (Gaggar *et al.*, 2003; Persson *et al.*, 2007). Para la mayoría de los miembros de esta especie la unión fibra-CD46 es de alta afinidad, excepto para los serotipos AdV-3 y AdV-7, donde la afinidad de estos es menor *in vitro* (Marttila *et al.*, 2005), lo que no descarta al CD46 como receptor de estos *in vivo* (Sirena *et al.*, 2005).

Acido siálico: es el nombre común de una amplia familia de sacáridos con más de 50 miembros, estos actúan en un gran número de procesos biológicos y están localizados al final de las cadenas de glicanos, que se encuentran en la superficie celular, haciendo fácilmente accesible a los patógenos su uso como receptor (Angata y Varki, 2002; Johansson *et al.*, 2007). Se postula que los AdV de la especie D,

particularmente los serotipos 8, 19 y 37, se unen al ácido siálico de la superficie celular mediante un mecanismo dependiente de la carga eléctrica (Nepomuceno *et al.*, 2007; Spjut *et al.*, 2011).

Integrinas: son proteínas que funcionan como receptores para varios patógenos (Luo, 2007). La interacción con los AdV se produce a través de la proteína de la base del pentón y aunque no se utilizan para la unión inicial del virus a la célula, son indispensables para la entrada de los AdV, independientemente de cuál sea el tipo de receptor que utilicen (Hall *et al.*, 2010).

Otros receptores: otras moléculas se han identificado como candidatos a receptores para la transducción de los AdV, entre ellas, la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I, según sus siglas en inglés) que es expresada en la superficie de las células β - linfoblastoides (Arnberg, 2009) y el sulfato de heparán que es una proteína multifuncional que se une a la superficie de las células humanas por diferentes vías, apoyando la infección de los AdV a las células epiteliales, particularmente de las especies C (Tuve *et al.*, 2009; Welch *et al.*, 2011). Otras dos moléculas, CD80 y CD86, las cuales son expresadas en las células dendríticas, se han identificado también como candidatos a receptores o co-receptores para las especies B (Short *et al.*, 2006).

II.2.3 Diseminación del virus dentro del hospedero

Desde el hallazgo inicial de los AdV en amígdalas y adenoides ha quedado claro que estos tejidos de la orofaringe son el sitio principal donde se inicia la replicación para la entrada de los AdV al humano. Para los AdV que causan infecciones del tracto respiratorio (ITR), la replicación probablemente ocurre en el epitelio respiratorio no ciliado, donde se localizan la mayoría de las manifestaciones clínicas (Lukashok y Horwitz, 2006). En ocasiones la infección viral puede extenderse hacia el pulmón. Un posible mecanismo que puede explicar esta diseminación, es que la proteína de la fibra, sintetizada en exceso y liberada durante la lisis, se une al CAR en la superficie basolateral, rompiendo los homodímeros e incrementando la permeabilidad celular en las uniones, facilitando la entrada del virus al tracto respiratorio inferior (TRI) (Walters *et al.*, 2002). Otra vía propuesta para la diseminación del virus a otros sistemas es la vía hematógica, considerada a partir del aislamiento del virus en la sangre de individuos con infecciones graves del tracto respiratorio (Wold y Horwitz,

2007). Dada la capacidad de los AdV de infectar los linfocitos (Garnett *et al.*, 2002; McNees *et al.*, 2004), la vía linfática, podría ser también otra de las rutas para el acceso del virus a otros órganos, como el miocardio (Baboonian *et al.*, 2003),

II.2.4 Latencia y persistencia

Los AdV fueron descubiertos precisamente por su capacidad de establecer infecciones latentes en el tejido adenoideo (Rowe *et al.*, 1953). El término de latencia implica que el genoma viral es mantenido dentro de la célula en un estado episomal (no integrado), donde ninguno o muy pocos genes son expresados (Wold y Horwitz, 2007). También los AdV pueden establecer infecciones persistentes con prolongados períodos de excreción, principalmente por vía fecal. Ambos tipos de infecciones complica la interpretación del virus en las muestras clínicas (Hoffman, 2009).

Mediante la detección del ADN viral, numerosas evidencias demuestran la capacidad de los AdV de mantenerse en el hospedero en amígdalas, adenoides, linfocitos, nódulos pulmonares y tejido ocular por largos períodos sin la producción de virus infecciosos (Wold y Horwitz, 2007; Kaneko *et al.*, 2008). Investigaciones que utilizan métodos cuantitativos de RCP, apoyan la latencia de los AdV, al menos de las especies C, en linfocitos, amígdalas y adenoides en el 80% de los casos analizados, con un pico de un 90% hasta los cuatro años que va decreciendo con la edad (Garnett *et al.*, 2002). Poco es conocido acerca de los mecanismos que mantienen el estado latente, donde el virus puede ser reactivado hacia una infección aguda o una infección persistente (Traylen *et al.*, 2011). Esta condición se considera un factor clave en la patogénesis de algunas enfermedades crónicas como la enfermedad pulmonar obstructiva en adultos fumadores, el asma bronquial y la miocardiopatía dilatada, después de una miocarditis por AdV (McNees *et al.*, 2004).

II.2.5 Respuesta inmune

La respuesta inmune innata es llevada a cabo fundamentalmente por neutrófilos, macrófagos y células asesinas naturales (NK, según sus siglas en inglés) y se asocia con la liberación de múltiples citoquinas y quimoquinas (Smith *et al.*, 2008; Vareille *et al.*, 2011), que incluyen, interleuquinas (IL)-1, IL-12, IL-6, IL-8, interferones y el factor de necrosis tumoral α (TNF, según sus siglas en inglés), cuyos niveles están relacionados con un pronóstico desfavorable en niños infectados (Teclé *et al.*, 2010).

Después de la infección primaria, son generados Ac especie- específicos (no neutralizantes) y tipo- específico (neutralizantes), los primeros son útiles para medir la respuesta del paciente a la infección. Los AcNt anti-fibra y anti-pentón bloquean la entrada del virus a la célula y los Ac anti-hexón previenen el desnudamiento y la entrada del ADN viral al núcleo (Wold y Horwitz, 2007). Aun después de una respuesta inmune exitosa, el hospedero puede seguir excretando virus intermitentemente por semanas y meses, después de la infección inicial. Esto demuestra que los AcNt, protegen al hospedero previamente infectado de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y de las reinfecciones con el mismo serotipo, pero no eliminan el estado de portador (Wold y Horwitz, 2007).

La respuesta inmune celular es mediada fundamentalmente por células T-CD4+ y por células T-CD8+, siguiendo un patrón de secreción de citoquinas de células T-cooperadoras tipo 1 (TH-1, según sus siglas en inglés) (Heemskerk *et al.*, 2005). Aunque se plantea que la respuesta humoral puede ser suficiente para anular la infección, la presencia de epítopes para las células T en la región conservada del hexón sugiere que ambas respuestas se generan durante el proceso infeccioso y por lo tanto una y otra son indispensables para la eliminación viral (Lenaerts *et al.*, 2008). Los AdV poseen estrategias que les permiten evadir la respuesta inmune del hospedero, de acuerdo a diferentes mecanismos que son llevados a cabo principalmente por proteínas codificadas por la región E3 (Kojaoghlanian *et al.*, 2003) como la gp19K y la 14.7K. Estos mecanismos incluyen: la inhibición del transporte de las moléculas MHC-I del retículo endoplasmático hacia la superficie celular; el no reconocimiento de las células infectadas por los linfocitos T- citotóxicos (CTL, según sus siglas en inglés) el bloqueo de factores que inducen apoptosis en la célula infectada y la inhibición de la síntesis de quimoquinas (Di Paolo *et al.*, 2009). La producción de interferón, es también contrarrestada por proteínas codificadas por el gen E1 que bloquean el ensamblaje de los factores inductores y apagan la síntesis (Gregory *et al.*, 2011).

Investigaciones en vectores adenovirales muestran que la respuesta inflamatoria inicial ocurre independientemente de la expresión de los genes virales y es desencadenada directamente por la interacción de las proteínas de la cápside con las integrinas de la superficie celular (Fu *et al.*, 2011). De esta manera, no está

totalmente esclarecido si el daño celular y las manifestaciones clínicas son producto de la propia infección o de la respuesta inmune del hospedero frente al patógeno (Gregory *et al.*, 2011).

II.3 Epidemiología

Las infecciones por AdV ocurren a nivel mundial, de forma endémica, esporádica y epidémica. De manera general estos patrones correlacionan bien con el serotipo viral y la edad de la población susceptible, que en el 80% de los casos suelen ser los niños menores de 4 años (Wold y Hortwitz, 2007). Aunque el hospedero tiene la capacidad de eliminar la infección generando una respuesta inmune potente, el hecho de que esta respuesta sea serotipo- específica, hace posible que individuos de todas las edades puedan infectarse con diferentes serotipos de AdV a lo largo de toda la vida (Lynch *et al.*, 2011). Para los hospederos con una respuesta inmune deficiente como los trasplantados, seropositivos al VIH (VIH+), individuos sometidos a quimio y radioterapia por cáncer, entre otros, se incrementa el riesgo de infecciones severas y diseminadas (Storsley y Gibson, 2011; Watcharananan *et al.*, 2011; Yaghibi *et al.*, 2011).

Las epidemias pueden ser de infección respiratoria, fiebre faringo-conjuntival, queratoconjuntivitis y gastroenteritis infantil. Estas pueden ocurrir durante todo el año, aunque habitualmente se observan durante el invierno y a principios de la primavera, en países donde se diferencian las cuatro estaciones (Kim *et al.*, 2003). Los serotipos 1, 2, 5 y 6 se aíslan con frecuencia de tejido nasofaríngeo y linfo-epitelial en niños menores de 5 años, mientras que los serotipos 3, 4 y 7 se asocian más frecuentemente a ITR superior en adultos (Cherry y Chen, 2009). Las infecciones provienen de dos fuentes principales, una exógena, a partir del contacto de personas sanas con secreciones respiratorias y oculares de individuos infectados, por la exposición a sangre y tejidos infectados, y también por el contacto con superficies, objetos e instrumentos oftalmológicos contaminados (Wold y Horwitz, 2007). La existencia de portadores asintomáticos, capaces de excretar el virus, durante largos períodos de tiempo, hacen de la trasmisión fecal-oral una importante vía de adquirir y diseminar al virus (Jones *et al.*, 2007). La otra forma importante de contraer enfermedades lo constituye la vía endógena, a partir de la reactivación de la latencia que los AdV establecen en el tejido linfoide, parénquima renal, tracto

gastrointestinal y otros tejidos después de una primera infección (Lion *et al.*, 2010). Más recientemente, el hallazgo del virus en el líquido amniótico de mujeres embarazadas y en aspirados traqueales de neonatos pre- términos, indican la posible transmisión vertical (Henquell *et al.*, 2009; Tsekoura *et al.*, 2010).

El período de incubación va de 2 a 14 días, dependiendo del serotipo viral y la vía de transmisión (Cherry y Chen, 2009). Las epidemias pueden extenderse rápidamente en poblaciones cerradas, en ambientes con poca higiene y hacinamiento, como unidades militares, becas, orfanatos, círculos infantiles, salas hospitalarias y unidades de cuidados intensivos, donde las medidas de control son esenciales para evitar la diseminación (Wold y Horwitz, 2007).

Los serotipos predominantes difieren de acuerdo a los países, regiones y localidades, su prevalencia cambia con el tiempo debido a la transmisión y al reemplazamiento de nuevas cepas. Existen diferencias notables en la distribución de los serotipos entre la población civil y militar. Por ejemplo en los EUA, durante el período 2004-2006 en la población civil, el AdV-3 estuvo implicado en el 34,6% de las ITR y los AdV-4 y 21, representaron el 4,8 % y 2 %, respectivamente. Sin embargo, en la población militar, se detectó el AdV-4 en el 92,8%, el AdV -3 en el 2,6% y el AdV- 21 en el 2,4% (Gray *et al.*, 2007). De manera interesante, entre el 2002 y el 2006 diversos serotipos de la especie B (AdV-3, 7, 14 y 21) emergieron como los serotipos predominantes entre la población militar de EUA, probablemente como resultado del cese de la vacunación (Metzgar *et al.*, 2007). De forma general, en los adultos, los serotipos implicados incluyen a las especies B (AdV-3, 7, 11, 16 y 21), C (AdV-1, 2, 5 y 6) y E (AdV-4) (Ermand *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2007; Houg *et al.*, 2010). Entre los niños, los serotipos más frecuentemente asociados a ITR son los tipos del 1 - 7 y el 11 (Baum, 2005; Lee *et al.*, 2010).

II.3.1 Prevención y Control de las Infecciones

Dado que el período de incubación de la enfermedad, puede ser de hasta 10 días y en muchos casos hay una excreción prolongada, la transmisión es favorecida entre individuos con contacto estrecho (Lesser *et al.*, 2009). Por ello, la prevención y el control de brotes epidémicos, están mediados básicamente por la educación a la población en las buenas prácticas de higiene, como el lavado frecuente de manos, tapado de la boca ante la tos y el estornudo. Siempre que sea posible, evitar la

aglomeración en cuartos de dormir y salas hospitalarias, que permitan una ventilación adecuada y evitar el empleo en común de medicamentos oculares, toallas, etc (Kunz y Ottolini, 2010).

II.4 Serotipos emergentes

Serotipo AdV-3. Este serotipo es uno de los más comunes causantes de ITR en niños y adultos, es también uno de los serotipos más aislados en los casos de conjuntivitis atribuible a los AdV (Chang *et al.*, 2008). Su prevalencia a nivel mundial es variable y es el serotipo predominante en muchas regiones. De manera importante, AdV-3 ha causado casos esporádicos y epidemias de enfermedad respiratoria con manifestaciones clínicas de extrema gravedad, con daño pulmonar residual y casos fatales en Corea (Lee *et al.*, 2010), Portugal (Rebelo-de Andrade *et al.*, 2010), el cono sur americano (Kajon *et al.*, 1996) y EUA (James *et al.*, 2007). A pesar de la relativa estabilidad de su genoma (Mahadevan *et al.*, 2010), se han descrito variantes genotípicas de este serotipo, como el recombinante AdV7/3 y la variante HAdV3a51, asociados a enfermedad severa (Rebelo de Andrade *et al.*, 2010; Lebeck *et al.*, 2009). Estas variantes confirman previos hallazgos de que el AdV-3, es un serotipo muy virulento y potencialmente letal, especialmente en niños (Landry *et al.*, 2009; Selvaraju *et al.*, 2011). También se han identificado nuevas variantes de AdV-3 en casos de enfermedades oculares como la queratoconjuntivitis epidémica (Imai *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2009; Kaneko *et al.*, 2011).

Serotipo AdV-7. Actualmente es uno de los serotipos más aislados a nivel mundial (Erdman *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010). Este serotipo parece ser el más virulento de todos, y numerosos informes pasados y recientes así lo documentan (Yamadera *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2011; Tang¹ *et al.*, 2011). La prevalencia de AdV-7 ha variado de acuerdo a la zona geográfica en diferentes momentos dependiendo de la cepa tipo, de la inmunidad poblacional y del contexto epidemiológico. Epidemias por este serotipo se han descrito en EUA, Canadá, China, Australia, Israel, Corea del Sur, Japón y América Latina, donde se ha destacado como causa de ITR y neumonías con elevados índices de muerte (Lynch *et al.*, 2011; Odivre *et al.*, 2011). Los brotes ocurren típicamente en marcos cerrados como barracas militares, hospitales, unidades neonatales y pediátricas.

Al menos 27 genomas tipo se han identificado por enzimas de restricción, los cuales cambian o reemplazan a los tipos predominantes (Gerber *et al.*, 2001). Los AdV-7c y 7b fueron los subtipos predominantes en los años 1960-70 en EUA, Europa y Australia, aunque durante esta década, también circularon los subtipos AdV-7d, 7e y 7f. En Argentina, un nuevo subtipo, el AdV-7h comenzó a circular durante los años 80 entre niños menores de 1 año, donde más de la mitad requirieron cuidados intensivos y la mayoría (10/16) murieron con neumonía multifocal y bronquiolitis necrotizante (Murtagh *et al.*, 1993). Esta nueva cepa, fue causante del 61.2% de las ITR por AdV en niños de Argentina y Uruguay de 1991- 1994 y responsable de 17 de las 18 muertes ocurridas (Kajon *et al.*, 1996). Esta cepa también fue reconocida en Brasil, donde reemplazó a la 7b (Moura *et al.*, 2007) y en EUA donde circuló junto a otros genomas tipo (Erdman *et al.*, 2002). Un nuevo genotipo, el AdV-7d2, fue detectado y caracterizado por primera vez en un centro hospitalario de Chicago y posteriormente extendido a otro con una severidad considerable y casos fatales entre los pacientes con afectación del personal médico (Gerber *et al.*, 2001).

Los mecanismos que sustentan la aparente "fortaleza" de algunos genomas de AdV-7, reflejada en su capacidad de reemplazar a otras cepas circulantes, permanecen en el campo de la especulación. Algunas posibles explicaciones incluyen la ocurrencia de mutaciones o recombinaciones que hacen más virulentas y patogénicas a estas cepas o cambios biológicos y antigénicos que amplifican la transmisión en comparación con las cepas anteriores. En conclusión, si estas nuevas cepas son realmente más virulentas, o si lo que sucede es que evaden mejor la respuesta inmune del hospedero, es una cuestión que requiere muchas investigaciones, lo que sí parece estar claro es que una simple mutación, como en AdV-7d2 o una recombinación, como en AdV-7h pueden generar nuevas cepas con un mayor potencial epidémico y tasas elevadas de muerte (Gray *et al.*, 2005).

Serotipo AdV-14. Llamado también "agente de Wit", se aisló por primera vez en Holanda, 1955 (Van der Veen y Kok, 1957) durante un brote de IRA en reclutas y posteriormente en brotes similares en Inglaterra (Kendall *et al.*, 1957), Uzbekistan (Bruj *et al.*, 1966) y Checoslovaquia (Mevzos *et al.*, 1966). Sin datos previos de su circulación en Norteamérica, este serotipo, emergió durante la primavera del 2006, causando brotes de severidad variable entre los reclutas y la población civil en

diferentes regiones de EUA, afectando individuos de todas las edades (CDC, 2007; CDC, 2010; Kajon *et al.*, 2010). En Europa, este serotipo se ha descrito como causa de IRA severa con casos fatales (33%) en niños irlandeses menores de 1 año, con requerimientos de ventilación mecánica y oxigenación extracorporeal (O'Flanagan *et al.*, 2011).

El análisis de la secuencia nucleotídica demuestra que este AdV-14, es una cepa nueva, claramente distinguible de la cepa de referencia (AdV-14p o Agente de Wit), nombrada AdV-14p1 sobre la base de los nuevos perfiles de restricción. Se sugiere que el origen de esta nueva cepa se deba a la recombinación entre la cepa patrón (AdV-14p) y una cepa de AdV-11 (Houng *et al.*, 2010). Esta nueva cepa contiene una delección de 6 pb en el gen de la fibra, que aunque no le confiere cambios fenotípicos sustanciales respecto a la original, perdió un epítipo neutralizante que la convierte en un mutante de escape (Carr *et al.*, 2011). Es decir, que es muy probable que la emergencia de esta cepa, se deba más a la diseminación de un agente infeccioso en una población inmunológicamente desprotegida que a la propia virulencia *per se* (Carr *et al.*, 2011).

II.5 Manifestaciones Clínicas de la Infección por los AdV

II.5.1 Infecciones del Tracto Respiratorio Superior (ITRS) e Inferior (ITRI)

La mayoría de los casos de ITR, se presentan inicialmente como una ligera enfermedad respiratoria que usualmente es auto limitada. En pacientes pediátricos, del 5 al 10% de todas las ITR son producidas por los AdV (Broor *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010). De manera usual los síntomas incluyen congestión nasal, tos, faringitis y amigdalitis que pueden acompañarse de manifestaciones sistémicas como fiebre, malestar general, dolor de cabeza y mialgia, también pueden aparecer síntomas gastrointestinales como vómitos, diarreas y dolor abdominal (Chang *et al.*, 2008). La severidad y extensión de los síntomas dependen del serotipo y del síndrome clínico. Aunque la mayoría de estas infecciones son benignas, pueden progresar a la severidad, causando Crup, bronquiolitis y neumonía (en ocasiones asociada con choque séptico) que puede ocurrir hasta en un 20% de niños pequeños donde pueden dejar secuelas que incluyen bronquiectasias y bronquiolitis obliterante (Callaway *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2011, Edmond *et al.*, 2012). El curso hacia una enfermedad respiratoria grave y fatal también se ha documentado durante brotes en

población adulta inmunocompetente, principalmente por los serotipos 4, 7 y 14 (Allibhai *et al.*, 2008; Jonhstone *et al.*, 2008; Kandel *et al.*, 2010). Más recientemente, las infecciones por AdV se han asociado con el síndrome de distres respiratorio agudo (SDRA) en adultos inmunocompetentes (Hakim y Tleyjeh, 2008).

En la población militar, los brotes de enfermedad respiratoria severa con frecuentes complicaciones que involucran al SNC se han descrito durante la última década (Metzgar *et al.*, 2007). Particularmente, estos brotes han sido producidos por los serotipos 4 (Russell *et al.*, 2006; Kajon¹ *et al.*, 2011) y 14, cuya tasa de ataque entre los nuevos reclutas asciende hasta un 80%, con un 20% de hospitalizaciones (Tate *et al.*, 2009).

Otra de las manifestaciones clínicas de las ITR por AdV es el Síndrome similar al pertusis (SSP). Este término se ha empleado para denotar los signos y síntomas indistinguibles de la tosferina, cuando no se puede demostrar la presencia de su agente causal, la *Bordetella pertussis* (Wold y Horwitz, 2007). El cuadro clínico se caracteriza por una tos intensa, paroxística con emesis y cianosis, con intervalos breves de apnea, característicos de la tosferina. Estas formas de pertusis se han llamado síndrome coqueluchoide o pertusoide y la asociación de los AdV con estos, se ha descrito en estudios epidemiológicos (Hong *et al.*, 2001; Herrera *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2011). De manera general, las ITR son producidas por los serotipos de las especie B (AdV-3, 7, 14), E (AdV-4) y C (AdV-1 y 2), estos últimos son los que se aíslan con mayor frecuencia y se consideran endémicos en muchas poblaciones, con prevalencias que van de un 4- 26% (Cooper *et al.*, 2000; Yeung *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Otros serotipos como los AdV-11 y 21, aunque con menor frecuencia, también se han responsabilizado con epidemias de ITR con casos de neumonías y complicaciones pulmonares (Gray *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2009; Kajon¹ *et al.*, 2010).

II.5.2 Infecciones Oculares

La conjuntivitis folicular aguda puede ocurrir como una entidad separada, o como parte de un síndrome respiratorio y entonces se denomina fiebre faringo -conjuntival (FFC). La FFC fue una de las primeras entidades clínicas descritas que se asoció con la infección por AdV como parte de un brote epidémico causado por el serotipo 3 (Bell, 1957). La enfermedad se presenta típicamente en niños, asociada a brotes en campamentos de verano, orfanatos y vecindarios residenciales, debido a la

exposición a piscinas contaminadas y condiciones de hacinamiento (Artieda *et al.*, 2009). La enfermedad puede ser bilateral y ambas conjuntivas (bulbar y parpebral) se ven comprometidas con una significativa linfadenopatía pre-auricular. El período de incubación es de 6 a 9 días, la enfermedad es leve y autolimitada con una recuperación completa y sin secuelas oftalmológicas (Kunz y Ottolini, 2010). Los AdV 3 y 7, son los principales serotipos que se han aislado, aunque los serotipos 1, 2, 4, 6, 8 y 15 también se han visto involucrados como agentes etiológicos (Artieda *et al.*, 2010; Mochizuki *et al.*, 2010)

A diferencia de la conjuntivitis folicular, que se limita a la conjuntiva, la queratoconjuntivitis epidémica (QCE) es una enfermedad mucho más seria y altamente contagiosa (Wold y Horwitz, 2007). Después de un periodo de incubación es de 8 a 10 días, la enfermedad se presenta con un inicio agudo de dolor, lagrimeo, fotofobia, inyección conjuntival, sensación de cuerpo extraño, edema, infiltrados epiteliales corneales e hipertrofia de los nodos linfáticos (Mandell *et al.*, 2009).

En los neonatos y niños muy pequeños, la dificultad de constatar dolor y fotofobia conlleva a un diagnóstico tardío trayendo como consecuencia la ocurrencia de brotes nosocomiales en unidades neonatales de cuidados intensivos (Chaberny *et al.*, 2003; Ishiko *et al.*, 2008). Brotes epidémicos de QCE, se han referido a nivel mundial (Sendra *et al.*, 2004; Ariga *et al.*, 2005; Hamada *et al.*, 2008), siendo los serotipos AdV-8, 19 y 37 los más frecuentemente aislados (Mejía *et al.*, 2008; Tabbara *et al.*, 2010). Otras variantes también se han descrito asociadas a QCE en pacientes que adquirieron la infección mediante procedimientos quirúrgicos con material contaminado (Engelmann *et al.*, 2006; Ishiko y Aoki, 2009). La enfermedad puede ser limitada, sin embargo, en ocasiones puede progresar a una queratitis, que puede persistir por meses y llevar a una disminución de la visión con un daño significativo de la córnea (Kunz y Ottolini, 2010; Omar *et al.*, 2010)

II.5.3 Infecciones en el tracto gastrointestinal (TGI)

Los AdV pueden causar manifestaciones en el TGI, aun cuando el sitio primario de infección sea el tracto respiratorio (Madisch *et al.*, 2006; Sdiri-Loulizi *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2011). La relación entre AdV y diarrea tiene una larga historia que aún no se ha esclarecido completamente. Debido a que ellos pueden replicarse eficientemente en el intestino y ser excretados en las heces, esto los hace fuertes

candidatos como agentes etiológicos (Wold y Horwitz, 2007). Sin embargo, el hallazgo de los AdV tanto en pacientes con diarrea, como en individuos asintomáticos hace difícil correlacionar el aislamiento con los síntomas clínicos. No obstante, la afinidad de los serotipos 40 y 41 por el TGI, documentada en numerosos estudios epidemiológicos, ha otorgado a estos serotipos la etiología de casos esporádicos y brotes de gastroenteritis infantil (Weitzel *et al.*, 2007; González *et al.*, 2011, Bicer *et al.*, 2011). Según datos publicados, la prevalencia de los AdV en la gastroenteritis infantil varía en los diferentes estudios, de acuerdo a la región. En Asia, por ejemplo, las tasas de detección fueron de un 8,7% en Corea, 5% en Japón y 2,8% en Vietnam (Li, *et al.*, 2005). En África, las tasas fueron de 2.6% en Tanzania (Moyo *et al.*, 2007), 5.5% en Túnez (Fodha *et al.*, 2006), 6.7% en Nigeria (Audu *et al.*, 2002), 28% en Ghana (Reither *et al.*, 2007) y 37.4% en Kenya (Magwalivha *et al.*, 2010). Además de los AdV-40 y 41, otros serotipos como AdV-31, 2, 3, 5 y 8 (Li, *et al.*, 2005; Leruez- Ville *et al.*, 2006) y algunos de las especies D, también se han aislado de niños con diarrea, estos últimos asociados a individuos VIH+ (Magwalivha *et al.*, 2010). Una nueva especie de AdV encontrada en un paciente con gastroenteritis, se describió por primera vez en EUA, este serotipo, denominado AdV-52, resultó ser serológicamente diferente y el análisis filogenético mostró una separación evidente del resto de los AdV conocidos (Jones *et al.*, 2007).

La invaginación intestinal, es otro de los síndromes que se asocia a la infección por los AdV (Wold y Horwitz, 2007). Los serotipos de la especie C (AdV-1, 2, 5 y 6) se han aislado en altos porcentajes de las heces y nodos linfáticos de pacientes con adenitis mesentérica e invaginación intestinal (Bhisitkul *et al.*, 1992; Lappalainen *et al.*, 2012). En estudios recientes, realizados en niños con este síndrome, la presencia de los AdV fue estadísticamente significativa respecto al grupo control en todos los casos (Okimoto *et al.*, 2011).

Los AdV se han vinculado a la enfermedad celiaca, una enfermedad autoinmune, etiológicamente relacionada con la ingestión de proteínas del grupo de las gliadinas, que se encuentran en el trigo, la cebada y el centeno (Wold y Horwitz, 2007). Las evidencias apuntan a que existe una homología estructural entre la proteína E1B- 55 KD de los AdV y la gliadina-A (proteína que activa la enfermedad celiaca). Resultados que confirman estas evidencias, muestran que los linfocitos-T de

pacientes enfermos reconocen a secuencias homólogas de péptidos sintéticos que comparten ambas proteínas, por lo que no se excluye que una infección previa con AdV, sea un factor importante en la evolución de la enfermedad (Plot y Amital, 2009).

II.5.4 Infecciones en el tracto urinario (TU)

La Cistitis hemorrágica aguda es una enfermedad que ocurre casi exclusivamente en los varones, caracterizada por una intensa hematuria, que se confunde regularmente con otras enfermedades del riñón como la glomerulonefritis. En pacientes inmunocompetentes, esta enfermedad es autolimitada y usualmente no se acompaña de otros síntomas (Wold y Horwitz, 2007). Básicamente, dos serotipos, los AdV-11 y 21 se han aislado de la orina de pacientes afectados (Yokose *et al.*, 2009), aunque otros serotipos como los AdV-3, 7, 34 y 35, también se han visto implicados (Echavarría, 2008; Sujeet *et al.*, 2011).

El serotipo AdV-11, puede permanecer latente en el parénquima renal hasta su reactivación en hospederos con inmunidad comprometida (Bil-Lula *et al.*, 2010). En este tipo de paciente, la enfermedad puede aparecer junto a otras manifestaciones como disuria y disfunción del injerto renal en el caso de trasplantados (Ison y Green, 2009; Ferreira *et al.*, 2009). Muchas infecciones son autolimitadas, sin embargo, pueden aparecer complicaciones como la nefritis intersticial necrotizante, fallo renal dependiente de diálisis, uropatía obstructiva, enfermedad diseminada (ED) y muerte (Mori *et al.*, 2003; Keswani y Moudgil, 2007; Storsley y Gibson, 2011).

II.5.5 Infecciones en el sistema nervioso central (SNC)

Aunque los AdV no se consideran virus neurotrópos y su aislamiento dentro del SNC es poco frecuente, el hallazgo de estos, provocando casos esporádicos y pequeños brotes de enfermedad neurológica, se ha documentado en la literatura, principalmente como causa de encefalitis y meningoencefalitis (Lema *et al.*, 2005; Wold y Horwitz, 2007). Estas enfermedades, suelen aparecer ocasionalmente como una complicación después de una IRA, tanto en pacientes de riesgo como en individuos inmunocompetentes. Los serotipos de la especie B, principalmente AdV-3 y 7 son los que con mayor frecuencia se han encontrado en tejido cerebral y líquido cefalorraquídeo (LCR) (Fianchi *et al.*, 2003; De Azevedo *et al.*, 2004).

Los AdV se han relacionado también a casos de edema cerebral (Chatterjee *et al.*, 2000), encefalopatías (Ohtsuki *et al.*, 2000) y otras enfermedades del SNC como la

mielitis transversa (Horwitz, 2001) y la parálisis flácida aguda, donde se plantea que ocurre por el daño celular del cordón anterior o neuropatía del plexo braquial o lumbosacro (Ooi *et al.*, 2003; Acosta *et al.*, 2008; Ivanova *et al.*, 2012).

Un estudio realizado para demostrar la asociación de los AdV a tumores cerebrales en pacientes pediátricos, mostró la presencia de ADN adenoviral en tejidos del SNC no tumorales, indicando por primera vez, la capacidad de estos virus de persistir en dichos tejidos después de una infección primaria (Kosulin *et al.*, 2007). Actualmente se describen varias rutas que explican acerca de cómo las partículas virales pueden acceder al cerebro. Estas vías pueden ser a través de la migración de los linfocitos infectados hacia el endotelio microvascular cerebral o mediante el paso de partículas virales libres entre o a través de las células endoteliales (Albright *et al.*, 2003).

II.5.6 Infecciones del miocardio

La Miocarditis viral aguda (MVA) es una enfermedad inflamatoria caracterizada por la necrosis de los miocitos y la infiltración de células inflamatorias (Wold y Horwitz, 2007). Los AdV junto a los enterovirus son los virus que comúnmente se identifican como productores de MVA. Mientras que los enterovirus inducen una fuerte respuesta inflamatoria, los AdV se dirigen directamente a los miocitos, transportados por los linfocitos que son infectados persistentemente durante la infección primaria y que escapan de la eliminación por el sistema inmune (Baboonian y McKenna, 2003). La presencia de receptores CAR en los miocitos, lo hacen susceptible a la infección por AdV (Xu *et al.*, 2010). Los niveles de expresión de CAR en los miocitos varían de acuerdo a la edad y a otras enfermedades cardíacas, donde son sobre-expresados, sugiriendo que individuos con miocardiopatías tienen una predisposición particular a la infección con este virus (Wu *et al.*, 2011; Yuen *et al.*, 2011).

Una vez en el miocito, el virus podría inducir apoptosis (Miyamoto *et al.*, 2009; Debiasi *et al.*, 2010), o causar una infección persistente, con una activación continua de la respuesta de células T, que iría en detrimento del hospedero causando daño en el miocardio (Camargo *et al.*, 2011). El efecto acumulativo de esta respuesta inmune constante es la destrucción de los miocitos que a corto plazo deterioran la función contráctil del músculo y a largo plazo conllevan a una remodelación de los miocitos restantes originando una miocardiopatía dilatada (Schultheiss *et al.*, 2006). Numerosas son las publicaciones que sustentan esta hipótesis, evidenciando que la

infección persistente por virus cardiopáticos, como los AdV, podría ser la causa o un componente que contribuye al curso de la miocarditis hacia la miocardiopatía dilatada (Calabrese *et al.*, 2002; Bowles *et al.*, 2003; Kuhl *et al.*, 2005).

II.5.7 Enfermedades asociadas al paciente inmunocomprometido

Las últimas tres décadas han sido testigo de la emergencia del SIDA y del incremento en el número de receptores de trasplantes, generando un alto número de pacientes inmunocomprometidos (Hoffman, 2009). Paralelamente, muchas referencias de las infecciones por AdV han aparecido en la literatura científica actual (Ison y Green, 2009, Lion *et al.*, 2010; Weigt *et al.*, 2011). Hoy los AdV son reconocidos entre los muchos patógenos que contribuyen al debilitamiento y a enfermedades que con frecuencia amenazan la vida del paciente inmunocomprometido (Echavarría, 2008; Ganzenmueller *et al.*, 2011). La incidencia de estas infecciones varía dependiendo de la edad y del tipo de población estudiada, del grado de inmunosupresión y de los métodos empleados para la detección del virus (Kojaoghlanian *et al.*, 2003).

II.5.7.1 Infección en receptores de trasplante de células hematopoyéticas:

La incidencia de la infección por AdV en este tipo de trasplante, se ha incrementado en los últimos años debido a la toma de conciencia acerca de este patógeno, los regímenes inmunosupresores cada vez más potentes, la elevada sensibilidad de los métodos diagnósticos y el seguimiento sistemático de estos pacientes (Ison, 2007; Jones *et al.*, 2011).

La incidencia publicada en los diferentes estudios es variable, de un 3 a un 47%, siendo de 2 a 3 veces más elevada en niños en relación a los adultos (Robin *et al.*, 2007; Neofytos *et al.*, 2007; Lion *et al.*, 2010). Factores de riesgo adicionales lo constituyen el trasplante alogénico, la reducción de células T, la compatibilidad del antígeno leucocitario humano (HLA, según sus siglas en inglés) y la enfermedad del injerto contra el huésped (Zheng *et al.*, 2008). La infección puede ser primaria (adquirida en la comunidad o nosocomial) o producto de una reactivación de virus latente (Wold y Horwitz, 2007). Los serotipos más frecuentes entre estos trasplantados incluyen a la especie C (AdV-1, 2 y 5), A (AdV-31) y B (AdV-11, 34 y 35). Estos son detectados usualmente dentro de los primeros 100 días del trasplante y las manifestaciones clínicas van desde leves, autolimitadas hasta la ED y la muerte

(Al Qurashi *et al.*, 2011). En muchos pacientes la enfermedad es localizada (gastroenteritis, ITU, ITR), pero la diseminación ocurre entre el 10 y el 30% de los casos, con una tasa de mortalidad de hasta un 26% de forma general, pero que puede ser mucho más elevada en los casos de neumonía (73%) y de ED (61%) (Weigt *et al.*, 2011). La mortalidad se correlaciona con un aumento en la carga viral en plasma, linfopenia severa, aislamiento viral en más de un sitio y enfermedad severa del injerto contra el huésped. La cuantificación del ADN viral por RCP en tiempo real (RCP-TR) podría ser útil en la identificación de pacientes con riesgo de diseminación con fines terapéuticos (Anderson *et al.*, 2008; Hanley *et al.*, 2011).

II.5.7.2 Infecciones en receptores de trasplante de órganos sólidos

En estos pacientes el sitio primario de infección está usualmente relacionado con el órgano trasplantado (Ison y Green, 2009). Los datos de incidencia de estas enfermedades son mucho más limitados respecto a los receptores de trasplante de células hematopoyéticas, pero se conoce que algunas de las manifestaciones clínicas descritas para los receptores de pulmón, hígado, riñón e intestino incluyen neumonía, hepatitis nefritis, cistitis hemorrágica, enteritis y ED (Hoffman, 2009; Mayeur *et al.*, 2012). Las infecciones de mayor severidad se describen en la población pediátrica, y los factores de riesgo comprenden además de la edad, la presencia de Ac anti-linfocíticos en el receptor y el estatus serológico donante positivo/receptor negativo (Echavarría, 2008). En los receptores de hígado, los AdV causan típicamente ictericia, hepatomegalia y hepatitis. La incidencia en pacientes pediátricos oscila entre un 4 y un 10%, con una tasa de mortalidad de hasta un 53%. Los serotipos que habitualmente se asocian pertenecen a la especie C (AdV-1, 2 y 5) (Humar *et al.*, 2005).

El riñón fue uno de los primeros órganos trasplantados y la infección por AdV fue reconocida muy pronto a partir de entonces. En estos receptores, el signo predominante es la cistitis hemorrágica aguda y la nefritis, y con menor frecuencia la hepatitis y la neumonía con una tasa de mortalidad de un 17%. Los AdV de la especie B, serotipos 7, 11, 34 y 35 han predominado entre estos pacientes. Estudios realizados sugieren que en algunos pacientes la infección puede ser adquirida a través del órgano o por la reactivación de virus latente (Hoffman, 2009). Debido a que el diagnóstico virológico puede no ser inmediato, los pacientes son tratados por

rechazo del órgano y la inmunosupresión es reforzada, creando un círculo vicioso que puede terminar en ED y muerte. (Kojaoghlanian *et al.*, 2003).

En los pacientes pediátricos, receptores de trasplante de corazón, el riesgo para la pérdida del órgano y el desarrollo de enfermedades coronarias se incrementó con el hallazgo de AdV en biopsias endomiocárdicas realizadas posterior al trasplante (Moulik *et al.*, 2010). En cuanto a los receptores de pulmón, la infección está asociada con fallo respiratorio que conlleva a la muerte o pérdida del injerto (Doan *et al.*, 2007). En estos pacientes la infección respiratoria tiende a progresar muy rápidamente, desde el punto de vista clínico y radiológico, con índices de mortalidad de un 33-80% (Tebruegge y Curtis, 2010) En un estudio realizado por Ogori y colaboradores, los AdV se detectaron en un 1.3%, sin embargo, en la totalidad de los casos positivos, los pacientes desarrollaron manifestaciones severas como hemorragia y neumonía necrotizante, falleciendo dentro de los 45 días de trasplantados (Ogori *et al.*, 1995). En otro estudio, los AdV se encontraron en 8 de 19 niños investigados (42%), de estos dos murieron rápidamente y el resto sufrió bronquiolitis obliterante y pérdida del órgano (Bridges *et al.*, 1998). Estos datos demuestran que aunque la prevalencia no sea tan elevada, los AdV, aportan una carga significativa a las complicaciones en el paciente trasplantado, que contribuye a la pérdida del injerto y a su mortalidad (Ison y Green, 2009).

II.5.7.3 Infecciones en el paciente VIH/SIDA

Los AdV se han aislado de individuos VIH+ desde el comienzo de la epidemia del SIDA, asociados con neumonía, hepatitis, meningoencefalitis, nefritis, trastornos gastrointestinales y ED, que puede ser fatal (Echavarría, 2008). La asociación directa de la infección por AdV con la enfermedad, es a veces difícil de establecer debido a las coinfecciones con otros microorganismos, como bacterias y hongos, que son frecuentes en estos pacientes. El riesgo de infección para estos pacientes es de 28 en un año, 17 si el conteo de células CD4 $>200\text{mm}^3$ y 38 si el conteo es $< 200\text{mm}^3$ (Kojaoghlanian *et al.*, 2003).

A diferencia de los pacientes trasplantados, donde los serotipos aislados pertenecen principalmente a las especies B y C, en los pacientes VIH+ las especies y serotipos son diversas y características del sitio de aislamiento (Ferreira *et al.*, 2010). El sitio más común de aislamiento es el tracto gastrointestinal (hasta un 30%) con un

marcado predominio de las especies D (serotipos 9, 17, 20, 22, 23, 26, 27 y 42-51) que son excretadas por meses o años después de la infección inicial (Curlin *et al.*, 2010). Esto demuestra que existe una colonización persistente de estas cepas, que puede ser asintomática, pero que en algunos estudios se asocia a la ocurrencia de cuadros diarreicos agudos y crónicos, que de forma corriente afectan al paciente VIH+. Estos trastornos son el reflejo de una ineficiente respuesta inmune de los linfocitos T citotóxicos y del debilitamiento de los mecanismos TH-1 (Lord *et al.*, 2000).

Los AdV también son detectados entre un 2 y un 20% en la orina de individuos VIH+, que habitualmente son asintomáticos. La excreción puede abarcar períodos de hasta un año sin cambio en los perfiles de restricción dentro del mismo serotipo, lo que sugiere que esta prolongada excreción es sustentada a expensas del fallo de la respuesta inmune celular para eliminar la infección primaria (Echavarría, 2008).

II.6 Diagnóstico virológico y caracterización

El método de diagnóstico depende del tipo de enfermedad y de la muestra obtenida y primariamente se realiza por métodos directos, como el aislamiento viral en cultivo celular, la detección de antígeno y la detección del genoma (Mahony, 2008; Pavia, 2011). La microscopía electrónica puede ser útil, pero no es empleada de manera habitual en la práctica. El diagnóstico indirecto usando la serología es limitado debido a la falta de sensibilidad, la respuesta heterotípica o la producción inadecuada de anticuerpos, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Normalmente la serología se utiliza para investigaciones epidemiológicas o para confirmar la asociación entre la detección viral y manifestaciones clínicas inusuales (Kaufman, 2011).

El aislamiento viral en cultivo celular es la “regla de oro” y se utiliza ampliamente en las muestras respiratorias y de heces con buenos resultados, aunque tiene baja sensibilidad para otras muestras como las de sangre. Su principal inconveniente es que puede tomar hasta 28 días y depende de la viabilidad viral y de la presencia de sustancias inhibitoras del crecimiento en la muestra clínica (Cherry y Chen, 2009). Los AdV crecen bien y producen efecto citopático en una amplia variedad de células epiteliales humanas, normalmente se emplean líneas celulares continuas como HeLa, HEP-2, KB, A-549 y muchas otras. Los virus aislados, pueden ser identificados

mediante inmunofluorescencia, ensayos inmunoenzimáticos, aglutinación en látex o utilizando métodos moleculares (Benko, 2008; Pabbaraju et al, 2011).

La inmunofluorescencia a partir de la muestra clínica es un método rápido que emplea anticuerpos monoclonales o policlonales contra el antígeno del hexón. La sensibilidad varía de un 75 a un 90% en niños, pero es considerablemente baja en adultos (Cherry y Chen *et al.*, 2009). Otros métodos rápidos son los radioinmunoensayos y las técnicas de ELISA, ambos aunque muy específicos (> 95%), son menos sensibles que el cultivo celular (Pavia, 2011)

El desarrollo y aplicación de los métodos moleculares, usando la amplificación del ADN, han incrementado ostensiblemente la sensibilidad y rapidez del diagnóstico virológico con la ventaja de que no es necesario que el virus esté viable y que la carga viral en la muestra puede ser baja (Wu y Tang, 2009). La utilidad y aplicación de estos métodos, especialmente la RCP, ya sea en plataformas simples (Sarantis *et al.*, 2004; Metzgar *et al.*, 2005) o múltiples (Coiras *et al.*, 2004; Mahony *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009) se ha desarrollado significativamente en los últimos años. Los cebadores más utilizados son generalmente de las regiones de los genes del hexón, la fibra y los VA-ARN, por ser las zonas más conservadas entre los serotipos, lo que impone un reto debido al alto grado de heterogeneidad de las cepas (Xu *et al.*, 2000). Dos tipos de métodos de RCP pueden ser usados, la RCP convencional, la cual es un ensayo cualitativo y requiere de 1 o 2 días y la RCP-TR, que puede ser cualitativa o cuantitativa con resultados disponibles en pocas horas (Huang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Ambos procedimientos, son ampliamente utilizados en el diagnóstico de rutina, principalmente en muestras respiratorias (Metzgar *et al.*, 2005) y oculares (Banik *et al.*, 2005; Ochiai *et al.*, 2007). Los métodos moleculares, aunque costosos, han mostrado ser un instrumento útil y de gran sensibilidad (Ebner *et al.*, 2005; Perlman *et al.*, 2007), especialmente en el diagnóstico de infecciones que afectan al paciente inmunocomprometido (Heim, 2011). Mediante ensayos cuantitativos es posible realizar el seguimiento la carga viral en el tiempo, para definir si la infección es latente o activa, escoger el momento oportuno para el inicio de un tratamiento determinado y además medir su eficacia (Lion *et al.*, 2003; Erad *et al.*, 2007; Lion *et al.*, 2010). A pesar de todas estas ventajas, muy pocos se encuentran disponibles comercialmente, debido a la gran cantidad de cebadores y sondas que deben ser

diseñados y a las numerosas muestras que se requieren para validarlos (Damen *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011).

La caracterización en especies y serotipos, puede hacerse por neutralización, pero esta prueba además de ser laboriosa y consumir mucho tiempo, necesita de antisueros específicos para cada serotipo. También puede realizarse a partir de la muestra clínica por RCP convencional, seguido de la secuenciación nucleotídica (Sarantis *et al.*, 2004; Lu y Erdman, 2006; Casas *et al.*, 2005; Madisch *et al.*, 2006) o a partir de aislamientos por RCP (Xu *et al.*, 2000; Metzgar *et al.*, 2007) o combinado con el análisis de los fragmentos generados por restricción enzimática (Allard *et al.*, 2001). La RCP-TR múltiple, también se ha utilizado con mucho éxito a partir de ambas fuentes (muestras y aislamientos) (Metzgar *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2011). Para caracterizar el serotipo en los diferentes genomas tipo, existe un sistema de clasificación basados en el análisis de los patrones de restricción del ADN genómico, el cual usa la enzima Bam HI para definir "tipo" y los diferentes genomas tipo son denotados con un carácter, por ejemplo "p" para la cepa prototipo y el resto ("a" - "k") para los genomas tipos seguidos de números arábigos para los patrones de restricción con otras enzimas seleccionadas. (Li y Wadell, 1996).

II.7 Opciones terapéuticas

Las enfermedades que los Adv pueden causar en el humano, son generalmente de corta duración con consecuencias mínimas a corto plazo, y no justifican el desarrollo de antivirales. Sin embargo, en los individuos inmunocomprometidos un antiviral efectivo puede tener un impacto considerable en la morbilidad (Lenaerts *et al.*, 2008). Los mecanismos de evasión, el número elevado de serotipos y las variadas manifestaciones clínicas, no han facilitado establecer un tratamiento contra los Adv. Aunque hay muchos análogos de nucleósidos que inhiben su replicación *in vitro*, pocos parecen ser efectivos contra la enfermedad *in vivo* (Morfin *et al.*, 2009; Paolino *et al.*, 2011). Hasta el momento los estudios realizados son insuficientes y no han permitido llegar a conclusiones. El bajo nivel de estandarización y la falta de un verdadero modelo animal, ha complicado la evaluación y valoración de la actividad antiviral (Hoffman, 2009). No obstante, dos fármacos se han utilizado en la terapia contra la infección.

Fármacos:

La ribavirina, un análogo de la guanosina, con una actividad antiviral reconocida, cuyo mecanismo de acción es inhibir la polimerasa viral e incrementar las mutaciones en el "nuevo" ADN sintetizado. El efecto adverso más común es la anemia leve. Éxitos en su utilización se describen en pacientes con cistitis hemorrágica, neumonía, hepatitis y enteritis después del trasplante (Gavin *et al.*, 2002; Graci *et al.*, 2006, Homma *et al.*, 2008). Sin embargo, en pacientes con ED la terapia ha fallado (La Rosa *et al.*, 2001; Lankester *et al.*, 2004; Stock *et al.*, 2006). La diferencia en la sensibilidad de los diferentes serotipos a este compuesto, podría explicar la variabilidad en los resultados (Hoffman, 2009).

Más promisorios, son los resultados con el cidofovir, un análogo de la citosina, el cual inhibe a la polimerasa viral y muestra un amplio espectro de actividad *in vitro* frente a muchas cepas de AdV (Darr *et al.*, 2008; Morfin *et al.*, 2009). Informes de casos y pequeños estudios de su uso en trasplantados, reflejan buenos resultados en enfermedades como la neumonía, la encefalitis, los trastornos gastrointestinales y la hepatitis, describiéndose una disminución en la ED y la mortalidad (Yusuf *et al.*, 2006, Neofytos *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2008). Su efecto es aun mejor cuando se emplea tempranamente en la infección de receptores de alto riesgo, ya que la terapia tardía y una elevada carga viral están asociadas a una escasa respuesta (Nichols *et al.*, 2008). El uso más amplio del cidofovir se ha visto limitado por sus efectos adversos que incluyen nefrotoxicidad, supresión de células mieloides y uveítis, por lo que su aplicación requiere de un estricto seguimiento de la función renal en los pacientes tratados (Morfin *et al.*, 2009).

Estrategias de Terapia preliminar:

La base de esta terapia, consiste en aplicarla antes de que se instalen los síntomas clínicos. Se ha observado que la ED por AdV puede estar precedida por un período de viremia asintomática (Lion *et al.*, 2003). La progresión a la enfermedad y al curso fatal, está determinado por la respuesta inmune del hospedero y la virulencia o tropismo de la cepa viral. Por lo tanto, la iniciación temprana de esta terapia puede ser útil para controlar la replicación viral antes que la respuesta inflamatoria y la enfermedad sean desencadenadas (Hoffman, 2009). Muchas investigaciones documentan los beneficios de esta estrategia en términos de mejora clínica y

disminución de la mortalidad (Symeonidis *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2008). Aunque no se han hecho estudios controlados, el uso de esta terapia con cidofovir es común en muchos hospitales (Echavarria *et al.*, 2008).

Inmunoterapia:

El hecho de que la reconstitución de los linfocitos desempeñe un papel clave en la eliminación de la infección y la supervivencia del hospedero, justifican el uso de terapias que mejoren la recuperación inmunológica (Fujita *et al.*, 2008). Su principio se basa en la administración de leucocitos del donante al receptor (Fujita *et al.*, 2008), otros grupos desarrollan CTL específicos para AdV (Chatziandreou *et al.*, 2007; Feuchtinger *et al.*, 2008). Aunque la generación de células T específicas es muy costosa y requiere una labor intensa, su aplicación podría ser muy beneficiosa teniendo en cuenta que induce una reactividad cruzada contra todos los serotipos (Fuji *et al.*, 2011).

II.8 Vacunas

Hasta el momento no existe ninguna vacuna disponible cuyo uso esté aprobado en la población civil. En la década de los años 70, una vacuna oral de virus vivo contra los serotipos 4 y 7, se introdujo en la población militar (Top *et al.*, 1971). Esta tuvo un impacto significativo en la reducción de la morbilidad y la mortalidad dentro de esta población, que históricamente es azotada por grandes epidemias con elevados índices de neumonía severa y casos fatales (Russell *et al.*, 2006). La producción de esta vacuna cesó en el año 1996, lo que trajo consigo el resurgimiento de brotes que hasta hoy afectan en grandes proporciones al personal militar durante los entrenamientos (Jeon *et al.*, 2007; Potter *et al.*, 2012) y que pueden extenderse a la población civil (Trei *et al.*, 2010).

En el año 2011, una nueva vacuna viva oral fue aprobada y licenciada en la población militar de 17 a 50 años, esta vacuna indicada para la inmunización activa contra los serotipos 4 y 7, tuvo una buena tolerancia, altos niveles de seroconversión y la excreción del virus se constató hasta el día 28 después de su inoculación en personal militar donde se desarrollaron los ensayos clínicos (Lyons *et al.*, 2008). La presentación de la vacuna es en forma de dos tabletas recubiertas que deben ser ingeridas íntegramente para garantizar una replicación selectiva en el tracto gastrointestinal, y que estimule niveles de AcNt suficientes para combatir la infección

en el tracto respiratorio. Esta vacuna está contraindicada en embarazadas y su efectividad y seguridad no se ha evaluado en individuos inmunocomprometidos. Como precaución los vacunados deben evitar el contacto estrecho con niños menores de siete años, e individuos con inmunosupresión debido al riesgo que presupone la excreción de virus vivo posterior a la vacunación (Lyons *et al.*, 2008).

III. MATERIALES Y METODOS

Los materiales y métodos de este trabajo, serán descritos de acuerdo a los objetivos específicos planteados para llevar a cabo la investigación. La metodología general empleada se ilustra en la figura III.1. Las particularidades de cada una de estas metodologías se describen a continuación en el texto.

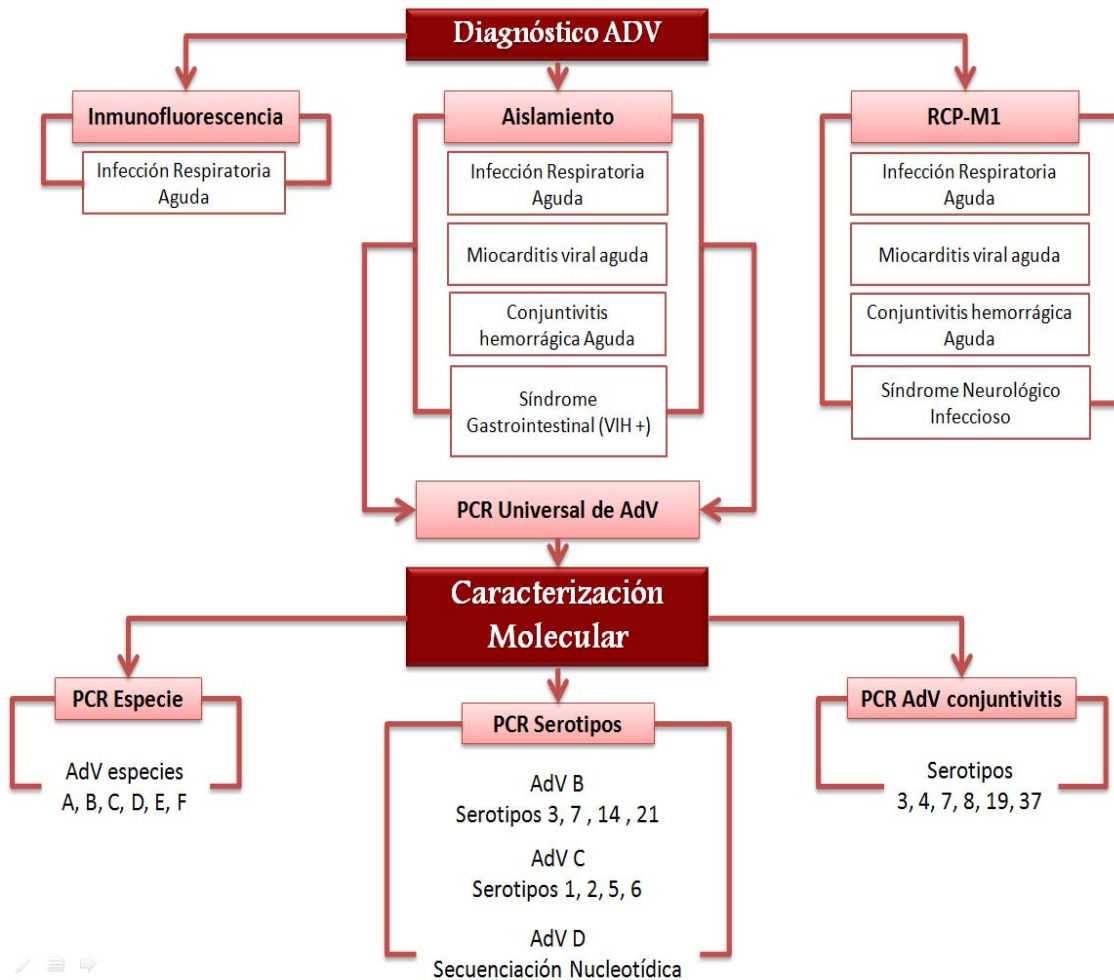


Figura III.1 Metodología general empleada en la investigación.

III.1 CARACTERIZAR LA INFECCIÓN POR ADENOVIRUS EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA.

III.1.1 Tipo de estudio: Descriptivo de serie de casos

III.1.2 Universo de Estudio: Se incluyeron todas las muestras provenientes de la vigilancia epidemiológica de pacientes con diagnóstico clínico de IRA, recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios (LNRVR) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK) a las cuales se les realizó un diagnóstico virológico confirmatorio de virus respiratorios, durante el periodo comprendido entre los años 2000-2008. Se excluyeron las muestras recibidas a las que por falta de disponibilidad de reactivos o malas condiciones de la muestra, no se les realizó ningún tipo de diagnóstico virológico.

III.1.3 Muestras y población de estudio.

- Muestras

Se analizaron un total de 1200 muestras de pacientes con diagnóstico clínico de IRA, la distribución anual y mensual de las muestras, se reflejan en la tabla III.1

Tabla III.1 Distribución de las muestras investigadas, según meses y años (2000-2008)

Años	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Totales
2000	0	0	0	0	0	1	0	0	23	27	9	2	62
2001	0	0	0	0	2	9	7	0	0	8	4	7	37
2002	0	0	0	0	0	8	21	8	10	11	0	0	58
2003	0	2	0	1	0	3	0	0	8	43	14	5	76
2004	1	11	14	5	3	3	2	1	10	16	25	9	100
2005	5	0	0	0	1	15	23	3	6	13	11	7	84
2006	1	2	1	6	3	3	66	2	87	90	60	56	377
2007	19	13	7	12	1	0	8	8	70	10	17	0	165
2008	0	1	29	8	13	22	11	12	48	62	14	21	241
Totales	26	29	51	32	23	64	138	34	262	280	154	107	1200

Fuente: LNRVR, IPK

- Tipo de muestra

Exudados nasofaríngeos (n=1050), lavados faríngeos (n=121), aspirados bronquiales (n=13), LCR (n=1), líquido pleural (n=1), lavado broncoalveolar (n=1) material de necropsia (pulmón y corazón) (n= 13).

- Procedencia de las muestras

Fueron analizadas muestras procedentes de diferentes hospitales y centros provinciales de higiene y epidemiología de las tres regiones del el país.

Región occidental (Pinar del Río, La Habana, Artemisa, Mayabeque, Matanzas e Isla de la Juventud): 762

Región central (Villa Clara, Cienfuegos, Sancti Spíritus, Ciego de Ávila y Camagüey): 229

Región oriental (Granma, Holguín, Las Tunas, Santiago de Cuba y Guantánamo): 209

- Pacientes

a) Edad y Sexo: Se constituyeron cuatro grupos (Tabla III.2), Grupo I: niños menores de un año (< 1 año); Grupo II: niños entre uno y cuatro años (1-4 años); Grupo III: niños entre cinco y quince años (5-15 años) y Grupo IV: adultos mayores de quince años (>15 años).

Tabla III.2 Pacientes con diagnóstico clínico de IRA, según edad y sexo (2000-2008)

Sexo*		Edades			
F	M	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
510	680	498	191	214	297

Fuente: LNRVR, IPK. * en 10 casos, no fue posible conocer el dato.

b) Datos clínicos

- Localización de la infección y hospitalizaciones

Para realizar una valoración del grado de severidad de la IRA, los pacientes se dividieron atendiendo a la localización de la infección (Tabla III.3), en infecciones del tracto respiratorio superior (ITRS) e infecciones del tracto respiratorio inferior (ITRI). Dentro de las ITRS, se consideraron la rinofaringitis y la faringoamigdalitis (resfriado común) y dentro de las ITRI, la neumonía, la bronquiolitis, el crup viral y el síndrome similar al pertusis (SSP). Del total de muestras 800 pertenecieron a pacientes ambulatorios y 400 a hospitalizados.

Tabla III.3 Distribución de las muestras en pacientes con ITRS e ITRI de acuerdo a la edad y número de hospitalizaciones (2000-2008).

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Hospitalizados
ITRS (n=640)	60	106	196	278	38
ITRI (n=560)					
Neumonía (n=29)	12	5	1	11	17
Bronquiolitis (n=277)	254	23	0	0	210
Crup (n=203)	141	40	14	8	108
SSP (n=51)	31	17	3	0	27
Totales	498	191	214	297	400

Fuente: LNRVR, IPK.

- Casos de pacientes fallecidos

Durante el periodo de estudio, se analizaron muestras de un total de 14 pacientes fallecidos con diagnóstico clínico de IRA (Tabla III.4). Solamente en uno de los pacientes (caso 7) se refirió una condición inmunosupresora debido a la aplicación de quimioterapia por padecer cáncer hepático. Todos los pacientes habían sido tratados con antibióticos.

Tabla III. 4 Pacientes fallecidos con IRA, según datos clínico-demográficos (2000-2008).

Casos	Año	Edades	Presentación clínica	Provincia de procedencia
1	2002	3m	Bronquiolitis	Cienfuegos
2		9años	Bronquiolitis	Santiago de Cuba
3	2005	3m	Neumonía hemorrágica	Santiago de cuba
4		9años	IRA-Síndrome bajo gasto	Ciudad Habana
5	2006	16 años	Neumonía hemorrágica	Ciudad Habana
6		17 años	Neumonía-DR	Santiago de Cuba
7		52 años	Neumonía-CS-ED -SNC	Ciudad Habana
8		23 días	Neumonía	Cienfuegos
10		25 años	Neumonía-DR	Santiago de Cuba
11		56 años	Neumonía-DR-Miocarditis	Las Tunas
12	2008	2 años	IRA-compromiso SNC	Holguín
13		12 años	IRA-Edema pulmonar	Ciudad Habana
14		2 años	Neumonía	Santiago de Cuba
15		25 días	IRA	Santiago de Cuba

Fuente: LNRVR, IPK. DR: distres respiratorio, CS: choque séptico, ED: enfermedad diseminada, SNC: sistema nervioso central.

- Datos epidemiológicos

Casos esporádicos y brotes epidémicos

Se estudiaron un total de 979 muestras procedentes de casos esporádicos y 221 muestras de 42 brotes epidémicos, de estos 15 de origen comunitario y 27 ocurridos en colectivos cerrados (círculos infantiles, escuelas, unidades militares, hogares de ancianos e impedidos físicos).

- Condiciones ambientales

Para el estudio de la estacionalidad se tomó en cuenta además de la frecuencia de la infección por meses, otros parámetros meteorológicos como la temperatura y las precipitaciones (Tabla III. 5). También se analizó la ocurrencia de huracanes y su correlación con los porcentajes de infección.

Tabla III.5 Valores promedios mensuales de temperaturas y precipitaciones (2000-2008)

Meses	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun
Temperatura (°C)	20.60	21.84	22.80	23.65	24.94	25.76
Precipitaciones (mm)	65.98	65.51	88.86	99.84	399.99	624.42
Meses	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Temperatura (°C)	26.14	26.13	25.71	24.79	22.69	21.91
Precipitaciones (mm)	467.26	399.62	520.33	509.55	115.09	108.65

Fuente: Instituto de Meteorología

Durante este periodo, el país resultó afectado por el paso de huracanes. El número y los meses de ocurrencia de estos eventos, se muestran en la tabla III.6.

Tabla III.6 Ocurrencia anual de huracanes, según meses y años, Cuba (2000-2008)

	Años								
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
No. de huracanes	1	1	2	0	2	5	0	0	3
Meses	Ago	Oct	Sep		Ago Sep	Jun Jul Ago Sep Oct			Ago Sep Nov

Fuente: Instituto de Meteorología.

III.1.4 Metodología empleada

III.1.4.1 Diagnóstico de la infección por adenovirus

En este acápite se refieren todos los métodos utilizados que permitieron realizar el diagnóstico de la infección por AdV. La aplicación de uno u otro método dependió de la disponibilidad de recursos en el laboratorio y de la introducción y desarrollo de nuevos métodos más sensibles, como fue el diagnóstico molecular. Para su procesamiento, todas las muestras se utilizaron directamente, exceptuando las muestras de necropsia, en las que 5 mg del tejido fue macerado y homogenizado previamente, de forma manual, según el procedimiento descrito por Valdés y colaboradores (2008).

a) Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Se procesaron, por este método, un total de 581 muestras y se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el Manual de Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio de las IRA de Etiología Viral (Savón et al., 2003), utilizando un anticuerpo monoclonal anti-hexón (Chemicon, EUA). Como control positivo se utilizaron láminas con células infectadas con la cepa prototipo de AdV serotipo 3, donada gentilmente al laboratorio por el Centro para el Control de Enfermedades Infecciosas de Suecia y como control negativo, células de la línea celular A-549 sin infectar. Se consideró positiva la presencia de cinco o más células fluorescentes y negativa la ausencia de estas (coloración roja).

b) Aislamiento Viral

Se inocularon 296 muestras, para ello se utilizaron dos líneas celulares continuas descritas para el aislamiento viral dada su susceptibilidad a los AdV: Hep-2 (carcinoma laríngeo humano) y A -549 (carcinoma de pulmón humano), ambas procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC), y mantenidas en el Laboratorio de cultivos celulares del IPK. El medio de mantenimiento utilizado fue el Medio mínimo esencial (Sigma, Inglaterra) con glutamina 2mM y aminoácidos no esenciales, suero bovino fetal (Eurobio, Francia) al 2%, con penicilina y estreptomina al 0.1%, pH 7.2-7.4, ajustado con bicarbonato de sodio al 7.5%.

Cada muestra clínica se inoculó en dos tubos de cultivo con una monocapa semi confluyente de células (0.2mL por tubo), dejándose el inóculo en contacto directo con la monocapa celular 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se

añadió el medio de mantenimiento, y las células se incubaron a 37° C. Como control celular, se utilizaron dos tubos de cultivo sin inocular. El medio de mantenimiento se cambió al tercer día y las células se observaron diariamente durante un período de 7 a 10 días, hasta la aparición del efecto citopático (ECP). Antes de informar una muestra como negativa, se realizaron 3 pases ciegos en las mismas condiciones. Los virus presentes en las células con ECP se identificaron posteriormente.

c) Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

Extracción de ácidos nucleicos:

El ácido nucleico viral se extrajo a partir de una alícuota de 200 µL de la muestra clínica y del homogenizado de tejidos en el caso de fallecidos, utilizando el método de tiocianato de guanidinio (Casas et al., 1995). Esta metodología fue aplicada a 699 de las muestras investigadas. En el tampón de lisis se utilizó un control interno del ensayo, consistente en un producto amplificado de ARN clonado (Promega, EUA) donado por el Instituto de Salud Carlos III, España. El uso del control interno resultó útil para evaluar el proceso de extracción, la eficiencia de la amplificación y la presencia de inhibidores en la muestra clínica (Coiras et al., 2003).

El control negativo empleado consistió en agua estéril libre de RNAsas, (Sigma, Inglaterra) que se procesó siguiendo la misma metodología utilizada para el procesamiento de las muestras clínicas

- Reacción de amplificación

RCP Múltiple 1(RCP-M1): Esta reacción permite detectar además de los AdV, otros virus ARN (Influenza A, B y C y virus sincitial respiratorio A y B) causantes de IRA, la misma incluye un paso previo de transcripción reversa, consistente en un ciclo de 45 minutos a 48°C y 15 minutos a 94°C, que precedió a las dos rondas de amplificación (RCP y RCP anidada) según el protocolo descrito por Coiras y colaboradores (2003). A la mezcla de la primera reacción de la RCP-M1 se le adicionó 5 µL del ácido nucleico extraído, para un volumen final de 50µL. Después de la primera amplificación, 2 µL del producto amplificado se añadió a la mezcla de reacción de la RCP anidada, para un volumen final de 50 µL. Los cebadores utilizados para la detección del genoma de AdV, las condiciones de la RCP y las etapas de las dos rondas de amplificación, se muestran en las tablas 1 y 2 del Anexo2.

- Detección del producto amplificado.

Esta metodología se aplica a todas las reacciones de RCP referidas en este trabajo. A 8µL del producto de reacción resultante, se añadieron 2µL de tampón de muestra 6X (Promega, EUA) Esta mezcla fue corrida en una electroforesis en gel de agarosa al 2 %, preparado en tampón TBE 0,5x (Tris 0.089M, ácido bórico 0.089M, EDTA 0.002M), teñido con bromuro de etidio 0,5mg/mL. La electroforesis se realizó a 90 V durante una hora, empleando como marcador de peso molecular el ADN "ladder" (Promega, EUA), con un rango entre 100 y 1000 pb. La visualización del producto amplificado se realizó por exposición del gel a la luz ultravioleta en un transiluminador (BI-O-VISION, EUA). La RCP-M1 se consideró positiva a los AdV, cuando se observó una banda del producto amplificado correspondiente a una talla de 482 pb y la validez de los resultados se verificó con la aparición de una banda a 887 pb correspondiente al control interno.

III.1.4.2 Identificación de los aislamientos.

a) Identificación

A los tubos de cultivos que presentaron ECP sugestivo de AdV, se les realizó una extracción de ADN, directamente del aislamiento original y la identificación se llevó a cabo mediante una RCP de tipo genérico.

b) Extracción de ADN a partir del aislamiento viral

Se realizó una digestión con Proteinasa K (QUIAGEN, Alemania), sin precipitación final, de acuerdo al protocolo descrito por Tenorio y colaboradores (1993). A 39.5µL del cultivo se le adicionó 10µL de tampón lisis (EDTA 5mM, Tris-HCl 10mM [pH7.6], SDS 1%) y 0.5µL de Proteinasa K a una concentración de 20mg/mL. Esta mezcla se incubó a 56°C durante 45 minutos en bloque térmico y la enzima se inactivó a 95°C durante 10 minutos. Esta metodología de extracción se utilizó para todas las RCP que serán descritas posteriormente para la caracterización de los AdV en especies y serotipos

c) Reacción de amplificación

Se utilizó el protocolo de la RCP descrito por Xu y colaboradores (2000), el cual utiliza cebadores de la región conservada del hexón (Anexo 2, tabla3). Esta RCP, (RCP universal), se lleva a cabo en una sola ronda de amplificación con una alta sensibilidad para la detección de los 51 serotipos de los AdV que afectan al hombre.

La reacción se realizó en un volumen final de 50 μ L. La mezcla de reacción consistió en Tris-HCl (10mM), MgCl₂ (1.5 mM), KCl (50mM), 200 μ M de cada dNTP, 20 pmol de cada cebador, 1.25 U de Amplitaq DNA polimerasa (Applied Biosystem, EUA), 5 μ L del ADN extraído y agua hasta completar el volumen. Las condiciones de amplificación se muestran en el Anexo2, tabla 4. Al detectarse el producto amplificado, el genoma de AdV fue identificado cuando la banda de este producto correspondió a una talla de 482 pb.

III.1.4.3 Caracterización de las cepas de AdV.

III.1.4.3.1 Determinación de las especies de AdV

Los aislamientos ya identificados por la RCP universal, se clasificaron en especies, mediante un ensayo de RCP múltiple que emplea oligonucleótidos especie-específicos, complementarios a la región del gen de la fibra de cada una de las especies (Xu et al, 2000). La reacción de amplificación se llevó a cabo de manera similar a la descrita en el acápite III.1.4.2 c). Los cebadores empleados y la talla de los productos amplificados para cada una de las especies que sirvieron de base para la clasificación de los aislamientos, se refieren en el Anexo2, tabla 5.

III.1.4.3.2 Determinación de los serotipos de AdV

Una vez que los aislamientos se clasificaron en especies (A-F), se procedió a determinar el serotipo a partir del ADN extraído (acápite III.1.4.2). Para ello, se aplicaron diferentes ensayos que permiten detectar los principales serotipos causantes de IRA, contenidos en las especies B y C. Estos ensayos incluyeron la RCP convencional, la RCP a tiempo real (RCP-TR) y la electroforesis capilar. Estos tres ensayos utilizados por separado o en combinación, permitieron definir el serotipo en la totalidad de los aislamientos. La utilización de uno u otro método dependió de la disponibilidad de ellos en los diferentes años.

a) Ensayos de RCP convencional. Por este método fueron tipificados la totalidad de los aislamientos de las especies B y C. Para las especies B, se investigaron los serotipos 3, 7, y 21, mediante una RCP múltiple (Xu y Erdman, 2001) con cebadores que flanquean regiones hipervariables del gen del hexón (lazos 1 y 2). La presencia del serotipo 14 se investigó mediante una RCP simple con cebadores de la región del hexón (Metzgar et al, 2005). Para la especie C, se investigaron todos los serotipos

(1, 2, 5 y 6) mediante una RCP múltiple que detecta los cuatro serotipos de esta especie y las coinfecciones (Adhikary et al, 2004).

Los cebadores para los diferentes ensayos de RCP, la talla del producto amplificado, así como la fuente de referencia donde se validaron estos métodos por los autores originales se muestran en el Anexo 2, tablas 6, 7 y 8. Las condiciones de los ciclos de las tres RCP empleadas se muestran en el Anexo 2, tabla 9. Para estas especies, los serotipos fueron definidos de acuerdo a la talla del producto amplificado en cada caso.

b) RCP a tiempo real (RCP-TR)

Esta metodología se utilizó solamente para la confirmación de los serotipos de la especie C, aisladas entre los años 2000 y 2004 (n=33). Para ello se utilizó un sistema de cebadores y sondas marcadas (Ebner et al., 2005) Todas las secuencias de los cebadores están localizadas dentro de la región hipervariable del hexón (Anexo 2, Tabla 10 y 11). El volumen final de la RCP-TR fue de 25 μ L, que incluyeron 12,5 μ L de la mezcla de reacción (TaqMan Universal Master Mix, Eurogentec, Belgica), 1% de formamida (Calbiochem, Alemania), 6 μ L de ADN de la muestra, 400nM de cada uno de los cebadores (VBC Genomics, Austria) y la sonda TaqMan (Eurogentec, Belgica) a una concentración de 200nM. Todas las sondas se marcaron con FAM (6-carboxyfluoresceína) en el extremo 5' y con TAMRA (carboxy tetramethyl - rhodamina) en el 3'. Las amplificaciones fueron hechas en un equipo ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, EUA).

c) Electroforesis capilar

Esta técnica se empleó para confirmar la identidad de los serotipos ya definidos por las RCP convencionales, utilizando los aislamientos obtenidos en el periodo del 2000-2005 (n= 34). Para la realización de esta, se llevó a cabo una RCP para la determinación de las principales especies de AdV causantes de IRA (B, C y E), empleando cebadores de secuencias que flanquean regiones conservadas del hexón (Anexo 2, tabla 12). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μ L y consistió en 1 U de HotStarTaq DNA polimerasa (QIAGEN, Alemania), 2,5 μ L de tampón 10X, 2,5mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP (Invitrogen, Austria), 200-400 nM de los cebadores (VBC Genomics Bioscience, Austria) y 6 μ L del ADN extraído, diluido 1: 100. Uno de los cebadores, los negativos, fueron marcados con

fluoresceína y JOE. Las condiciones de amplificación se muestran en el Anexo 2, tabla 13. Tras la RCP, se añadieron a la mezcla de reacción fragmentos de ADN de cepas patrones que emiten fluorescencia a una longitud de onda ya normalizados para los diferentes serotipos (Anexo 2, tabla 12) que facilitaron la visualización para cada especie (Ebner et al., 2006). Los productos de la RCP fueron aplicados en un capilar de sílica de 50 micras de diámetro y la emisión de la fluorescencia a las diferentes longitudes de onda de las cepas patrones y muestras fue detectada usando un analizador ABI 3100 (Applied Biosystem, EUA) con parámetros de inyección de 1KV/5-10 seg. En la Figura 1 del Anexo 2, se ilustra de forma esquemática la longitud de los fragmentos de los serotipos de las especies A, B, C, E y F utilizados como referencia en la electroforesis capilar.

III.1.4.4 Análisis Estadístico

Los análisis se realizaron con los programas SPSS versión 11.5 (Statistical Package for the Social Sciences) y EPIDAT versión 3.1 (Programa para el Análisis Epidemiológicos de Datos Tabulados).

Para el análisis de la comparación entre los grupos de edades, las manifestaciones clínicas y los porcentajes de infección se utilizó la prueba de Chi cuadrado, con estimación de la probabilidad (p) y fueron calculados los Odds Ratio (OR) como estimado del riesgo, con un intervalo de confianza (IC) al 95%. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$ y un $OR > 1$ fue indicativo de riesgo aumentado.

Para conocer el grado de correlación entre los marcadores climatológicos (precipitaciones y temperatura) y los porcentajes de infección, se utilizó el método de correlación por rangos de Spearman. Coeficientes de correlación con valores superiores a 0.5, se consideraron significativos.

Para determinar la significación de la frecuencia de infección entre los diferentes meses, así como los de mayores y menores frecuencias, se utilizó una prueba de Chi cuadrado de homogeneidad. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

Para determinar la asociación de los diferentes serotipos con las variables estudiadas fue utilizada la prueba de χ^2 de Pearson cuando la frecuencia esperada de cada celda fue mayor que 5 y la prueba exacta de Fischer en caso contrario. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

III.2. DETERMINAR LA PARTICIPACIÓN DE LOS ADENOVIRUS EN LA MIOCARDITIS, LA CONJUNTIVITIS HEMORRÁGICA Y EL SÍNDROME NEUROLÓGICO INFECCIOSO.

III.2.1 Miocarditis viral aguda (MVA)

III.2.1.1 Tipo de estudio: Descriptivo de series de casos

III.2.1.2. Universo de estudio: Incluyó a todas las muestras de pacientes con diagnóstico clínico de MVA, recibidas en el LNRVR entre los años 2005 y 2008.

III.2.1.3 Tamaño muestral (n) y características de la población estudiada.

Se analizaron un total de 22 muestras, procedentes de 12 pacientes. 16 de estas, correspondientes a 8 casos de niños fallecidos (entre 5 meses y 15 años de edad) provenientes de un brote de miocarditis ocurrido en julio del año 2005, tras el paso del huracán Denis. El resto de las muestras (n=6), procedían de 4 casos esporádicos de MVA (Tabla III.7). La confirmación clínica e histopatológica de los casos fallecidos, se hizo acorde los criterios descritos por Aretz (1986). Las muestras se colectaron en medio de transporte viral (Savón et al., 2003).

Tabla III.7 Pacientes con MVA, según datos clínicos y epidemiológicos (2005-2008)

Casos	Año	Edad	Antecedentes Patológicos	Tipo de Muestra	Evolución (días)	Procedencia
1		5m	Ninguno	Miocardio y pulmón	F (1)	La Habana
2		9a	Epilepsia	Miocardio y pulmón	F (1)	La Habana
3		15a	Siclemia	Miocardio y pulmón	F (4)	La Habana
4	2005 (B)	24m	Ninguno	Miocardio y pulmón	F (2)	La Habana
5		12a	MCD*	Miocardio y pulmón	F (3)	La Habana
6		12m	Ninguno	Miocardio y pulmón	F (1)	La Habana
7		5a	Esplenectomía	Miocardio y pulmón	F (1)	La Habana
8		10m	B-Talasemia	Miocardio y pulmón	F (2)	La Habana
9		10m	Ninguno	Miocardio y pulmón	F (5)	Stgo. de Cuba
10	2006 (E)	5a	Ninguno	Líquido Pericárdico	V (14)	La Habana
11		53a	MCD	Miocardio y pulmón	F (5)	Cienfuegos
12	2008 (E)	46a	Desconocido	Líquido Pericárdico	V (12)	La Habana

Fuente: LNRVR, IPK. *MCD: miocardiopatía dilatada, B: Procedente de brote; E: casos esporádicos, F: fallecidos, V: vivos.

III.2.1.4 Diagnóstico de laboratorio

a) Detección del genoma viral por RCP–M1: Se realizó de acuerdo a la metodología empleada en el objetivo I (Acápites III.1.4.1 c). Para la identificación del agente etiológico se investigaron por RCP, además de los AdV, otros virus causantes de MVA: los virus del herpes humano 1, 2 y 6, el virus de la varicela zoster, el citomegalovirus, el virus de Epstein Barr (Tenorio et al, 1993) y los flavivirus (Sánchez-Seco *et al.*, 2005) y otros virus respiratorios como los rinovirus, los enterovirus, los coronavirus y los virus de la parainfluenza (Coiras *et al.*, 2004).

b) Aislamiento e Identificación de los AdV

La totalidad de las muestras se inocularon en la línea celular A-549 (descrito en el acápite III.1.4.1 b). Las muestras con ECP se identificaron mediante la RCP universal (descrita en el acápite III.1.4.2).

III.2.1.5. Caracterización en especies y serotipos

La especie y el serotipo de los aislamientos identificados como AdV, se determinaron de manera similar a lo descrito para las muestras respiratorias en el acápite III.1.4.3.

III.2.2. Conjuntivitis hemorrágica aguda (CHA)

III.2.2.1 Tipo de estudio: Descriptivo de serie de casos

III.2.2.2 Universo de estudio: Estuvo integrado por todas las muestras recibidas como parte del sistema nacional de vigilancia en el LNRVR de pacientes con diagnóstico clínico de CHA (n= 38) durante los años 2000 al 2008, procedentes del hospital Ramón Pando Ferrer en La Habana. Además, se estudiaron otras muestras recibidas en el Laboratorio de Referencia Nacional de Enterovirus (LNRE) con igual diagnóstico, que resultaron negativas a Coxsackie A-24v (n= 67), agente causal de una epidemia de CHA que se produjo en el año 2008 y que abarcó todas las provincias del país. La edad de los pacientes osciló entre 2 y 82 años (media 33 años). Todas las muestras (n= 105) se colectaron en las primeras 72 horas del inicio de los síntomas y se trasladaron bajo condiciones establecidas para el transporte de las mismas.

III.2.2.3 Diagnóstico Viroológico

a) Detección del genoma viral por RCP

La totalidad de las muestras (n=105) se procesaron de acuerdo a la metodología de la RCP-M1 (Acápites III.1.4.1c). Dado que en estas muestras solamente se investigó

la presencia de los AdV, se hicieron dos modificaciones al protocolo original de la RCP-M1 (Coiras et al., 2003), se eliminó el paso previo de la transcripción reversa y solo se añadieron a la mezcla de reacción los cebadores para la detección de los AdV.

b) Aislamiento e identificación de los AdV

Este procedimiento, solamente se realizó a las muestras provenientes del LNRVR (n= 38), debido a que el volumen de las muestras procedentes del LNRE, no fue suficiente debido a los múltiples ensayos para determinar y caracterizar el agente etiológico. La metodología empleada se describió en los acápites III.1.4.1b y III.1.4.2.

III.2.2.4 Caracterización en especies y serotipos

Los aislamientos obtenidos e identificados se caracterizaron en especies (Acápite III.1.4.3.1) y los serotipos se establecieron mediante una RCP múltiple (Banik et al, 2005) que detecta todos los AdV capaces de producir infecciones en la superficie ocular (AdV-3, 7, 4, 8, 19 y 37) y que emplea cebadores de la región de la fibra y el hexón (Anexo 2, Tabla 15). La mezcla de reacción consistió en 1 U de AmpliTaq DNA polimerasa (Applied biosystem, EUA), 5 µL de tampón 10X, 200 µM de cada dNTP (Promega, EUA), 0.2 µM de cada uno de los cebadores (Eurogentec, Luxemburgo) y 2 µL del ADN extraído, en un volumen final de 50 µL. Las condiciones de amplificación para esta RCP, están referidas en el Anexo 2, tabla 16. La clasificación en serotipos se hizo de acuerdo a la talla del producto amplificado en cada caso.

III.2.3. Síndrome neurológico infeccioso (SNI)

III.2.3.1 Tipo de estudio: Descriptivo de serie de casos

III.2.3.2 Universo de estudio: Estuvo integrado por todas las muestras recibidas como parte del sistema nacional de vigilancia en el LNRVR, con síntomas que involucraban al sistema nervioso central (SNC), precedidos de síntomas respiratorios, con el fin de establecer el diagnóstico diferencial.

III.2.3.3 Tamaño muestral y población estudiada: se analizaron un total de 12 muestras (11 LCR y 1 Aspirado bronquial) provenientes de 11 pacientes hospitalizados entre los años 2005 y 2008 (Tabla III. 8). En tres de estos pacientes (casos 5, 9 y 11), se refirieron antecedentes patológicos como hidrocefalia, cardiopatía congénita e insuficiencia respiratoria respectivamente.

Tabla III.8 Pacientes con SNI, según datos clínico- demográficos (2005-2008)

Casos	Año	Edad	Sexo	Presentación Clínica	Procedencia
1	2005	2a	M	IRA-Meningoencefalitis	La Habana
2		9m	M	IRA-Meningoencefalitis	La Habana
3	2006	10m	M	IRA-deshidratación-toma sensorial	La Habana
4		2a	F	IRA-Meningoencefalitis	Matanzas
5		11a	M	IRA- Toma de conciencia	La Habana
6		4a	F	IRA-Convulsiones-Bajo gasto	La Habana
7		2a	F	IRA-Fiebre-Somnolencia-Vigilia	La Habana
8		11m	F	Neumonía grave-Meningoencefalitis	La Habana
9		5a	M	IRA-Meningoencefalitis	La Habana
10	2007	65a	F	IRA-Guillain-Barré	La Habana
11	2008	3a	M	IRA-Meningoencefalitis	La Habana

Fuente: LNRVR, IPK.

III.2.3.4 Diagnóstico Viroológico

a) Detección del genoma viral por RCP.

La totalidad de las muestras (n=12) se procesaron de acuerdo a la metodología de la RCP-M1 (Acápites III.1.4.1c). Para la identificación del agente etiológico se investigaron por RCP, además de los AdV, otros virus involucrados en el SNI como los pertenecientes a la familia herpesviridae (virus del herpes humano 1, 2 y 6, el virus de la varicela zoster, el citomegalovirus y el virus de Epstein Barr), según el protocolo descrito por Tenorio y colaboradores (1993) y otros virus respiratorios como los rinovirus, los enterovirus, los coronavirus y los virus de la parainfluenza (Coiras et al., 2004).

III. 3 DETERMINAR LA PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR ADV EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL Y SU ASOCIACIÓN CON EL SÍNDROME GASTROINTESTINAL Y RESPIRATORIO EN PACIENTES SEROPOSITIVOS AL VIH.

III.3.1 Infección por AdV en muestras del tracto gastrointestinal

III.3.1.1 Tipo de Estudio: Casos y controles.

III.3.1.2 Muestras y pacientes:

Se investigaron 294 muestras de heces de individuos adultos, entre 22 y 60 años tomadas en un período comprendido entre los años 2004 y 2006. Para el análisis de la prevalencia de la infección por AdV entre personas VIH + y seronegativas, se

utilizaron muestras de 167 VIH+ (94 procedían de pacientes hospitalizados en el IPK y 73 muestras de voluntarios, residentes en el sanatorio de Santiago de las Vegas) y 127 muestras de individuos seronegativos de trabajadores del IPK, que voluntariamente accedieron a participar en el estudio y que constituyeron el grupo control.

Para evaluar la posible significación patogénica de los AdV en el síndrome gastrointestinal de los pacientes seropositivos, dentro de las 167 muestras, se tomó en cuenta que 60 pacientes presentaban diarrea aguda o crónica y 107 fueron individuos asintomáticos. En el momento de la colecta de la muestra, de los 167 individuos, 68 (40.7%) eran seropositivos y 99 (59.2%) habían progresado a Sida.

Los datos clínicos necesarios para relacionar los hallazgos virológicos con el estado inmune de los pacientes (progresión a Sida y conteo de CD4) y los resultados de la investigación a otros patógenos entéricos como parte del diagnóstico diferencial (CMV, enterovirus, rotavirus, parásitos, bacterias y protozoarios), fueron recogidos de la revisión de las historias clínicas.

El estudio se aprobó por el comité de ética del IPK y se llevó a cabo según la declaración de Helsinki. Todos los pacientes fueron informados de las características del estudio y se les recogió por escrito el consentimiento informado (Anexo 3).

III.3.1.3 Detección de los AdV en las muestras.

III.3.1.3.1 Aislamiento viral.

Todas las muestras colectadas, se resuspendieron en medio de mantenimiento con una concentración del 1% de antibióticos (penicilina y estreptomina). A esta mezcla se le añadió 100 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente y el homogenizado se clarificó por centrifugación a 10,000 rpm. El sobrenadante, se inoculó en dos líneas celulares continuas, A-549 y HeLa (células de cáncer cérvico-uterino), según la metodología descrita en el acápite III.1.4.1 b). Las muestras con ECP, sugestivo de AdV, se identificaron por RCP, siguiendo el protocolo descrito en el Acápite III.1.4.2.

III.3.1.4 Caracterización de las cepas de AdV

III.3.1.4.1 Determinación de las especies de AdV

Los aislamientos ya identificados por RCP universal, se clasificaron en especies según el protocolo descrito en el Acápite III.1.4.3.1. Estos resultados se confirmaron por un ensayo de RCP-TR, descrito por Lion et al (2003), el cual utiliza cebadores y

sondas de la región del hexón y los genes ARN asociados a virus que permite la detección individual de las especies (Anexo 2, tabla 17). Las reacciones de RCP-TR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L, que incluyó 6 μ L de ADN extraído y 12,5 μ L de la mezcla de reacción (TaqMan Universal Master Mix, Eurogentec, Bélgica). La concentración de los cebadores y las sondas marcadas con FAM (extremo 5') y TAMRA (extremo 3'), se muestran en el Anexo 2, tabla 17. La amplificación se realizó usando un equipo ABI Prism 7700 (Applied Biosystem, EUA); las condiciones de amplificación se refieren en el Anexo 2, Tabla 18.

III.3.1.4.2 Determinación de los serotipos de AdV

La determinación de los serotipos de la especie C, se realizó según la metodología descrita en el Acápite III.1.4.3.2 a). Para determinar los serotipos de la especie D, se realizó la secuenciación nucleotídica, debido a que la gran cantidad de serotipos que contiene esta especie (32), hacen difícil su definición por RCP.

a) Caracterización de la especie D por secuenciación nucleotídica

Una alícuota del ADN extraído se utilizó para realizar una nueva RCP, donde se amplificó un segmento de 250 pb de una de las regiones hipervariables del hexón, correspondiente a los nucleótidos 1155-1399, descrita por Ebner y colaboradores (2005). Esta reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L, conteniendo 5 μ L de ADN, 1U de HotStar Taq DNA polymerase (QIAGEN, Alemania) en tampón 10x, 200 μ M de cada dNTP (Invitrogen, Austria) y 400 nM de cada cebador (Invitrogen, Austria). Los cebadores y las condiciones de amplificación se refieren en el anexo 2, Tablas 19 y 20. Los productos de la RCP, se purificaron utilizando el estuche comercial (QUIAquick™ PCR purification Kit. QIAGEN, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad, concentración y pureza del ADN se determinó mediante una electroforesis en gel de agarosa. La reacción de secuenciación se llevó a cabo empleando un estuche comercial (GenomeLabs DTCS- Quick Start Kit, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante, 5 μ L del producto purificado se secuenció en ambas direcciones empleando los mismos cebadores utilizados en la RCP, a una concentración de 5pMol/ μ L. Una vez concluida la reacción de secuenciación, los productos se purificaron mediante el estuche comercial citado anteriormente (GenomeLabs DTCS- Quick Start Kit, EUA).

La separación de los productos obtenidos en la reacción de secuenciación se realizó en un secuenciador automático ABI Prism 7700 (Applied Biosystem, EUA). Las secuencias resultantes se editaron y se compararon con secuencias de la especie D disponibles en el Gen Bank, mediante alineamientos múltiples, utilizando el programa Bio Edit Sequence Alignment Editor, versión 7.0.5.2 (Hall, 1999)

III.3.1.5 Estimación de la carga viral

Para estimar la carga viral, se realizó una extracción de ADN de las muestras de heces, para ello se empleó el estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit (QUIAGEN, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído, se amplificó en una RCP-TR cuantitativa, que utiliza una curva estándar externa establecida mediante diluciones seriadas de cepas de referencia cuantificadas para cada una de las especies de AdV (Watzinger et al, 2004). Los cebadores, las sondas marcadas así como las condiciones de amplificación están referidos en el Anexo 2, tablas 17 y 18. La carga viral se expresó como copias de virus por gramo de heces.

III.3.1.6 Análisis estadístico.

Para determinar la prevalencia de AdV entre los casos y controles, así como para correlacionar la presencia de AdV con los cuadros diarreicos se utilizó el programa EPIDAT versión 3.1 con tablas de contingencia de 2x2, con estimación de la probabilidad (p) y fueron calculados los Odds Ratio (OR) como estimado del riesgo, con un intervalo de confianza (IC) al 95%. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$ y un $OR > 1$ fue indicativo de riesgo aumentado.

III.3.2 Infección por AdV en el Tracto Respiratorio.

III.3.2.1 Tipo de estudio: Descriptivo de serie de casos.

III.3.2.2 Universo de estudio: estuvo constituido por la totalidad de los pacientes VIH+, a los cuales se le indicó una broncoscopia por presentar una enfermedad respiratoria de etiología no precisada durante el año 2007.

III.3.2.3 Tamaño muestral y características de la población.

Se analizaron 21 muestras de lavados broncoalveolares (LBA), procedentes de pacientes adultos (27-48 años), hospitalizados en el IPK, que presentaban manifestaciones respiratorias de larga evolución, dentro de las cuales predominaban la neumonía a repetición (n=7) y un síndrome febril prolongado (n=5). Además, se refirieron otros signos y síntomas como la tos, expectoración, falta de aire, fiebre,

malestar general, anorexia, marcada pérdida de peso y astenia. Todos los pacientes estudiados, se encontraban bajo tratamiento antibiótico de amplio espectro, 14 (66.6%) habían progresado a sida y en 8 los conteos de CD4 eran inferiores a 200 células/mm³.

Los datos clínicos y el resultado de la investigación de otros patógenos respiratorios como bacterias, hongos y *Mycobacterium tuberculosis* se recopilaron de la revisión de las historias clínicas.

III.3.2.4 Diagnóstico virológico

III.3.2.4.1 Detección del genoma viral de AdV por RCP-M1

Todas las muestras fueron procesadas de acuerdo al protocolo descrito en el acápite III.1.4.1 c).

III.3.2.4.2 Aislamiento en cultivo celular e identificación de AdV

La totalidad de las muestras (n=21) se inocularon en la línea celular A-549 siguiendo el protocolo descrito en el acápite III.1.4.1 b). Los aislamientos con ECP se identificaron mediante la RCP universal (descrita en el acápite III.1.4.2).

III.3.2.5 Caracterización en especies y serotipos

La especie y el serotipo de cada uno de los aislamientos se determinaron de manera similar a lo descrito para las muestras respiratorias en el acápite III.1.4.3.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1 CARACTERIZAR LA INFECCIÓN POR ADENOVIRUS EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA.

IV.1.1 Diagnóstico y frecuencia de la infección por adenovirus

De las 1200 muestras analizadas en los nueve años de estudio, en 501 (42%) se identificó al menos un virus respiratorio. De estas muestras, los AdV se identificaron en 197. Por lo que de manera general, los AdV constituyeron el 16,4 % (197/1200) de todas las muestras estudiadas y el 39,3% (197/501) de las IRA con etiología viral confirmada.

Los porcentajes anuales encontrados fluctuaron de un 5 a un 31% (Figura IV.1), en concordancia con lo descrito en investigaciones, similares al presente estudio (Cooper *et al.*, 2000; Broor *et al.*, 2007; Valero *et al.*, 2009; Lien-Do *et al.*, 2011), donde no existe un consenso en cuanto a los patrones de frecuencia respecto a la prevalencia de la infección por AdV y se plantea que esta puede oscilar entre un 2 y un 36% dependiendo de factores tales como el criterio de selección de la muestra, la severidad de la enfermedad, las condiciones ambientales y el método de diagnóstico empleado (Stralioetto *et al.*, 2002).

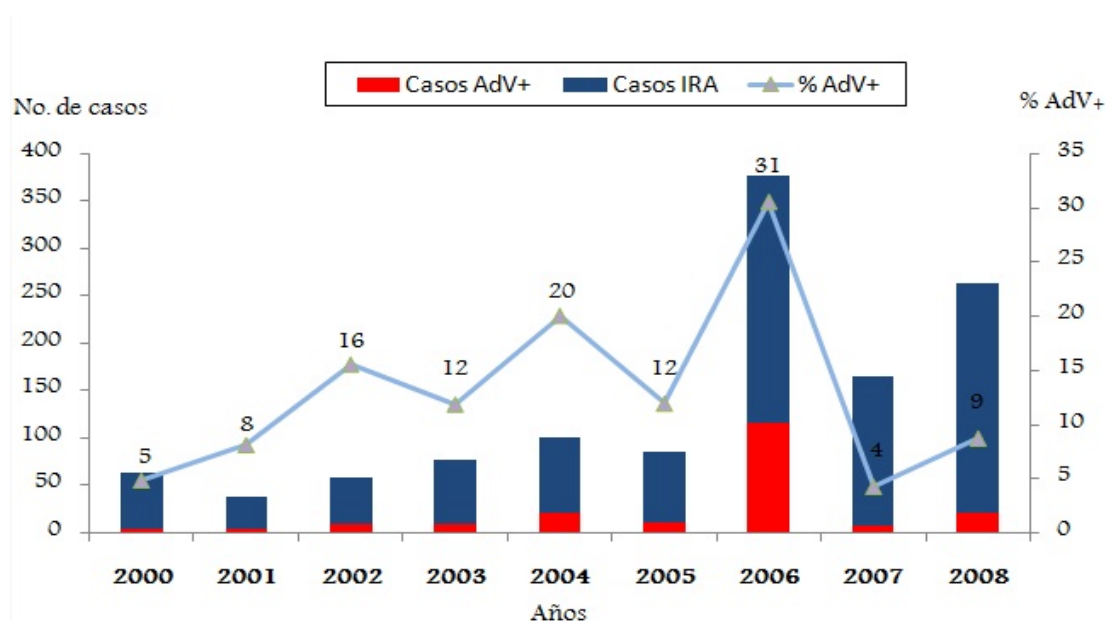


Figura IV.1 Distribución anual de casos positivos a la infección por AdV, según número total de muestras recibidas (2000-2008).

En este estudio se analizaron muestras provenientes de la vigilancia de pacientes de todas las edades con IRA de diferente grado de severidad, desde la IRA leve y moderada hasta la IRA severa con hospitalización y casos fatales. Otro factor importante en la variación de los porcentajes de detección, fue que el diagnóstico se realizó con métodos que variaron en sensibilidad, desde la inmunofluorescencia y el aislamiento en cultivo hasta los métodos moleculares, que una vez normalizados e introducidos en el laboratorio, permitieron un incremento notable en los índices de detección. La influencia de los métodos de diagnóstico se hace evidente si analizamos que en este estudio por inmunofluorescencia se detectó un 6.5% (13/197) de positividad, por aislamiento en cultivo un 28.4% (56/197) y por RCP, la positividad alcanzó valores de 84.2% (166/197). Estudios de vigilancia realizados en nuestro laboratorio en las temporadas 1991-92 (Goyenechea *et al.*, 1993) y 1995-97 (Cancio *et al.*, 2000) donde se empleó la técnica de inmunofluorescencia, como único método diagnóstico, se encontraron valores de positividad de 1.6 y 2.8%, respectivamente, muy por debajo de lo encontrado en el presente estudio, donde un alto porcentaje de las muestras se diagnosticaron por aislamiento en cultivo celular, técnica más sensible que la inmunofluorescencia y por métodos moleculares como la RCP que tienen una mayor sensibilidad respecto a los métodos anteriores (Mandell

et al., 2009). La introducción de los métodos moleculares, en el diagnóstico como lo fue en el año 2006, demuestran la significativa contribución de estos a la identificación rápida de los agentes virales asociados a las IRA, que permiten la adopción de medidas oportunas y estrategias de prevención para evitar la diseminación de las enfermedades respiratorias que tienen un alto grado de transmisibilidad (Stroparo *et al.*, 2010).

Es válido tener en cuenta además, las variaciones en las condiciones ambientales, que como analizaremos posteriormente, se asociaron significativamente con la frecuencia de las infecciones por AdV, por lo que sin duda estas fluctuaciones anuales en la frecuencia son consecuencia de la interacción de todos estos factores en su conjunto.

IV.1.2 Frecuencia de la infección por grupos de edades y sexos

Al analizar la positividad por rangos de edades respecto al total de muestras, los resultados reflejan que la infección por AdV se detectó en los cuatro grupos, con una tendencia descendente con el aumento de la edad (Figura IV.2), encontrándose una asociación estadísticamente significativa ($p=0.03$) entre ambas variables. En los grupos I y II (menores de 5 años), se alcanzaron los mayores porcentajes de infección (10.5 %), con respecto a los grupos III y IV (2.9 y 3 %), resultando estadísticamente significativa la positividad en estos grupos respecto al resto de las edades con un OR=1.39 [1.00-1.93] y un valor de $p=0.04$. Particularmente afectados, resultaron ser los menores de un año. Estos resultados coinciden con numerosos estudios epidemiológicos que muestran que los AdV son los causantes del 5 al 24 % de las infecciones respiratorias en los niños menores de cinco años, disminuyendo su incidencia a medida que aumenta la edad, excepto en comunidades cerradas (Kim *et al.*, 2000; Reina *et al.*, 2004; Yeung *et al.*, 2009). También se ha demostrado que el riesgo de infección por AdV es de un 5.9 % para los niños menores de dos años y de un 3.7 % de 2 a 3 años (Landry *et al.*, 2009). Aunque los porcentajes de infección encontrados varían en los diferentes estudios, todos los autores refieren a este grupo como el más susceptible de contraer la infección, producto de la baja respuesta de anticuerpos ante la infección primaria y a la limitada o ausente protección provista por los anticuerpos maternos después de los 6 meses. En los pacientes mayores de 5 años los porcentajes disminuyen probablemente debido a la

existencia de una inmunidad protectora conferida por la exposición al virus en los primeros años de la vida (Lee¹ *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2010).

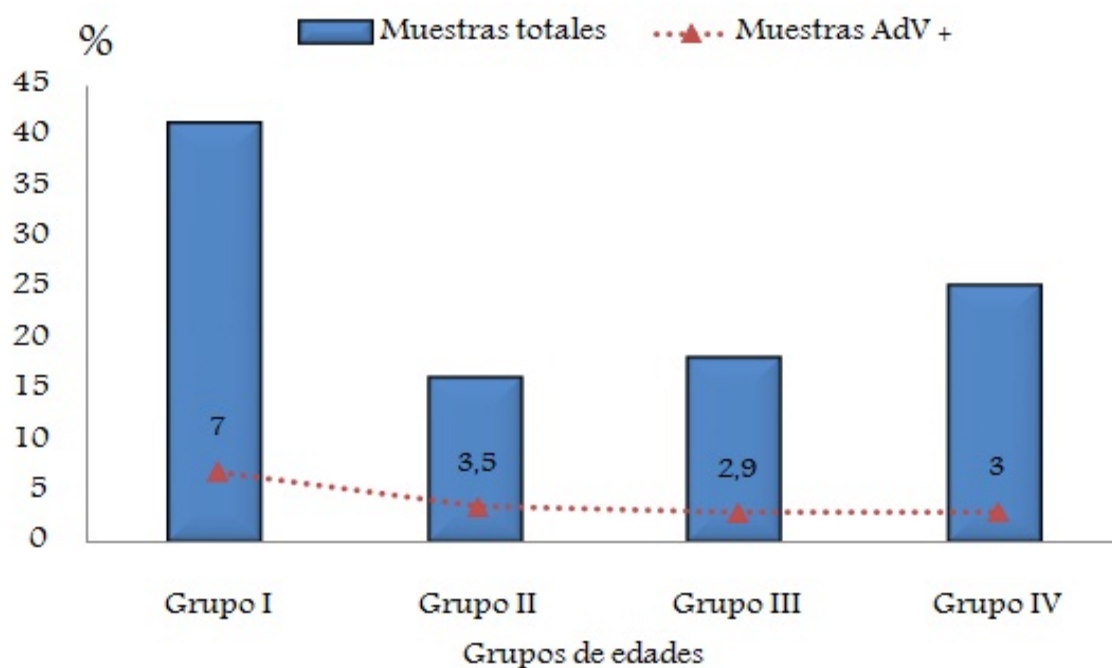


Figura IV.2 Frecuencia de la infección por AdV en pacientes con IRA, según grupos de edades (2000-2008).

En cuanto a los adultos, la prevalencia de AdV ha sido poco explorada, debido a la menor relevancia que representa respecto a la población pediátrica. En este estudio la prevalencia en adultos (grupo IV) fue de un 3 %, similar a lo que indican estudios recientes donde se plantea que la positividad en este grupo de edad no rebasa el 3%, excepto en brotes, donde pueden tener niveles más elevados (Minosse *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2012).

Los niveles de positividad fueron similares para ambos sexos. De las 1200 muestras, en 1190 se analizó la variable sexo, debido a que en 10 no se obtuvo este dato. De las 510 muestras del sexo femenino y 680 del masculino, 81(16%) y 116 (17%) resultaron positivas respectivamente, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos. En la mayoría de los estudios consultados tampoco aparecen diferencias al respecto, a pesar de que el número de muestras del sexo masculino es generalmente mayor que las del sexo femenino (Lin *et al.*, 2004; Sung

et al., 2009; Stroparo *et al.*, 2010) esto no parece constituir un factor de riesgo que determine una mayor frecuencia de detección.

IV.1.3 Estacionalidad

La estacionalidad es una de las características de los virus respiratorios y su variación geográfica relacionada con la temperatura, las precipitaciones y la humedad relativa se ha identificado en estudios epidemiológicos en todo el mundo (Viegas *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2011).

La infección por AdV se constató en todos los años, de manera indistinta en los doce meses, sin mostrar un patrón estacional discernible en analogía con otros autores que en cortos y largos períodos de estudio no han encontrado una tendencia estacional definida (Cooper *et al.*, 2000; Straliotto *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2008). En este estudio, por ejemplo, en los años 2000 y 2001, la infección se detectó solamente en octubre y junio, respectivamente; en el año 2007 en febrero y agosto. Mientras que en el año 2004, se detectó en todos los meses excepto en diciembre. En el resto de los años también hubo una marcada variación en la distribución mensual, resultando la diferencia entre la positividad por meses altamente significativa ($p < 0.0001$).

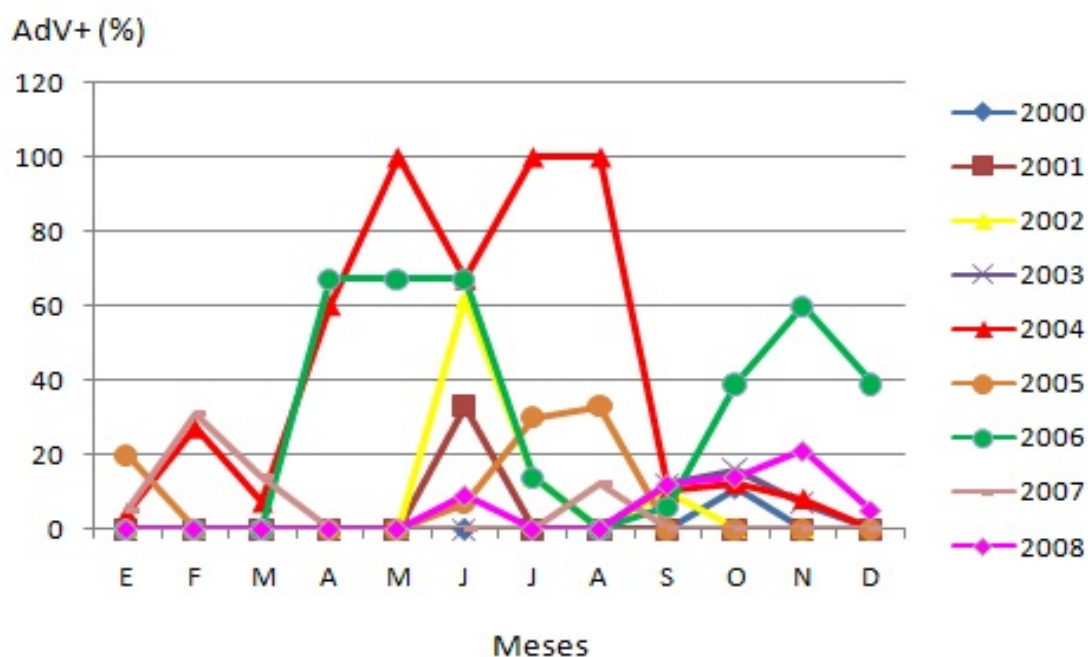


Figura IV.3 Porcentajes de positividad a AdV en pacientes con IRA, según meses y años (2000-2008)

Como se observa en la figura IV.4, los meses de mayor detección fueron meses invernales, febrero (24%) y noviembre (27%) similar a lo reportado en otros estudios (Kim *et al.*, 2000; Reina *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2007) y en coincidencia con el resto de los virus respiratorios, donde la incidencia en estos meses tiende a elevarse, debido a una trasmisión más efectiva producto de la concentración de individuos susceptibles en lugares cerrados (Broor *et al.*, 2007; Faden *et al.*, 2011).

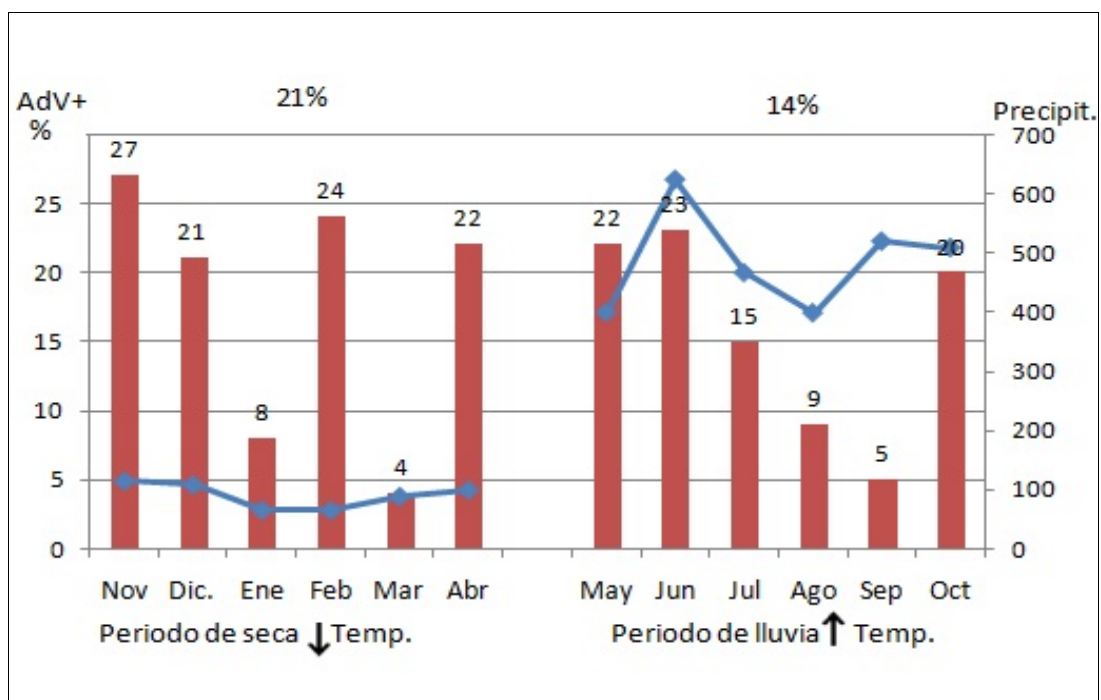


Figura IV.4 Porcentajes de muestras positivas a AdV en pacientes con IRA, según meses (2000-2008)

Aunque algunos autores exponen esta razón para explicar los altos porcentajes de detección viral en los meses de invierno, sin embargo, otros plantean que esto no es suficiente y que las condiciones climáticas deben jugar un papel más importante, proponiendo que debemos ver la estacionalidad en función de dos componentes: la susceptibilidad del hospedero y la viabilidad viral (Eccles, 2002). Se sugiere que la exposición al aire frío de las vías aéreas nasales implican un daño de las defensas mucosales, incluyendo las mucociliares y enlentecen la actividad metabólica, reduciendo el movimiento ciliar y la secreción del mucus, disminuyendo así la respuesta inmune local (Weigt *et al.*, 2002). Es por esto que en invierno la entrada de

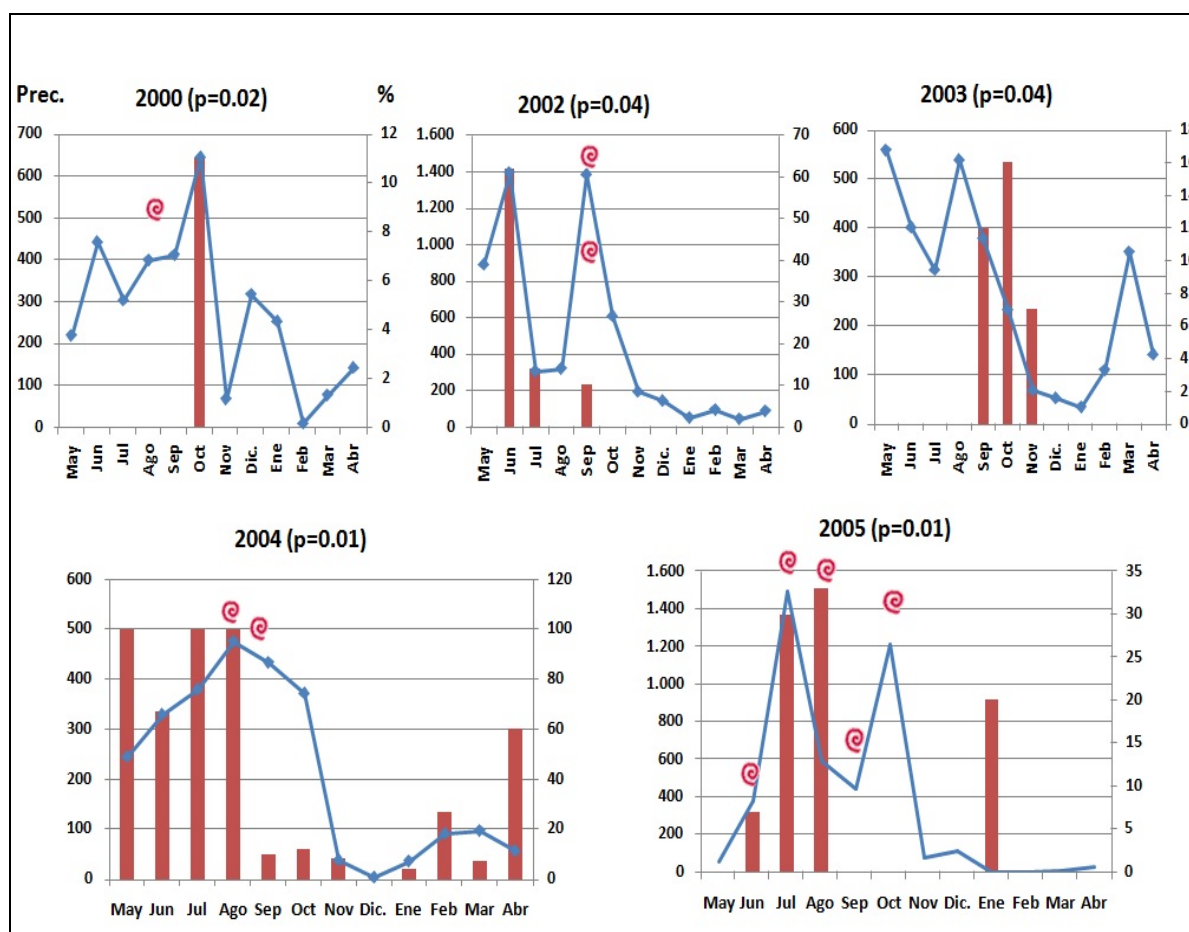
los virus, incluyendo a los AdV, al tracto respiratorio se ve favorecida. Por otra parte, la viabilidad viral también puede verse beneficiada por factores climáticos como las bajas temperaturas y el bajo nivel de radiaciones ultravioletas (Viegas *et al.*, 2003).

En Cuba como país tropical, se distinguen dos estaciones, una estación de seca (noviembre – abril) y una estación de lluvia (mayo – octubre) donde las temperaturas son más elevadas (Meteorología, 2010). Cabría esperar entonces, que en la estación de lluvia, los valores de detección decaigan de manera significativa respecto a la estación de seca y menores temperaturas, sin embargo, los porcentajes de detección no difieren significativamente (21% vs 14%), a pesar de que probablemente el hospedero es menos susceptible. La explicación a esta transmisión sostenida durante todo el año, podría encontrarse en que los AdV son virus desnudos, con un genoma ADN resistente a la luz ultravioleta y poco propenso a la pérdida de infectividad bajo condiciones ambientales hostiles, lo que les permite sobrevivir durante largos períodos de tiempo en superficies y aguas contaminadas, teniendo ventajas adicionales en cuanto a su transmisión en los meses más cálidos (Gray, 2005). Todo esto, unido a la existencia de portadores asintomáticos con altos y prolongados niveles de excreción hacen posible la aparición de casos en todos los meses del año (Faden *et al.*, 2011).

Si realizamos un análisis por año, correlacionando la positividad con parámetros meteorológicos como la temperatura y las precipitaciones encontramos que la temperatura se asoció de manera significativa con la positividad en todos los años ($p < 0.05$) alcanzando en el año 2004 el menor valor de p (0.001).

En cuanto a las precipitaciones, para la mayoría de los años (2000, 2002, 2003, 2004 y 2005) el coeficiente de correlación fue mayor de 0.5 con un valor de p menor o igual que 0.04, indicando una relación directamente proporcional con esta variable (Figura IV.5). Es importante destacar que en todos estos años, las precipitaciones se vieron incrementadas por fenómenos meteorológicos como tormentas tropicales y huracanes que no solo aumentan las precipitaciones, sino que también a su paso deterioran temporalmente las condiciones sanitarias, reforzando la efectividad de la transmisión (Viegas *et al.*, 2003). En otros estudios donde se asocian los parámetros meteorológicos con las ITR, se concluye que la frecuencia de infección por AdV se correlaciona de manera significativa con la temperatura y las precipitaciones, lo cual

podría explicar las fluctuaciones anuales entre las frecuencias de detección observadas (Straliotto *et al.*, 2002; du Prel *et al.*, 2009).



☉ Ocurrencia de huracanes.

Figura IV. 5 Correlación entre las precipitaciones medias anuales y la positividad a AdV en pacientes con IRA, (2000-2008).

IV.1.4 Principales diagnósticos clínicos asociados a la infección por AdV

Los AdV se detectaron en el 15% (95/640) de las ITRS y en el 18 % (102/560) de las ITRI, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de detección.

Haciendo un análisis por separado de las enfermedades (Figura IV.6), vemos que los mayores porcentajes de positividad se encontraron asociados a neumonía (34%), SSP (27%) y bronquiolitis (18%), seguidos de las ITRS (15%) y el Crup (14%). En

este hallazgo coincidimos con lo reportado en la literatura, de que estas son las presentaciones clínicas más frecuentes causadas por los AdV dentro de las ITRI (Reina, 2004; Herrera *et al.*, 2007; Gencay *et al.* 2010).

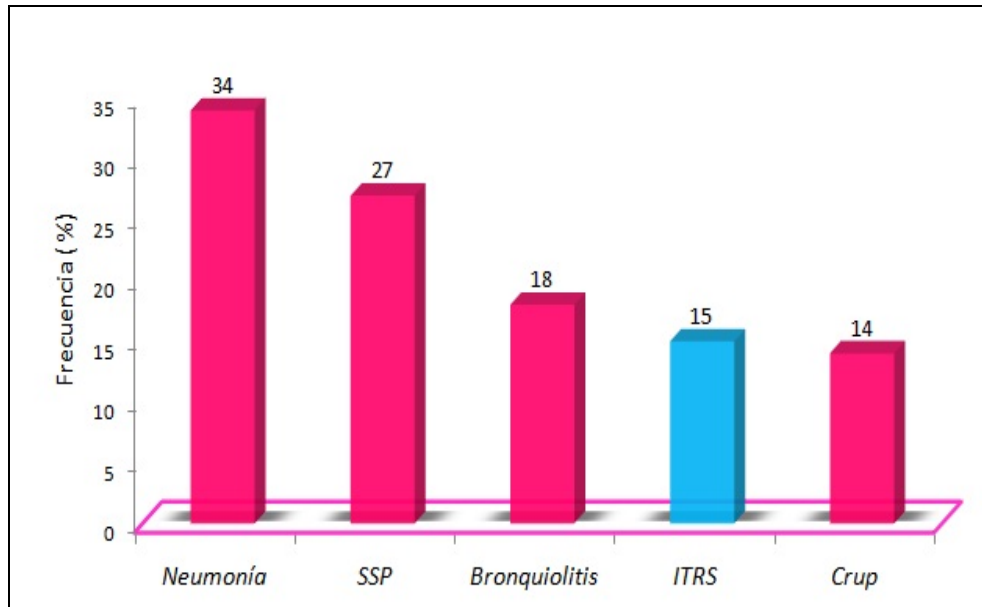


Figura IV.6 Frecuencias de detección de AdV en pacientes con IRA, según diagnóstico clínico (2000-2008)

Dentro de las manifestaciones en el TRI, las neumonías agudas son sin lugar a dudas, las de mayor importancia debido a su gravedad y elevada hospitalización. En este estudio, la neumonía alcanzó los mayores porcentajes en los dos grupos de edades analizados, siendo mayor en los niños menores de 5 años (Tabla IV.1). Es de destacar que 8 de los 10 casos de neumonía (80%) requirieron hospitalización, y de estos 5 (63%) en UCI, 2 de ellos en estado crítico con necesidad de ventilación mecánica y larga estadía hospitalaria. En uno de los casos fue referida una rápida complicación que involucró al SNC. Los dos casos no hospitalizados, procedieron de un brote en un hogar de ancianos y fueron aislados dentro de la institución para evitar la diseminación.

Numerosas publicaciones señalan como factores de riesgo para desarrollar una neumonía severa o fatal por AdV, entre otros, las características del huésped y la edad menor de un año (Dalmas *et al.*, 2003; Gupta¹ *et al.*, 2011) Aunque la neumonía es también una de las enfermedades de mayor importancia clínica en adultos afectando de 5 a 20 de cada 1000 adultos por año, de estos del 20 al 40 % requiere hospitalización para su tratamiento. (Jonhstone *et al.*, 2008; Jennings *et al.*, 2008).

Tabla IV.1 Principales diagnósticos clínicos en pacientes con infección por AdV, según edad y hospitalizaciones (2000-2008).

Diagnóstico Clínico	AdV+ (%)	AdV+ < 5 años (%)	AdV+ >5 años (%)	Hospitalizados (%)
Neumonía	10 (34)	6 (20)	4(14)	8(80)
Bronquiolitis	50 (18)	50 (18)	0	50(100)
SSP	14 (27)	13 (25)	1(2)	10(71)
Crup Viral	28 (14)	23 (11)	5(2)	22(78)
Subtotales	102 (18)	92 (17)	10(11)	90(88)
ITRS	95 (15)	34 (5)	61(9)	13(14)
Total	197 (16.4)	126 (11)	71(6)	103(52)

Fuente: LNRVR

La bronquiolitis, al ser una enfermedad propia del primer año de vida, con atenciones especiales dentro de nuestro sistema nacional de salud, requirió hospitalización en el 100% de los casos, independientemente de la severidad del cuadro. En ninguno de los 50 casos de bronquiolitis positivos a AdV fue referido ninguno de los factores de riesgo que condicionan el desarrollo de un cuadro grave (Cansino, 2004), excepto la edad, que en el 46% de los casos fueron lactantes menores de 3 meses. Es decir, que eran niños previamente sanos, no prematuros, sin antecedentes de enfermedad pulmonar crónica o cardiopatías congénitas. De manera similar ocurrió con el SSP y el Crup viral que estuvieron entre los porcentajes elevados con requerimientos de hospitalización.

A pesar de estar descrito que las infecciones por AdV representan hasta el 10% de las ITRI, en este estudio se obtuvo un 18% en general, alcanzando valores superiores de forma individual. Cifras similares, inclusive más elevadas son documentadas recientemente por otros autores. Esto pudiera deberse al tipo de población estudiada, al serotipo infectante y a la sensibilidad de los métodos de diagnóstico empleados, especialmente las técnicas moleculares, que introducidas en el diagnóstico de rutina muestran que la infección por este virus está asociada más frecuentemente a la enfermedad respiratoria severa en pacientes pediátricos comparado con los resultados previos obtenidos mediante las técnicas de Inmunofluorescencia y cultivo celular (Hong, 2001; Stroparo, 2010; Tecu *et al.*, 2012).

Se encontró un 11% de coinfecciones, resultado que estuvo por debajo de lo descrito por otros autores que han encontrado valores por encima del 20%, esta diferencia se debe probablemente al criterio de selección de la muestra (Coyle, 2004; Jennings, 2004; Stroparo, 2010). Se sabe que las coinfecciones son frecuentes en pacientes con ITRI, pero la significación clínica de una infección mixta con AdV, no está definida (Kim *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2008; Lien Do *et al.*, 2011), siendo difícil de determinar aun con el empleo de métodos sensibles, como el RCP convencional. Además la amplificación de material genético residual procedente de infecciones previas o de virus persistentes (Jartii *et al.*, 2004; Schwarze *et al.*, 2004) constituye un factor que complica la interpretación de los resultados, cuando se utilizan métodos tan sensibles como la RCP (Larcher *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2009). Para lograr un resultado confiable, se necesitarían métodos cuantitativos, como la RCP-TR, que permitan demostrar los niveles de excreción y relacionarlo así con la enfermedad en dependencia de los criterios de severidad que se tomen en cuenta (Wong *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009). En este estudio se encontró mas coinfecciones en las ITRI, pero asociarlo con la severidad resulta difícil ya que en la mayoría de los casos hospitalizados no se contó con los datos acerca del grado de severidad.

IV.1.5 Casos de pacientes fallecidos asociados a la infección por AdV

De los 14 fallecidos con diagnóstico clínico de IRA, en esta serie de 9 años, los AdV, se identificaron en 5 (36%) de estos casos. En la tabla IV. 2 se muestran las características clínicas de los 5 casos fallecidos por IRA que resultaron positivos a la infección por AdV. Dos de los pacientes fallecidos (casos 1 y 4) se encontraban dentro del grupo de riesgo para desarrollar una enfermedad severa o fatal, el primero debido a la edad (3 meses) y el segundo por presentar una inmunosupresión, producto del tratamiento contra el cáncer hepático.

Contrario a lo esperado, el 60% (3/5) de los fallecidos fueron adultos, mayores de 15 años sin riesgo de desarrollar un cuadro fatal debido a la infección, lo que concuerda con informes anteriores donde se describen la ocurrencia de casos fatales en adultos inmunocompetentes ya sea en casos esporádicos o asociados a brotes (CDC, 2001; Heydari *et al.*, 2011; Clark *et al.*, 2011).

Tabla IV. 2 Casos fatales asociados a la infección por AdV en pacientes con IRA.

No. casos	Diagnóstico Clínico	Edad	Lugar de detección
1	Bronquiolitis	3 meses	Pulmón
2	Neumonía hemorrágica	16 años	Pulmón
3	Neumonía-DR	17 años	pulmón
4	Neumonía-CS- ED	52 años	Secreción respiratoria
5	Neumonía-DR	25 años	Pulmón y corazón

Fuente: LNRVR.DR: distres respiratorio, CS: choque séptico, ED: enfermedad diseminada

Una explicación plausible sea quizás que por una parte, las manifestaciones clínicas iniciales no justificaron una rápida demanda de atención médica en este grupo de edad y por la otra, la sospecha de neumonías bacterianas (sustentada en el tratamiento antibiótico), que suelen complicarse más frecuentemente que las virales, unido a la rápida evolución al cuadro fatal, típica de la infección por AdV (Dalmás *et al.*, 2003; Larrañaga *et al.*, 2000), fueron en primera instancia la razón de estas muertes.

Se estima que la tasa de letalidad por AdV oscila entre un 17 y un 34% dependiendo del serotipo (Robinson *et al.*, 2011) y que esta puede elevarse hasta un 90% si la infección es nosocomial. (Day *et al.*, 1998). En este estudio, todos los pacientes se encontraban hospitalizados y en ninguno los casos se determinó el serotipo, por lo que ambos elementos, tampoco deben ser descartados en el análisis integral de las causas posibles que condujeron al fallecimiento de estos pacientes.

IV.1.6 Caracterización en especies y serotipos

Durante el período de estudio, se caracterizaron exitosamente un total de 56 aislamientos de AdV, pertenecientes a las especies B y C, las que se describen como especies predominantes en las IRA a nivel mundial (Wold y Horwitz, 2007). Se detectaron seis serotipos diferentes (AdV-3, 34, 1, 2, 5 y 6) y una coinfección con dos serotipos (AdV-1 y 5). Del total de los aislamientos, 8 correspondieron a la especie B (14,2%) y 48 a la especie C (85.7%), en concordancia con lo publicado en estudios realizados en Italia (La Rosa *et al.*, 2006), Brasil (Luiz *et al.*, 2010), Malasia (Jamil *et al.*, 2010), Palestina (Qurei *et al.*, 2012) y Alemania (Biere *et al.*, 2010), donde se

encontró un predominio de la especie C. Por el contrario, en otras investigaciones realizadas en Inglaterra (Cooper *et al.*, 2000), Canadá (Wong *et al.*, 2008), Estados Unidos (Selvaraju *et al.*, 2011), Argentina (Barrero *et al.*, 2012) y Corea (Lee¹ *et al.*, 2010), el predominio de la especie B fue significativamente superior.

De manera general, y como era esperado, la cantidad de aislamientos de AdV, fue significativamente mayor en los niños menores de 5 años (80.3% vs 19.6%), con enfermedades asociadas al TRI y procedentes de casos esporádicos (Tabla IV.3). Estos resultados son similares a otros estudios donde se muestra que la mayor cantidad de aislamientos se obtienen de niños menores de 5 años, con enfermedades como neumonía y crup, principalmente de casos no epidémicos (Wong *et al.*, 2008; Yeung *et al.*, 2009).

Tabla IV.3 Especies y serotipos de AdV aislados en pacientes con IRA, según edad, presentación clínica y epidemiología (2000-2008).

Total AdV+ (%)		Serotipos de AdV (%)				
		AdV-3 n=7 (12.5)	AdV-1 n=15 (26.7)	AdV-2 n=17 (30.3)	AdV-5 n=14 (25)	Otros n=3 (5.3)
Grupos de edades						
< 5 años	45 (80.3) p=0.004	2 (4.4)	12 (26.6)	16(35.5)	12 (26.6)	3 (6.6)
> 5 años	11 (19.6) p=0.001	5 (45.4)	3 (27.2)	1 (9)	2 (18.1)	0
Presentación clínica						
ITRS	23 (41.0)	3 (13)	8(34.7)	10 (43.4)	1 (4.3)	1 (4.3)
ITRI	33 (58.9) p=0.04	4(12.1)	7(21.2)	7 (21.2)	13 (39.3) p=0.002	2 (6)
Epidemiología						
Casos esporádicos	36 (64.2) p=0.005	3 (8.3)	13(36) p=0.03	14 (39)	4 (11)	2(5.5)
Brotos	20(35.7) p=0.004	4 (20)	2 (10)	3 (15)	10 (50) p=0.001	1(5)

Fuente: LNRVR. p: valores de significación estadística.

Si realizamos un análisis individual de los serotipos, podemos notar que el AdV-3 se aisló de manera significativa en la población mayor de 5 años asociado a brotes epidémicos, sin diferencias significativas en cuanto a la forma de presentación clínica de la infección respiratoria. Este serotipo, a diferencia de los serotipos de la especie

C (AdV-1, 2, 5 y 6), se aisló solamente en cuatro meses del año, con picos de incidencia en julio y octubre (Figura IV. 7).

En diferentes estudios realizados se muestra que el AdV-3 afecta fundamentalmente a niños mayores de 5 años y adultos (Wold y Horwitz, 2007). Aunque se ha planteado que este serotipo, tiende a la endemidad en muchas de las poblaciones investigadas (Metzgar *et al.*, 2005), se describe principalmente como causa de extensos brotes en determinados meses del año, en países como Japón (Kim *et al.*, 2003), Corea (Lee *et al.*, 2010), Taiwan (Chang *et al.*, 2008), Estados Unidos (Selvaraju *et al.*, 2010) y China (Zhu *et al.*, 2009), donde ha producido casos graves y ocasionalmente fatales debido a las múltiples variantes de este serotipo que circulan en estos países (Landry *et al.*, 2009; Lebeck *et al.*, 2009; Mahadevan *et al.*, 2010).

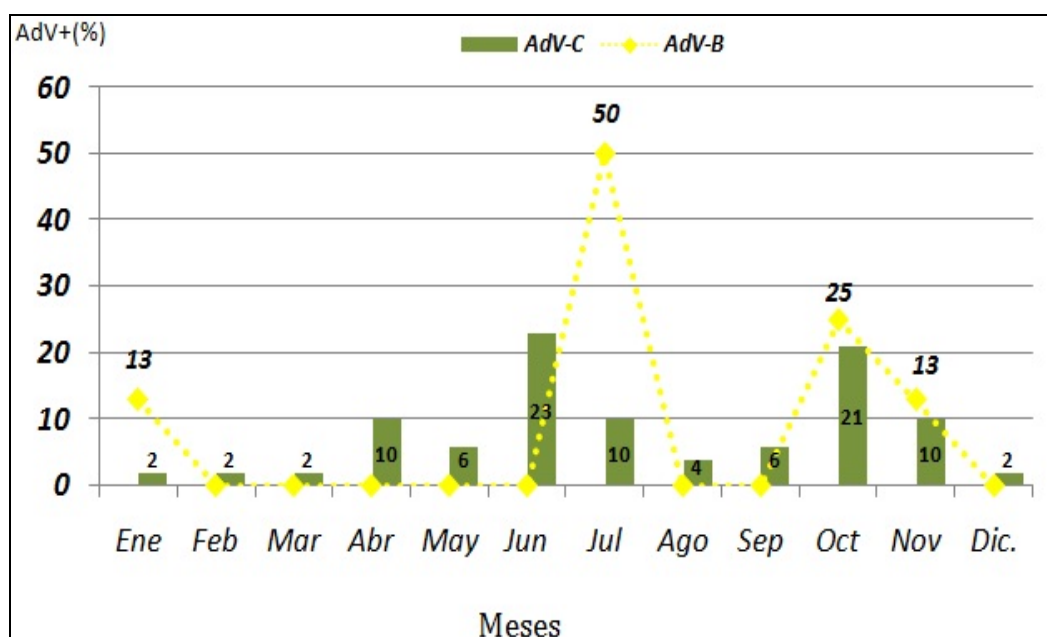


Figura IV.7 Porcentajes de detección de las especies de AdV aislados en pacientes con IRA, según meses (2000-2008).

Los AdV-1, 2 y 5, fueron los serotipos encontrados en mayores porcentajes, indicando una alta circulación en nuestro país y su carácter endémico fue claramente reflejado en este estudio (Figura IV.7). Aunque su aparición dentro de brotes epidémicos se ha descrito anteriormente, estos serotipos se aíslan mayoritariamente de casos endémicos y esporádicos que producen infecciones leves en el TRS (Gray *et al.*, 2007). Un hallazgo sorprendente resultó la asociación significativa del serotipo

5 a infecciones más severas en el TRI y a brotes epidémicos, ya que si bien, existen informes que documentan esta asociación, las observaciones al respecto en la literatura han sido relativamente escasas. (Kelsey, 1978; Soeur et al., 1991; Gray et al., 2007). Para analizar las posibles razones de esta asociación, debemos tener en cuenta, principalmente, factores virales y del huésped. A diferencia de otros serotipos como el AdV-3, 7, 11 y 19, para este serotipo no se conocen variantes genéticas que se correlacionen con diferencias en la respuesta inmune inducida en el hospedero y el tropismo celular, aunque para descartar esta posibilidad se necesitarían estudios genómicos de las cepas de AdV-5 aisladas. En cuanto al huésped, se ha planteado que existen factores genéticos que predisponen a una mayor o menor susceptibilidad frente a un determinado serotipo de AdV (Gregory et al., 2011). Estudios inmunogenéticos serían indispensables para demostrar tal afirmación.

Sin duda, el hallazgo más relevante resultó la no detección de AdV-7, a pesar de tener una prevalencia elevada dentro de las IRA, sugiriendo que este serotipo no circula en nuestra población o se encuentra circulando a niveles muy bajos. Esta afirmación, si bien tendría que ser demostrada por métodos serológicos, se sustenta en el hecho de que los 56 aislamientos obtenidos se tipificaron exitosamente, la mayoría de ellos confirmados por más de una técnica. Además, en dos estudios realizados anteriormente en Cuba, tampoco se detectó la circulación de este serotipo. El primero, se realizó empleando el análisis por enzimas de restricción del ADN viral a partir de 9 aislamientos de muestras de niños menores de 5 años (Pumariaga et al., 2000) y el segundo estudio, más amplio, realizado a partir de 49 muestras clínicas, empleando la técnica de secuenciación nucleotídica (Acosta et al., 2009).

El AdV-7 tiene una amplia circulación mundial, en países del cono sur americano como Brasil, Argentina, Chile, Uruguay y Perú (Kajon et al., 1996; Larranaga et al., 2000; Carballal et al., 2002; Siminovich et al., 2011), Asia (Deng et al., 2010; Tang et al., 2011; Yusof et al., 2012), Europa (Cooper et al., 2000; La Rosa et al., 2006) y Estados Unidos (Gray et al., 2007; Faden et al., 2011). Este serotipo presenta 27 variantes genómicas, como resultado de las mutaciones o recombinaciones genéticas, estas variantes son remplazadas en el tiempo (Lynch, 2011) y se han asociado en numerosos estudios asociadas a cuadros respiratorios muy severos,

principalmente de neumonías con fallo pulmonar (Deng *et al.*, 2010; Ghanaïem *et al.*, 2011; Yusof *et al.*, 2012) y otras manifestaciones clínicas extrapulmonares (Hong *et al.*, 2001). Aunque este serotipo se ha aislado de casos esporádicos, fundamentalmente se describe como causante de brotes epidémicos severos con una alta letalidad tanto en niños como en adultos, considerándose una verdadera emergencia dentro y fuera de nuestro continente (Gray *et al.*, 2005; Selvaraju *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2011).

La historia de la circulación de este serotipo y sus variantes, está relacionada con el movimiento de grandes masas poblacionales desde zonas endémicas, como fue el caso de su introducción en Israel durante la década de los años 90, donde su aparición coincidió con la migración de personas desde la antigua Unión Soviética y Etiopía (Azar *et al.*, 1998), el movimiento de tropas militares estadounidenses y sus aliados durante la guerra de Vietnam en la década de los años 60 y 70 y la migración de personas desde áreas endémicas del cono sur americano hacia EUA, entre otros (Erdman *et al.*, 2002). En Cuba, no se ha producido este evento de la migración poblacional, esto pudiera explicar la ausencia de aislamientos de este serotipo.

Si asumimos que este serotipo no circula en el país o lo hace a niveles relativamente bajos, entonces, la falta de inmunidad aparente en la población cubana contra el AdV7 sería un factor que facilitaría su eficiente transmisión y diseminación frente a la introducción de este serotipo y sus variantes genómicas.

IV.2 DETERMINAR LA PARTICIPACIÓN DE LOS ADENOVIRUS EN LA MIOCARDITIS, LA CONJUNTIVITIS HEMORRÁGICA Y EL SÍNDROME NEUROLÓGICO INFECCIOSO.

IV.2.1 Miocarditis viral aguda

Se analizaron 12 casos con diagnóstico clínico de MVA confirmados por criterios clínicos e histopatológicos, los cuales que resultaron negativos a otros virus causantes de MVA (Parainfluenza, Coronavirus, Rinovirus, Enterovirus, VHS 1 y 2, CMV, HVH-6, VEB, VVZ y flavivirus. De los 12 casos de miocarditis analizados (Tabla IV.4), en 7 se detectó AdV (58.3%). Todos los casos positivos tuvieron una rápida evolución a la muerte. El 85.7% (6/7) de los casos correspondieron a niños entre 5 meses y 15 años, de estos el 50%, fueron niños menores de dos años. Solo un caso positivo fue un adulto, mayor de 50 años.

Las diferencias encontradas en este estudio respecto a las edades, no son inesperadas, las infecciones por AdV son generalizadas y frecuentemente transmitidas por vía respiratoria y fecal-oral en los primeros años de la vida (Chang *et al.*, 2008; Lee¹ *et al.*, 2010). Garnett y colaboradores (2002) demostraron que alrededor de los dos años, existe una alta proporción de niños portadores del agente en linfocitos y amígdalas (fundamentalmente especie C) y que la circulación de estos linfocitos con ADN viral, sugiere que el virus no está confinado al sitio de infección (Baboonian y McKena, 2003) y que puede ser transportado teniendo acceso a los miocitos donde existen receptores celulares que estimulan la entrada de la partícula viral (Arnberg, 2009; Excoffon *et al.*, 2010).

Estos receptores, que en el caso de AdV son los CAR, se encuentran expresados a niveles altos en los niños y van disminuyendo con la edad. La alta proporción de niños con infecciones del miocardio por AdV, podría también reflejar la ausencia de una inmunidad cruzada anterior (Kindermann *et al.*, 2008).

Tabla IV.4 Casos de MVA positivos a AdV

Casos	Edad	ES	Días de evolución	Procedencia	Serotipo
1	5 meses	Ninguna	1	Brote	AdV-5
2	15 años	Siclemia	4	Brote	AdV-5
3	12 años	MCD	3	Brote	AdV-5
4	1 año	Ninguna	1	Brote	AdV-5
5	5 años	Esplenectomía	1	Brote	AdV-5
6	10 meses	Talasemia	2	Brote	AdV-5
7	53 años	MCD	5	Esporádico	AdV-2

Fuente: LNRVR, ES: enfermedad subyacente, MCD: miocardiopatía dilatada

Los adultos poseen casi todas evidencias serológicas de una exposición previa y alrededor del 90% tienen células T de memoria que responden a AdV (Olive *et al.*, 2001; Camargo *et al.*, 2011). Es posible que la infección con un serotipo, pueda ofrecer protección contra otros, permitiendo a los adultos escapar de la viremia cuando son infectados con un virus cardiotrópico (Andreoletti *et al.*, 2009). Evidencias de lo anterior, se mostraron en un estudio donde se constata que linfocitos T-citotóxicos generados contra un serotipo son capaces de lisar las células infectadas con serotipos de la misma especie, sugiriendo que la similitud antigénica

entre cepas puede además influenciar el resultado de la infección (Smith *et al.*, 1998).

De los siete fallecidos, 5 (71.4%) presentaron antecedentes patológicos, tales como, siclemia, miocardiopatía dilatada, esplenectomía y β - talasemia. Se plantea que la vulnerabilidad del corazón a las infecciones virales, está directamente relacionada con los niveles de expresión de los receptores celulares que median la entrada del virus al miocito. Estos receptores son sobre-expresados en individuos con patologías cardiacas como la MCD y otras enfermedades donde es frecuente la función cardiaca anormal, tales como las anemias crónicas (Tsirioni *et al.*, 2004; Tsirioni y Aessopos, 2005), lo que podría explicar el alto porcentaje de casos fatales en individuos con antecedentes patológicos, donde la susceptibilidad a estas infecciones se ve incrementada (Caruso *et al.*, 2010 Toivonen *et al.*, 2010).

Cuando consideramos, la posible significación de los receptores CAR, para la iniciación, curso y severidad de la infección adenoviral *in vivo*, debemos tener en cuenta que los patrones de expresión es uno de los componentes importantes del complejo proceso de patogénesis de tales infecciones, ya que a pesar de las diferencias individuales en la respuesta inmune, el hecho de una diseminación facilitada del virus a células con un mayor número de receptores después de un primer ciclo lítico, podría tener un efecto más adverso en el curso clínico de la enfermedad (Knowlton y Lim, 2009; Shi *et al.*, 2009).

Los serotipos encontrados pertenecieron todos a la especie C (AdV-2 y 5), que son los principales serotipos que se han descrito como productores de MVA en niños (Bowles *et al.*, 2003). Probablemente la asociación de estos serotipos con los casos de MVA, responda al hecho de que son estos serotipos los que más frecuentemente causan la infección primaria y donde se ha demostrado la infección persistente en linfocitos, cuya circulación facilita el acceso a los miocitos en ausencia de una inmunidad previa (Dettemeyer, 2004; Zhang, 2008).

IV.2.2 Conjuntivitis hemorrágica aguda

Durante el año 2008 se detectó por el sistema de vigilancia nacional un incremento en el número de casos esporádicos con diagnóstico clínico de CHA. Unido a esto, se producían brotes epidémicos de CHA en todas las provincias del país, cuyo agente etiológico era el virus coxsackieA-24 (Fonseca *et al.*, 2012). Sin embargo, un

porcentaje elevado de casos resultaban negativos al diagnóstico de este agente. Ambos hechos sugirieron la presencia de otros agentes, tales como los AdV, como causantes de este tipo de conjuntivitis.

De las 105 muestras de exudados oculares estudiadas, los AdV se detectaron en 21 (55.2%) de los casos esporádicos recibidos en el LNRVR y en 21(31.3%) de los casos negativos a la epidemia de CHA, producida por el virus coxsackieA-24 (Tabla IV. 5). Se obtuvo aislamiento viral en 15/38 (39.4%) de las muestras correspondientes a los casos esporádicos, ya que en el resto de las muestras no se realizó el aislamiento viral debido al insuficiente volumen de las mismas. Por lo que, de forma general, de las 105 muestras investigadas, en 42 (40%), se demostró la presencia de AdV como agente etiológico de CHA.

Aunque las infecciones oculares producidas por los AdV, son principalmente la FFC y la QCE, su participación en casos esporádicos y brotes de CHA, aunque en menor medida, se han descrito en investigaciones previas (Rezig *et al.*, 2006; Zaki y Fatah, 2008). En Cuba, estudios anteriores acerca de las conjuntivitis virales, refieren a los AdV como agentes causales de infecciones oculares como la FFC y la QCE (Savón *et al.*, 1995 y Torres *et al.*, 1998). Este estudio constituye el primer informe donde se confirman a los AdV como agentes etiológicos de CHA, tanto por técnicas clásicas como moleculares.

Tabla IV.5 Positividad a AdV en muestras de casos de conjuntivitis hemorrágica aguda, según casos esporádicos y epidémicos (2008).

Procedencia	RCP+ (%)	Aislamiento
Casos esporádicos (n=38)	21 (55.2%)	15 (39.4%)
Epidemia CHA (n=67)	21 (31.3%)	NR
Totales 105	42 (40%)	15 (39.4%)

Fuente: LNRVR NR: no realizado

La detección de AdV (31.3%) en los casos negativos a enterovirus investigados durante el curso de la epidemia de CHA indicó la circulación de ambos virus con síntomas indistinguibles dentro del mismo evento. Estos resultados coinciden con informes a nivel mundial que exponen el carácter mixto de las epidemias de CHA,

donde los AdV son detectados en mayores o menores porcentajes junto a enterovirus 70 y coxsackie A24 (Arnow *et al.*, 1977; Gurung *et al.*, 2003; Kurokawa *et al.*, 2006).

Por otro lado, durante el año 2008, Cuba tuvo que enfrentar una difícil situación climatológica, dada por el paso de tres huracanes (Tabla III.6) que produjeron cuantiosas precipitaciones y afectaron las condiciones sanitarias, creando condiciones favorables para la emergencia de ambos agentes, que comparten el tropismo por las células conjuntivales y otras características estructurales que le confieren resistencia.

En este estudio, los AdV identificados, correspondieron a las especies B (n=9), D (n=4) y E (n=2) (Figura IV. 8), en coincidencia con otros artículos, que describen a estas especies como las principales causantes de infecciones oculares con un tropismo elevado por las células de la conjuntiva (Ariga *et al.*, 2005; Frantidou *et al.*, 2005; Aoki *et al.*, 2011).

Dentro de la especie B, 9 cepas fueron tipificadas, todas pertenecientes al serotipo AdV-3. Este serotipo se ha reconocido como una causa frecuente de conjuntivitis en muchas partes del mundo, especialmente en Japón, donde es más prevalente que los serotipos AdV-4 y 37 (Aoki y Tagawa, 2002; Matsui *et al.*, 2007; Fujimoto *et al.*, 2008).

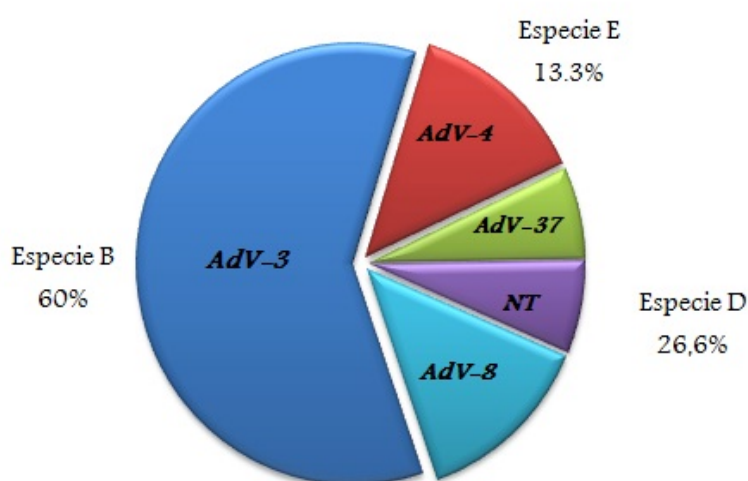


Figura IV.8 Porcentajes de muestras positivas a AdV en casos de CHA, según especies y serotipos (2008).

De las cuatro cepas de la especie D encontradas en este estudio, 2 pertenecieron al serotipo AdV-8, una al serotipo 37 y una cepa no pudo ser tipificada. El serotipo AdV-8 es referido como agente etiológico de un gran número de casos de CHA en Asia, Túnez, Turquía y Grecia, de forma esporádica o epidémica (Rezig *et al.*, 2006; Yagci *et al.*, 2009; Tabbara *et al.*, 2010). El serotipo AdV-37, es bien conocido como agente causal de QCE (Hamada *et al.*, 2008; Ishiko *et al.*, 2008), pero no se encontró en la literatura ninguna referencia de este serotipo asociado a la CHA. Sin embargo, un estudio realizado en el año 2003, llama la atención acerca de un nuevo cuadro clínico de queratoconjuntivitis que se manifiesta por la presencia de amplias hemorragias subconjuntivales y su diagnóstico suele ser confundido por los clínicos como una CHA, indistinguible a la producida por los enterovirus (Chang *et al.*, 2003). La cepa no tipificada de la especie D posiblemente corresponda a una nueva variante genética que no pudo ser detectada con los cebadores utilizados, como se ha documentado recientemente para algunos serotipos de esta especie que producen infecciones oculares (Walsh *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009).

El serotipo AdV-4, único representante de la especie E, también se describe como causa de CHA, mostrando una prevalencia elevada sobre otros serotipos (Frantzidou *et al.*, 2005; Rezig *et al.*, 2006). Algunos estudios prospectivos y retrospectivos lo sitúan como la segunda causa de CHA, después del serotipo AdV-3 (Aoki y Tagawa, 2002; Maranhao *et al.*, 2009).

IV.2.3 Síndrome neurológico infeccioso

De los 11 casos investigados de pacientes con SNI, en 3 (27.2%) se constató la infección por AdV (Tabla IV.6), el primero de ellos, un niño de 11 años con antecedentes patológicos, los otros dos casos, fueron niñas de 2 años y 11 meses respectivamente, esta última con una neumonía grave con múltiples complicaciones, dentro de las que se encontraba la meningoencefalitis. En ambos casos no fue referido ningún antecedente patológico ni otra condición inmunosupresora. Todas las muestras, resultaron negativas a la identificación de otros virus neurotrópos. Estos resultados coinciden con investigaciones que indican la aparición de manifestaciones neurológicas como una complicación de la infección respiratoria, con un riesgo incrementado en pacientes con enfermedades subyacentes y en niños menores de dos años. (Lema *et al.*, 2005; Hakim *et al.*, 2008; Frange *et al.*, 2011),

La identificación de los AdV en el SNI fue descrita anteriormente en estudios realizados en nuestro laboratorio, donde se detectaron en muestras de pacientes con encefalitis, parálisis flácida aguda y meningoencefalitis (Acosta *et al.*, 2008).

Tabla IV.6 Pacientes con SNI positivos a AdV, según edad, presentación clínica y APP

Casos	Edad	Presentaciones Clínicas	APP
1	11 años	IRA- Toma de conciencia	Hidrocefalia
2	2 años	IRA- Toma sensorial y Convulsiones	Ninguno
3	11 meses	Neumonía-Meningoencefalitis	Ninguno

Fuente: LNRVR, APP: antecedente patológico personal

A pesar de que esta infección es poco frecuente, casos esporádicos y pequeños brotes de enfermedad neurológica, posterior a la infección, se han documentado en casos sospechosos de poliomielitis (de Azevedo *et al.*, 2004), encefalitis (Lema *et al.*, 2005), meningoencefalitis (Fianchi *et al.*, 2003), parálisis flácida (Ooi *et al.*, 2003; Ivanova *et al.*, 2012) y otras enfermedades neurológicas (Lema *et al.*, 2005; Straussberg *et al.*, 2001).

Los serotipos que usualmente se aíslan de LCR o cerebro, pertenecen a la especie B, principalmente AdV-7 y AdV-3 (de Azevedo *et al.*, 2004) en este estudio no fue posible realizar el aislamiento ni la caracterización en ninguno de los casos positivos, debido al poco volumen de la muestra disponible, por lo que además de los factores relacionados con el hospedero (presencia de enfermedades subyacentes y edad), no descartamos características relacionadas con la "virulencia" de la cepa infectante.

IV.3 DETERMINAR LA PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR AdV EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL Y SU ASOCIACIÓN CON LOS SÍNDROMES GASTROINTESTINAL Y RESPIRATORIO EN PACIENTES SEROPOSITIVOS AL VIH.

Para estudiar la prevalencia de la infección por AdV en este grupo de pacientes se seleccionaron dos sistemas, el TGI y el TR, por ser ambos sistemas de los que se afectan con mayor frecuencia en los individuos infectados por el VIH (Tebruegge y Curtis, 2010).

IV.3.1 Identificación de los AdV en muestras del TGI

En cuanto a las prevalencias encontradas entre los pacientes seropositivos y seronegativos, los AdV se detectaron en un 15% (25/167) en individuos seropositivos a diferencia de un 4% (5/127) en los controles estudiados (Tabla IV.7). El cálculo de OR mostró un valor de 4.29, con un IC del 95% [1.59-11.5] y una probabilidad estadísticamente significativa ($p=0.002$). Estos valores muestran que los pacientes seropositivos, tienen un riesgo de infectarse con los AdV 4.29 más que los seronegativos.

Tabla IV.7 Prevalencia de la infección por AdV en el TGI, según especies y serotipos

	AdV+ (%)	Especies %	Serotipos
Casos VIH+ (n=167)	25 (15%) p=0.002	D (n=24) 96% C (n=1) 4%	AdV- 17, 42, 19, 10, 38, 13, 9, 26, 29, 49, 24, 46, 39 y 43 AdV 1+5
Controles VIH – (n= 127)	5 (4%)	C (n=5) 100%	AdV-1 y 2

Fuente: LNVR, p: valor de significación estadística.

De los 25 aislamientos de AdV obtenidos en los individuos seropositivos al VIH 24 correspondieron a la especie D (96%), y uno resultó una coinfección de los serotipos AdV-1 y 5 de la especie C (4%). En todas las muestras, los valores de carga viral fueron superiores a 10^6 copias/g de heces. Dentro de la especie D se tipificaron 14 serotipos diferentes (AdV- 17, 42, 19, 10, 38, 13, 9, 26, 29, 49, 24, 46, 39 y 43) y 4 cepas no se pudieron tipificar. En los controles, sólo se detectaron AdV de las especies C (AdV-1 y 2), probablemente como resultado de la excreción después de una infección respiratoria anterior (Wold y Horwitz, 2007). La baja frecuencia de infección con serotipos comunes de la especie C encontrada en este estudio respecto a la especie D (4 vs 96%) puede deberse a una inmunidad específica adquirida antes de la infección por el VIH (Kojaoghlanian *et al.*, 2003).

En el paciente VIH+, se incrementa el riesgo de desarrollar una infección por AdV, particularmente en el tracto gastrointestinal, donde la colonización y la persistencia de ellos sea probablemente un reflejo de la ineficacia de la respuesta CTL y de los

mecanismos de tipo TH-1 (Echavarría, 2008; Lion *et al.*, 2010). Se ha planteado que los pacientes VIH+, son más propensos a adquirir infecciones por los AdV de la especie D, desarrollando una infección crónica como resultado de la inmunidad debilitada o por diferencias en la virulencia peculiar de estas cepas (Silva *et al.*, 2010). Como resultado de esta persistencia un segundo serotipo puede combinarse al primero y formar un intermediario, aspecto que podría explicar el hallazgo de cepas inusuales y no tipificables que con frecuencia son encontradas en el TGI y cuyo significado en la patogenia, aun permanece por esclarecer (Curlin *et al.*, 2010; Robinson¹ *et al.*, 2011). Los últimos siete serotipos, todos pertenecientes a la especie D fueron primeramente aislados en pacientes VIH. Por razones desconocidas, muchos de estos pacientes se infectan con serotipos que son raramente aislados en individuos inmunocompetentes. La causa de esta predilección se desconoce. Se ha sugerido que la progresión lenta de la enfermedad facilita la ocurrencia de mutaciones y eventos de recombinación entre los serotipos coinfectantes, siendo la alta frecuencia y variedad de estas cepas un reflejo de ello (Ferreyra *et al.*, 2010; Robinson¹ *et al.*, 2011).

Respecto al papel patogénico que implicaría la presencia de AdV en los cuadros de diarrea aguda y crónica en los pacientes seropositivos, los AdV se encontraron en mayor porcentaje en 15/60 (25%) pacientes con diarrea, respecto a 10/107 (9%) que no presentaban esta manifestación (Tabla IV.8). El cálculo de OR mostró un valor de 3.23, con un IC del 95% [1.34-7.73] y una probabilidad estadísticamente significativa ($p=0.006$). Por lo que podemos decir que los pacientes seropositivos con diarrea tienen 3.23 veces más riesgo de tener una infección por AdV que cause el cuadro gastrointestinal que los pacientes sin esta manifestación. De los 15 pacientes con diarrea 14(93.3%) habían progresado a Sida y 11 (73.3%), tenían conteos de CD4 inferiores a las 200 células/mm³. Estos 15 casos, se investigaron para la determinación de otros patógenos entéricos, encontrándose en 3, coinfecciones con CMV y en uno, con *Isospora belli*. En el resto de los casos (73.3%), los AdV se detectaron de manera única.

Tabla IV.8 Porcentajes de individuos VIH+ con y sin diarrea positivos a AdV

	% AdV+	% Progresión		Estado Inmune (%)		Coinfecciones (%)
		VIH	Sida	CD4>200 cel	CD4<200 cel	
Con Diarrea (n=60)	25 p=0.006	6.7	93.3	4/15 (27)	11/15(73.3)	4/15(26.6)
Sin Diarrea (n=107)	9	40	60	7/10 (70)	3/10(30)	2/10(20.0)

Fuente: LNRVR

De los 25 aislamientos obtenidos, 10 procedían de muestras de pacientes que no presentaban diarrea. Algunos autores plantean, que la proporción de infecciones por AdV en pacientes seropositivos con y sin diarrea puede no diferir significativamente, lo que sugiere que una colonización persistente y asintomática es posible, hecho que refuerza la importancia del estudio de los mecanismos por los cuales estas cepas se encuentran colonizando el TGI de los pacientes seropositivos, durante los últimos estadios de la infección y cuyo significado en la patogenia no ha quedado definido al no haberse estudiado con profundidad tales mecanismos (Echavarría, 2008).

IV.3.1 Infección por AdV en el Tracto Respiratorio.

De las 21 muestras analizadas, en 10 (48%) se detectó la presencia de AdV y el virus se aisló en siete de ellas (70%). En 8 (80%) de los 10 casos positivos, el AdV se encontró como único patógeno y en 2 (20%) se detectó concomitantemente junto a bacterias (*Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*). En cinco de los 10 casos positivos, la neumonía constituyó el signo clínico predominante. Los AdV aislados en estos pacientes pertenecieron a las especies B (28.5%), todos serotipo AdV-3 (n=2) y C (71.4%) serotipos AdV-1(n=2) y AdV-2 (n=3), (Tabla IV.9).

Tabla IV.9 Número de casos positivos y negativos a la infección por AdV en muestras de LBA de pacientes cubanos infectados con el VIH

No. de Casos	Aislamientos Especie/tipo	Presentación clínica		Estadio clínico		Resultados a otros patógenos			
		Neum	OMR	VIH	SIDA	OVR	Bact.	Hongos	BAAR
AdV+ (n=10)	B/AdV3 C/AdV-1y 2	5	5	2	8	0	2	0	0
AdV- (n=11)	0	2	9	5	6	0	7	1	1
Total (n=21)	7	7	14	7	14	0	9	1	1

Fuente: LNVR.

Abreviaturas: Neum: neumonía, OMR: Otras manifestaciones respiratorias, OVR: Otros virus respiratorios (Influenza A, B y C y Virus sincitial respiratorio A y B), BAAR: Bacilos ácido-alcohol resistentes Bact: Bacterias.

La frecuencia de infección por AdV, encontrada en este estudio, resultó ser más elevada que la obtenida en otras investigaciones, que analizando el mismo tipo de muestra y pacientes, describen valores de un 3-20% (Conolly *et al.*, 1994; Rabella *et al.*, 1999). Consideramos que estas diferencias están relacionadas en primer término con las características de la población estudiada (pacientes hospitalizados, principalmente en fase SIDA) y en segundo lugar, con el método de diagnóstico empleado, que en nuestro caso fue la RCP que supera en sensibilidad a los métodos de cultivo utilizados en los estudios anteriores (Ison y Green, 2009). Fue sorprendente el hallazgo de que en 5 de los 8 pacientes donde los AdV se hallaron como único patógeno, las manifestaciones fueron más severas (neumonía) que donde se detectaron los AdV junto a otros patógenos. Este hecho unido al aislamiento en tres de estos cinco casos, nos sugiere que la presencia de AdV no fue evento casual. De forma general, este grupo de 8 casos, podrían representar pacientes donde los AdV sean la única causa de todos los síntomas y que los cinco pacientes con neumonía sean producto de la complicación de la infección viral. Tampoco es descartable que estos ocho casos sean representativos de pacientes en los que otros patógenos bacterianos fueran exitosamente tratados y que la presencia del virus fueran solo los restos de una infección persistente. En ambos casos,

nuestros hallazgos apoyan la contribución de los AdV a la severidad de la enfermedad respiratoria en el paciente inmunocomprometido, como es documentado en la literatura (Leen y Rooney, 2005; Lynch *et al.*, 2011).

En 7 de los 21 pacientes investigados, la neumonía fue el signo predominante y de estos en 5 fueron identificados los AdV, lo que confirma que el adecuado funcionamiento de ambas respuestas, humoral y celular es necesario para la eliminación viral, por ello que el hecho de que todos los pacientes fueran inmunocomprometidos, muchos de ellos con bajos conteos de CD4, los convierte en pacientes con mayor susceptibilidad a los virus respiratorios con una fuerte tendencia a causar complicaciones en el tracto respiratorio inferior (Jambo *et al.*, 2011).

Los AdV aislados pertenecieron a las especies B y C, que al igual que en otros estudios son las que usualmente se detectan en el tracto respiratorio de pacientes con inmunodeficiencias adquiridas como los trasplantados y pacientes VIH+ (Garbino *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2008). En el caso de la especie C, posiblemente la infección sea producto de una reactivación y en el caso de la B, producto de una infección adquirida en la comunidad y que puede ser transmitida a estos pacientes, cuyo debilitamiento inmunitario hacen más severas y prolongadas las manifestaciones clínicas (Hoffman, 2009).

El desarrollo de metodologías que empleen ensayos cuantitativos y generen patrones de carga viral serían más informativos con respecto al papel patogénico de los AdV, tales estrategias de RCP se han diseñado para la vigilancia, detección temprana y respuesta a la terapia en pacientes de alto riesgo (Aoki¹ *et al.*, 2011; Heim, 2011; Metzgar *et al.*, 2010).

V. DISCUSIÓN GENERAL

En este estudio se analizó el comportamiento de la infección por AdV dentro de las IRA, en pacientes con manifestaciones clínicas que van de leves a fatales, basados en la vigilancia epidemiológica, en una población representativa de todas las edades, durante un período de 9 años, se analizaron un considerable número de muestras provenientes de todo el país, lo que nos permite tener una valoración integral de la contribución actual de los AdV a las IRA en Cuba.

El análisis de los resultados, mostró una prevalencia general de un 16% con variaciones anuales (4-30%) que dependieron fundamentalmente de las condiciones ambientales y del método de diagnóstico empleado. La asociación de la infección por AdV con parámetros meteorológicos como la temperatura y las precipitaciones, sobre todo en países de clima tropical, se ha reflejado en investigaciones anteriores (Shuman, 2010). En este estudio, las condiciones climáticas tuvieron una marcada influencia en la ocurrencia de las infecciones por AdV, particularmente las precipitaciones, que se incrementaron en este período, haciendo más efectiva la transmisión en más de la mitad de los años.

Como se plantea en estudios anteriores, la prevalencia real de las infecciones respiratorias es subestimada por muchas razones, entre ellas, el método empleado para el diagnóstico (Stroparo *et al.*, 2010). Presumiblemente en este estudio, ocurrió de forma similar, en algunos años donde se emplearon la técnica de inmunofluorescencia y el cultivo celular como métodos únicos de diagnóstico, la prevalencia de la infección por AdV fue subestimada. Con la introducción de los métodos moleculares en el diagnóstico de rutina, el número de pacientes positivos a la infección detectados por los métodos moleculares fueron muy superiores al compararse con los resultados obtenidos con las técnicas clásicas mencionadas anteriormente.

Al igual que en otros estudios realizados a nivel mundial, la población pediátrica menor de 5 años resultó ser la más afectada, generalmente con infecciones que involucran al TRI (Louie *et al.*, 2008; Siminovich, 2011; Goins, 2011). Entre estas infecciones se encuentran la neumonía, la bronquiolitis y el crup como las de mayor severidad con índices elevados de hospitalización. Dentro de estas la neumonía alcanzó los porcentajes más altos (34%), produciendo casos fatales en individuos adultos inmunocompetentes, lo que confirma que la enfermedad producida por este agente puede presentarse de forma y en ocasiones fatal (Rodríguez *et al.*, 2007; Gencay *et al.*, 2010). Las neumonías por AdV, requieren de una atención especial en la infancia, se plantea que son una causa importante de enfermedades crónicas en el niño, dejando lesiones pulmonares permanentes hasta en un 50% de los casos (Gupta *et al.*, 2011). Estas lesiones condicionan un compromiso de la función pulmonar, que algunos autores han denominado daño pulmonar crónico. Su importancia está dada por ser una de las patologías respiratorias crónicas, complejas y de difícil manejo, siendo la primera causa de bronquiectasias y uso prolongado de oxígeno (Jennings *et al.*, 2008; Ruuskanen *et al.*, 2011).

La asociación de los AdV con las infecciones respiratorias del TRI, la aparición de complicaciones que involucran al SNC y casos fatales observados en este estudio, contribuirá, sin duda, a la toma de conciencia acerca de la importancia de este patógeno. Este elemento que pudiera parecer subjetivo, es un factor que ha incrementado la detección de este virus en numerosos estudios, donde la sospecha temprana y el diagnóstico oportuno han demostrado ser factores claves que definen el curso clínico de la enfermedad.

La determinación de las especies y serotipos que se muestran en este estudio, se realizaron a partir de aislamientos en cultivo celular, es decir, que nos ajustamos al criterio más estrecho de infección. Esta consideración parte del conocimiento de que los AdV pueden permanecer detectables en el tracto respiratorio y gastrointestinal después de la infección primaria y que su capacidad de ser un virus latente, le permite ser detectado por métodos moleculares, aún con bajos o ningún nivel de replicación. (Larcher *et al.*, 2006).

Los serotipos aislados correspondieron principalmente a la especie C (AdV-1, 2 y 5) y a la especie B (AdV-3). La circulación de la especie C mostró un marcado carácter

endémico, presentándose fundamentalmente de forma esporádica, en correspondencia con lo descrito en la literatura (Metzgar *et al.*, 2005). Sin embargo, la asociación significativa de uno de estos serotipos (AdV-5) con infecciones del tracto inferior constituyó una observación inesperada.

Resultó sorprendente la no circulación del serotipo AdV-7, a pesar de ser un serotipo de una amplia circulación mundial (Lee *et al.*, 2010; Mahadevan *et al.*, 2010). Este hallazgo, sustentado en otros estudios realizados en el laboratorio, alerta del peligro que puede constituir su introducción en Cuba, donde aparentemente existen bajos niveles de inmunidad en la población. Numerosos ejemplos avalan la virulencia de este serotipo asociado con la ocurrencia de enfermedades respiratorias severas y casos fatales, tanto de forma esporádica como epidémica, que han tenido lugar en países donde este serotipo comienza a circular dentro de una población susceptible, como ocurrió en Taiwan y en el Cono Suramericano (Kajon *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2004).

Aunque las IRA virales son generalmente no complicadas, el impacto acumulativo de tales enfermedades es considerable. En Cuba, las IRA constituyen la primera causa de consultas médicas y la neumonía se mantiene dentro de las cinco primeras causas de muerte. El país destina grandes esfuerzos y recursos económicos a la reducción de la mortalidad y de las complicaciones de estas infecciones, conocer la etiología y los factores de riesgo que condicionan su severidad son tareas primordiales del sistema nacional de salud. Es por ello que estudios que aporten datos acerca de la morbilidad, facilitan la adopción de estrategias médico sanitarias que permitan un mayor control y vigilancia de estas enfermedades.

A pesar, de que la participación de los AdV como agentes etiológicos en las miocarditis virales es reconocida en muchas investigaciones (Andreoletti *et al.*, 2009; May *et al.*, 2011), la ocurrencia de un brote de miocarditis por AdV es un evento inusual, de hecho, identificado por primera vez en Cuba (Valdés *et al.*, 2008). En nuestra opinión, consideramos que la ocurrencia de este brote fue un ejemplo donde convergieron todos los factores de riesgo que determinan la severidad de la infección por AdV, la edad, que condiciona el estado inmunológico y la acumulación de portadores virales, la presencia de enfermedades que favorecen la vulnerabilidad del hospedero, condicionando la expresión de los receptores celulares para el virus y

por último el serotipo infectante. Todo esto dentro de un contexto facilitado por una elevada circulación de AdV previo al brote debido al deterioro de las condiciones sanitarias por causas ambientales.

En este estudio, se reporta por primera vez en Cuba, el papel etiológico de los AdV en la CHA y se demuestra su circulación junto a los enterovirus dentro de una misma epidemia. En opinión de esta autora, no consideramos que este haya sido un evento nuevo, sino que por primera vez se investigó el papel de los AdV dentro de una epidemia de CHA. Sea este un hecho único o no estudiado anteriormente, los resultados mostrados, no dejan lugar a dudas acerca de la participación directa de estos virus en la enfermedad. Aunque la CHA no es una enfermedad que ofrezca peligro para la vida, tiene un costo social y económico elevado. Debido a la naturaleza altamente contagiosa de la enfermedad y el prolongado período de recuperación, la conjuntivitis conduce a una pérdida sustancial en la productividad del trabajo (Ong *et al.*, 2008). La intervención temprana en la transmisión haciendo énfasis en la vigilancia, la implementación de medidas higiénicas y la detección activa de los casos pueden ayudar a limitar la extensión de los brotes.

El incremento en la susceptibilidad de las infecciones, es un rasgo que distingue a los pacientes inmunocomprometidos (Ison y Green, 2009; Heim, 2011). En Cuba, no existen estudios previos del impacto de la infección por AdV en individuos infectados por el VIH. En este estudio, se pudo constatar como los AdV son importantes contribuyentes a la ocurrencia de estas infecciones, siendo la neumonía y la diarrea, dos de las enfermedades donde se demostró su participación. Como se refiere en otros estudios, las infecciones por AdV, tienen el potencial de causar ED y se consideran un problema serio en el cuidado del paciente inmunocomprometido (Hoffman, 2009). El hallazgo de una gran cantidad de cepas de la especie D, a diferencia del grupo control y la detección de cepas no tipificables, muestra como la infección por AdV en estos pacientes, exhibe patrones diferentes al hospedero inmunocompetente en términos de persistencia, severidad y espectro de serotipos encontrados (Echavarría, 2008). El uso de la terapia antirretroviral, que ahora tiene una amplia cobertura, podría restaurar parcialmente las deficiencias en la respuesta inmune y conllevar al descenso de estas infecciones. Sin embargo, se plantea que aún así, los pacientes podrían permanecer con un riesgo incrementado a las

infecciones respiratorias virales, especialmente si la capacidad para generar una respuesta antígeno- específico permanece dañada (Kojaoghlanian *et al.*, 2003). Esta hipótesis, sin duda necesita de investigaciones futuras para ser demostrada.

Del análisis de los resultados de este estudio se derivan algunas consideraciones que debemos tomar en cuenta, primero, a pesar de las enormes ventajas del diagnóstico molecular, que permitieron aumentar los porcentajes de detección, ganando en sensibilidad y rapidez, el empleo del aislamiento en cultivo, como el "gold standard" no debe ser abandonado, siempre que sea posible. Si partimos del hecho de que los AdV pueden ser detectados aún sin que sean la causa directa de la enfermedad, cuando se emplean métodos muy sensibles como la RCP, entonces la posibilidad de contar con el aislamiento sería una prueba más a favor de la certeza en la etiología. Además, es la única forma de recuperar y preservar el virus para la posterior identificación de la cepa viral circulante y los estudios de epidemiología molecular.

Segundo, el hallazgo de los AdV en manifestaciones clínicas como la neumonía y la bronquiolitis con elevados índices de hospitalización, ingreso en UCI con necesidad de ventilación mecánica, nos indican que aunque la prevalencia de ellos no es tan elevada como la reportada históricamente para los virus de la influenza y el VSR, el diagnóstico de tales enfermedades no debe ser limitado a estos virus. De manera similar ocurre con la miocarditis, la conjuntivitis hemorrágica y el síndrome neurológico infeccioso, donde en ocasiones se ha subvalorado el papel y la participación de los AdV.

Tercero, el valor de la tipificación a nivel de serotipo y genotipo. Dado que solo la tercera parte de los serotipos de AdV, causan enfermedades al hombre, el establecimiento de los serotipos reviste especial importancia para el estudio epidemiológico de la infección y su asociación con las manifestaciones clínicas, lo cual es importante en el caso de los pacientes inmunocomprometidos, donde la determinación del serotipo podría tener un valor pronóstico en el desarrollo de la ED. El estudio de los genotipos, ha cobrado especial importancia en los últimos 5 años, reflejado en el aumento de los informes acerca de la circulación de nuevas variantes antigénicas y genéticas, producto de la recombinación, asociadas a una mayor virulencia y con un gran potencial de diseminación epidémico (Walsh *et al.*, 2009;

Esposito *et al.*, 2010). Estas variantes, principalmente de los serotipos AdV-3 y 7, se han detectado con mayor frecuencia en las infecciones respiratorias y oculares emergiendo en diferentes regiones causando casos severos y fatales (Jones *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009; Ishiko y Aoki, 2009; Robinson *et al.*, 2009; Halstead *et al.*, 2011).

Cuarto, todas las muestras analizadas en este estudio, procedían de pacientes que presentaban síntomas compatibles con la infección por AdV (excepto los controles en el estudio del TGI en pacientes VIH+), es decir, que los porcentajes encontrados pudieran reflejar la incidencia real de la infección. No obstante, si partimos del conocimiento de que los AdV establecen infecciones persistentes en diversos tejidos y parénquimas del hospedero, aun cuando no sean la causa directa de los síntomas, nos indica la necesidad del establecimiento de los métodos de cuantificación viral, como la RCP-TR. La aplicación de estos métodos serían de extrema utilidad para establecer la dinámica de la infección, correlacionando la carga viral con las manifestaciones clínicas y definiendo un valor umbral patológico entre la infección latente y la infección activa. Este aspecto resulta significativo, en los pacientes inmunocomprometidos donde el conocimiento del tipo de infección marca la diferencia en cuanto al manejo clínico y la terapéutica electiva.

Además de lo presentado y discutido en este estudio que respalda a los AdV como patógenos de un impacto importante en la morbilidad de las infecciones respiratorias y otras enfermedades que afectan a la población cubana, adicionalmente, sería bueno señalar que en la actualidad los AdV se han asociado a un número de patologías agudas y crónicas. Dentro de estas podríamos señalar la obstrucción crónica de las vías respiratorias (Russkanen, 2011), la displasia pulmonar (Courocli, 2000), la miocardiopatía dilatada (Andreoletti *et al.*, 2009), el síndrome mononucleósico (Melón *et al.*, 2005), la leucemia linfoblástica aguda (Gustafsson *et al.*, 2007), la invaginación intestinal (Okimoto *et al.*, 2011), el síndrome de muerte súbita (Treacy *et al.*, 2010) y quizás de forma más enigmática al desarrollo de la obesidad (Atkinson, 2011).

El hecho de que los factores de riesgo que condicionan la enfermedad severa por los AdV (edad, serotipo, enfermedades subyacentes) no son modificables; de que en los últimos años, haya aumentado la población inmunocomprometida producto del

cáncer, el número de pacientes trasplantados y la epidemia del SIDA; así como la no existencia de una vacuna ni de un tratamiento efectivo, hacen muy complejo el escenario que debemos enfrentar en el futuro. Ante este panorama nada promisorio debemos considerar que nuestra mejor y única opción continúa siendo la vigilancia epidemiológica. Esta será un medio para la identificación del virus y la adopción rápida de medidas y estrategias de prevención que eviten su diseminación a nivel comunitario y hospitalario. Adicionalmente, nos permitirá identificar cambios en el patrón de circulación y la aparición de nuevas variantes genéticas que pudieran ser indicativos de una emergencia.

VI. CONCLUSIONES

- Los AdV son importantes contribuyentes a la etiología de las IRA, particularmente del tracto respiratorio inferior con elevados índices de hospitalización y casos fatales dentro de la población cubana.
- La infección por AdV se asoció significativamente a los niños menores de cinco años y a parámetros meteorológicos como la temperatura y las precipitaciones ocasionando infecciones esporádicas y epidémicas.
- En Cuba los serotipos de la especie C presentaron un comportamiento endémico característico de su circulación a nivel mundial y el serotipo 3 se asoció a brotes epidémicos.
- Se evidencia la importancia de incluir a los adenovirus en el diagnóstico etiológico de la miocarditis viral y la conjuntivitis hemorrágica aguda, al identificarse por primera vez como agentes causales dentro de estos síndromes.
- Se constató que la edad y las enfermedades de base constituyeron factores de riesgo en la severidad de las infecciones por AdV.
- Los AdV son agentes patógenos a tomar en cuenta en la etiología de las infecciones respiratorias y gastrointestinales que afectan al paciente VIH cubano.
- Las infecciones por AdV en Cuba poseen relevancia clínica y epidemiológica indicando la necesidad de desarrollar una vigilancia integral sistemática.

VII. RECOMENDACIONES

- Mantener una vigilancia sistemática sobre los patrones de circulación de los AdV, incluyendo el estudio de los genotipos, especialmente de la especie B que se asocia a una mayor severidad.
- Implementar la cuantificación viral en pacientes de riesgo con enfermedad severa para diferenciar entre la infección latente y la activa, así como establecer la dinámica de la infección (carga viral vs síntomas).
- Explorar el papel de los adenovirus en pacientes con otros tipos de inmunodeficiencias adquiridas.
- Incluir a los adenovirus en el diagnóstico diferencial de pacientes de riesgo con sospecha de infección viral, relacionadas a patologías producidas por estos virus.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta B, Valdés O, Piñón A, Savón C, Goyenechea A, González G, *et al.* Molecular characterization of adenoviral infections in Cuba: report of an unusual association of species D adenoviruses with different clinical syndromes. *Arch Virol* 2009; 154: 619-27.
- Adhikary AK, Inada T, Banik U, Numaga J, Okabe N. Identification of subgenus C adenoviruses by fiber-based multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 670-3.
- Al Qurashi YM, Guiver M, Cooper RJ Sequence typing of adenovirus from samples from hematological stem cell transplant recipients. *J Med Virol.* 2011; 83(11):1951-8.
- Albright AV, Soldan SS, González-Scarano F. Pathogenesis of human immunodeficiency virus induced neurological disease. *J Neurovirol* 2003; 9: 222-7.
- Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 498-505.
- Allibhai TF, Spinella PC, Meyer MT, Hall BH, Kofos D, Di geronimo RJ. Survival after prolonged pediatric extracorporeal mebrane oxygenation support for adenoviral pneumonia. *J Pediatr Surg* 2008; 43(8): e9-e11.
- Anderson EJ, Guzman-Cottrill JA, Kletzel M, Thormann K, Sullivan C, Zheng X, *et al.* High-risk adenovirus infected pediatric allogeneic hematopoietic progenitor cell transplant recipients and preemptive cidofovir therapy. *Pediatr Transplant* 2008; 12: 219-27.
- Andreoletti L, Leveque N, Boulagnon C, Brasselet C, Fornes P. Viral causes of human myocarditis. *Arch Cardiovasc Dis.* 2009; 102 (6-7): 559-68.
- Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* 2002; 102: 439–469.
- Aoki K, Kaneko H, Kitaichi N, Ohguchi T, Tagawa Y, Ohno S. Clinical features of adenoviral conjunctivitis at the early stage of infection. *Jpn J Ophthalmol.* 2011; 55(1):11-5.
- Aoki K, Tagawa Y. A twenty-one year surveillance of adenoviral conjunctivitis in Sapporo, Japan. *Int Ophthalmol Clin* 2002; 1(42): 49-54.
- Aoki¹ K, Benko M, Davison AJ, Echavarria M, Erdman DD, Harrach B, Kajon AE, Schnurr D, Wadell G. Toward an integrated human adenovirus designation system that utilizes molecular and serological data and serves both clinical and fundamental virology. *J Virol.* 2011; 85(11):5703-4.
- Aretz HT. Myocarditis: The Dallas criteria. *Hum Pathol* 1986; 18: 619-24.
- Ariga T, Shimada Y, Shiratori K, *et al.* Five new genome types of adenovirus type 37 caused epidemic keratoconjunctivitis in Sapporo, japan for more than 10 years, *J Clin Microbiol* 2005; 43 (2): 726- 32.
- Arnberg N. Adenovirus receptor: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev med Virol* 2009; 19: 165-178.
- Arnow PM, Hierholzer JC, Higbee J, Harris DH. Acute hemorrhagic conjunctivitis: among Vietnamese refugees on Guam. *Am J Epidemiol* 1977; 105(1): 68 – 74.

- Artieda J, Piñeiro L, González M, Muñoz M, Basterrechea M, Iturzaeta A, *et al.* A swimming pool- related outbreak of pharyngoconjunctival fever in children due adenovirus type 4, Gipuzkoa, Spain, 2008. *Euro surveill* 2009; 14:19-25.
- Artieda J, Montes M, Vicente D, Martínez C, Piñeiro L, Mendiola J. Brote de conjuntivitis folicular en un centro gerontológico. *Enferm Infecc microbiol Clin* 2010; 28 (10): 690-3.
- Atkinson RL. Human adenovirus-36 and childhood obesity. *Int J Pediatr Obes.* 2011; 6 Suppl 1:2-6.
- Audu R, Omilabu SA, Peenze I, Steele D. Viral diarrhea in young children in two districts in Nigeria. *Centr Afr J Med* 2002; 48: 59-63.
- Azar R, Varsano N, Mileguir F, Mendelson E. Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in Israel: Identification of two new genome types , Ad7K and Ad7d2. *J Med virol* 1998; 54: 291-9.
- Baboonian C, McKenna W. Eradication of Viral Myocarditis. *JACC* 2003; 42(3): 473-6.
- Banik U, Adhikary A, Suzuki E, Inada T and Okabe N. A multiplex PCR assay for rapid identification of Oculopathogenic Adenoviruses by amplification of the fiber and hexon genes. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (3): 1064-68.
- Barrero PR, Valinotto LE Tittarelli E, Mistchenko AS. Molecular typing of adenoviruses in pediatric respiratory infections in Buenos Aires, Argentina (1999–2010) *J Clin Virol* 2012; 53(2): 145-50.
- Baum S. Adenovirus. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of Infection Diseases.* 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone; 2005: 1853-41.
- Bell JA: Clinical manifestation of pharyngoconjunctival fever. *Am J Ophthalmol* 1957, 43:11–4.
- Benko M. Adenoviruses: Pathogenesis. En: Mahy. W. J. B and Van Regenmortel.V.H.M Editors. *Encyclopedia of Virology.* 3th edition. 2008; 24-9.
- Berk AJ. Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* 5th ed. Philadelphia (PA): Lippincott-Raven; 2007. P 2356-93.
- Berlutti F, Pantanella F, Natalizi T, Frioni A, Paesano R, Polimeni A, Valenti P. Antiviral properties of lactoferrin--a natural immunity molecule. *Molecules* 2011; 16(8):6992-7018.
- Bhisitkul DM, Todd KM, Listernick R. Adenovirus infection and childhood intussusception. *Am J Dis Child* 1992; 146:1331-3.
- Bicer S, Sahin GT, Koncay B, Gemici H, Siraneci R, Ozturk NY, Sevketoglu E. Incidence assessment of rotavirus and adenovirus associated acute gastroenteritis cases in early childhood. *Infect Med.* 2011; 19(2):113-9.
- Biere B, Schweiger B. Human adenoviruses in respiratory infections: sequencing of the hexón hypervariable region reveals high sequence variability. *J Clin Microbiol* 2010; 47(4): 366-71.

- Bil-Lula I, Ussowicz M, Rybka B, *et al.* Hematuria due to adenoviral infection in bone marrow transplant recipients. *Transplant Proc* 2010; 42(9): 3729-24.
- Bowles NG, Ni J, Keraney DL, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarthy R, *et al.* Detection of viruses in myocardial tissue by polymerase chain reaction, evidence of adenovirus as a common cause of Myocarditis in children and adults. *JACC* 2003; 42: 473-6.
- Bridges ND, Spray TL, Collins MH, Bowles NE, Towbin JA. Adenovirus infection in the lung results in graft failure after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 116(4):617–23.
- Broor S, Parveen S, Bharaj P, Prasad VS, Srinivasulu KN, Sumanth KM, *et al.* A prospective three- year cohort study of the epidemiology and virology of acute respiratory of children in rural India. *PLoS ONE* 2007; 6: e491.
- Bruj I, Farnik J, Sedmidubsky V. Epidemic of acute respiratory disease due to type 14 adenovirus [in Czech]]. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol* 1966; 15:165–71.
- Calabrese F, Rigo E, Milanesi O, Boffa GM, Angelini A, Valente M, *et al.* Molecular diagnosis of myocarditis and dilated cardiomyopathy in children: clinicopathologic features and prognostic implications. *Diagn Mol Pathol* 2002; 11:212-21.
- Callaway Z, Kim SH, Kim JY, Kim DW, Kim CK Adenovirus infection with serious pulmonary sequelae in Korean children. *Clin Respir J* 2011; 5(2):92-8.
- Camargo PR, Okay TS, Yamamoto L, Bárbaro JM, Lopes AA. Myocarditis in children and detection of viruses in myocardial tissue: Implications for immunosuppressive therapy. *International Journal of Cardiology* 2011; 148: 204–8.
- Cancio R, Savón C, Oropesa S, Abreu I, Martínez P, Hernández B, *et al.* Diagnóstico rápido de los principales virus respiratorios en ciudad de La Habana. *Rev Arg Microbiología* 2000; 32: 21-6.
- Cansino A. Bronquiolitis . *Pediatr Integral* 2004; VIII (1): 49-56.
- Carballal G, Videla C, Misirlian A, Requeijo PV, Aguilar MC. Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentines children. *BMC Pediatrics* 2002; 2 (6): 1-7.
- Carr MJ, Kajon AE, Lu X, Dunford L, O'Reilly P, Holder P, *et al.* Deaths Associated with Human Adenovirus-14p1 Infections, Europe, 2009–2010. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(8): 1402- 8.
- Caruso L, Yuen S, Smith J, Husain M, Opavsky MA. Cardiomyocyte-targeted overexpression of the coxsackie-adenovirus receptor causes a cardiomyopathy in association with beta-catenin signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48(6):1194-205.
- Casas I, Avellon A, Mosquera M, Jabado O, Echavarría JE, Campos RH, *et al.* Molecular identification of adenovirus in clinical samples by analyzing a partial hexón genomic región. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12): 6176-82.
- Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*; 1995 53: 25-36.

- Centers for Disease Control and Prevention. Acute respiratory disease associated with adenovirus serotype 14- four states, 2006–2007. *MMWR* 2007; 56: 1181-4.
- Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of adenovirus 14 respiratory illness—Prince of Wales Island, Alaska, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010; 59:6–10.
- Centers for Disease Control and Prevention. Two fatal cases of adenovirus- related illness in previously healthy young adults ---ilinois, 2000. *MMWR* 2001; 50: 553-5.
- Chaberny IE, Schnitzler P, Geiss HK, Wendt C: An outbreak of epidemic keratoconjunctivitis in a pediatric unit due to adenovirus type 8. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003, 24:514–9.
- Chang C.H, Lin KH, Sheu MM, Huang WL, Wang HZ, Chen CW. The change of etiological agents and clinical signs of epidemic viral conjunctivitis over an 18-year period in Southern Taiwan. *Graefe s' Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003; 241: 554-60.
- Chang SY, Lee CN, Lin PH, Huang HH, Chang LY, Ko W, *et al.* A community- derived outbreak of adenovirus type 3 in children in Taiwan between 2004 and 2005. *J Med Virol* 2008; 80(1):102-12.
- Chatterjee NK, Samsonoff WA, Balasubramaniam N, Rush-Wilson K, Spargo W, Church TM. Isolation and characterization of adenovirus 5 from the brain of an infant with fatal cerebral edema. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 830-3.
- Chatziandreu I, Gilmour KC, McNicol AM, *et al.* Capture and generation of adenovirus specific T cells for adoptive immunotherapy. *Br J Haematol* 2007; 136: 117–26.
- Cherry JD, Chen TK. Adenoviruses. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan SL, editors. *Textbook of pediatric infectious diseases*, 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders; 2009. pp. 1949–1972.
- Choi EH, Kim HS, Eun BW, *et al.* Adenovirus type 7 peptide diversity during outbreak, Korea, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(5):649–654.
- Clark TW, Fleet DH, Wiselka MJ. Severe community-acquired adenovirus pneumonia in an immunocompetent 44-year-old woman: a case report and review of the literature. *J Med Case Reports* 2011; 5(1):259.
- Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Pérez-Breña P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 2004; 72: 484–495.
- Coiras MT, Pérez- Breña P, Garia ML, Casas I. Simultaneous detection of Influenza A, B, and C viruses, Respiratory Syncytial Virus A and B and Adenovirus in clinical samples by multiplex RT-nested PCR assay. *J Virol Methods* 2003; 69: 132-44.
- Connolly MG, Baugham RP, Dohn MN, Linnemann CC. Recovery of viruses other than cytomegalovirus from bronchoalveolar lavage fluid. *Chest* 1994; 105: 1775-81.
- Cooper RJ, Hallett R, Tullo AB, Klapper PE. The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982-96. *Epidemiol Infect* 2000; 125(2):333–345.

- Couroucli XI, Welty SE, Ramsay PL, *et al.* Detection of microorganisms in the tracheal aspirates of preterm infants by polymerase chain reaction: association of adenovirus infection with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 2000; 47(2):225–232.
- Coyle PV, Ong GM, O'Neill HJ, Mc Caughey C, De OD, Mitchell F *et al.* A touchdown nucleic acid amplification protocol as an alternative to culture backup for immunofluorescence in the routine diagnosis of acute viral respiratory tract infections. *BMC Microbiol* 2004; 4:41
- Curlin ME, Huang M-L, Lu X, Celum CL, Sánchez J, Selke S, *et al.* Frequent Detection of Human Adenovirus from the Lower Gastrointestinal Tract in Men Who Have Sex with Men. *PLoS ONE* 2010; 5(6): e11321.
- Dalmas S, Pereyra ML, Pérez MC, Mateos S, Varela A, Chiparelli H, *et al.* Infección respiratoria aguda baja por Adenovirus en niños hospitalizados menores de dos años. *Arch Pediatr Urug* 2003; 74(1): 15-21.
- Damen M, Minnaar R, Glasius P, *et al.*: Real-time PCR with an internal control for detection of all known human adenovirus serotypes. *J Clin Microbiol* 2008, 46:3997–4003.
- Darr S, Madisch I, Heim A. Antiviral activity of cidofovir and ribavirin against the new human adenovirus subtype 14a that is associated with severe pneumonia. *Clin Infect Dis* 2008; 47:731–2.
- Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 2003; 84: 2895-2908.
- Day AS, McGregor MB, Henderson SJ, *et al.* Fatal adenoviral disease in siblings. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17. 83-5.
- De Azevedo J, Nascimento LR, Cortinovis MC, Oliveira SS, da Costa EV, da Silva. Characterization of species B adenoviruses isolated from fecal specimens taken from poliomyelitis-suspected cases. *J Clin Virol* 2004; 31: 248-52.
- Debiasi RL, Robinson BA, Lesser JS, Brown D, Long SC, Clarke P. Critical Role for Death-Receptor Mediated Apoptotic Signaling in Viral Myocarditis. *J Cardiac Fail* 2010; 16: 901-10.
- Deng J, Quian Y, Zhao LQ, Zhu RN, Wang F, Sun Y, *et al.* Identification and typing of adenoviruses from pediatric patients with acute respiratory infections in Beijing from 2003 to 2008. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2010; 48(10): 739-43.
- Dettemeyer R, Baasner B. Role of virus induced myocardial affections in sudden infant death syndrome: a prospective postern study. *Pediatr Res* 2004; 55: 947–52.
- Di Paolo NC, Miao EA, Iwakura Y, *et al.* Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 α -mediated proinflammatory macrophage response *in vivo* . *Immunity*. 2009; 31(1):110–21.
- Dietel M, Hofner N, Jansen L, Dorst M, Runnebaum IB. Novel splice variant CAR 4/6 of the coxsackie adenovirus receptor is differentially expressed in cervical carcinogenesis. *J Mol Med (Berl)*. 2011; 89(6):621-30.
- Doan ML, Mallory GB, Kaplan SL, *et al.* Treatment of adenovirus pneumonia with cidofovir in pediatric lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26(9):883–9.

- Du Prel JB, Puppe W, Grondahl B. Are meteorological parameters associated with acute respiratory tract infections? *Clin Infect Dis*. 2009; 49:861-868.
- **Dubberke, E. R., et al.** 2006. Acute meningoencephalitis caused by adenovirus serotype 26. *J. Neurovirol.* **12**:235–240.
- Duffy MR, Parker AL, Bradshaw AC, Baker AH. Manipulation of adenovirus interactions with host factors for gene therapy applications. *Nanomedicine* 2012; 7(2):271-88.
- Ebner K, M. Suda, F. Watzinger, T. Lion. Molecular detection and Qualitative of the Entire Spectrum of Human Adenoviruses by a two reaction Real-Time PCR Assay. *J Clin Microb* 2005; 7(43): 3049-53.
- Ebner K, Rauch M, Preuner S, Lion T. Typing of Human Adenoviruses in Specimens from Immunosuppressed Patients by PCR- Fragment Length Analysis and Real – Time Quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (8): 2808-15.
- Eccles R. An explanation for the seasonality of acute upper respiratory tract viral infection. *Acta Otolaryngol* 2002; 122: 183-91.
- Echavarría M. Adenoviruses in Immunocompromised Host. *Clin Microbiol Rev* 2008; 7704-15.
- Edmond K, Scott S, Korczak V, Ward C, Sanderson C, et al. Long Term Sequelae from Childhood Pneumonia; Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2012; 7(2): e31239.
- Enders JF, Bell JA, Dingle JH, et al. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science* 1956; 124:119-20.
- Engelmann I, Madisch I, Pommer H, Heim A: An outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by a new intermediate adenovirus 22/H8 identified by molecular typing. *Clin Infect Dis* 2006, 43: 64–6.
- Erad V, Huang ML, Ferrenberg J, et al. Quantitative real time PCR for the detection of adenovirus after T cell-replete hematopoietic cell transplantation: viral load as a marker of invasive disease. *Clin Infect Dis* 2007; 45:958–65.
- Ermand DD, Xu W, Gerber SI, Gray GC, Schnurr D, Kajon AE, et al. Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. *EID* 2002; 8 (3): 269-77.
- Excoffon KJ, Gansemer ND, Mobily ME, Karp PH, Parekh KR, Zabner J Isoform-specific regulation and localization of the coxsackie and adenovirus receptor in human airway epithelia. *PLoS ONE*. 2010; 5(3):e9909.
- Esposito DH, Gardner TJ, Schneider E, Stockman LJ, Tate JE, Panozzo CA, et al. Outbreak of pneumonia associated with emergent human adenovirus serotype 14 –southeast Alaska, 2008. *J Infect Dis*. 2010; 202:214-22.
- Faden H, Wilby M, Hainer ZD, Rush-Wilson K, Ramani R, Lamson D, Boromisa R. Pediatric Adenovirus Infection: Relationship of clinical spectrum, seasonal distribution and serotype. *Clinical Pediatrics* 2011; 50(6): 483-7.
- Fan LS, Chen G, Ma D. Research advance on role of Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) in tumor progression. *Ai Zheng*. 2009; 28(3):333-6.

- Ferreira GF, Oliveira RA, Lucon M, *et al.* Hemorrhagic cystitis secondary to adenovirus or herpes simplex virus infection following renal transplantation: four case report. *Transplant Proc* 2009; 41(10): 44416-9.
- Ferreyra L, Giordano M, Martinez L, Beatriz M, Barril P, Masachessi G, *et al.* A novel human adenovirus hexón protein of species D found in an AIDS patient. *Arch virol* 2010; 155: 27-35.
- Feuchtinger T, Richard C, Joachim S. Clinical grade generation of hexón specific T Cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunother* 2008; 31:199–206.
- Fianchi L, Scardocci A, Cattani P, *et al.* Adenovirus meningoencephalitis in a patient with large B-cell lymphoma. *Ann Hematol* 2003; 82:313-15.
- Fodha I, Chouikha A, peenze I, de Beer M, Dewar J, Geyer A, *et al.* Identification of viral agents causing diarrhea among children in the eastern center of Tunisia. *J Med Virol* 2006; 78: 1198- 1203.
- Fonseca MC, Sarmiento L, Resick A, Pereda N, Rodríguez H, Kourí V, *et al.* Isolation of Coxsackievirus A24 variant from patients with hemorrhagic conjunctivitis in Cuba 2008-2009. *J Clin Virol* 2012; 53: 77-81.
- Fox JP, Brandt CD, Wassermann FE, *et al.* The virus Watch program: a continuing surveillance of viral infection in metropolitan New York families. VI. Observation of adenovirus infections: virus excretion patterns, antibody response, efficiencies of surveillance, patterns of infection, and relation to illness. *Ann J Epidemiol* 1969; 89: 25-50.
- Fox JP, Hall CE, Cooney MK. The Seattle virus watch. VII. Observation of adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 1977; 105: 362-86.
- Frange P, Peffault de Latour R, Arnaud C, Boddaert N, Oualha M, Avettand-Fenoel V, *et al.* Adenoviral infection presenting as an isolated central nervous system disease without detectable viremia in two children after stem cell transplantation. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(6):2361-4.
- Frantzydou F, Pavlitou A, Mataftsi A, Dumaidi K, Georgiadis N. Molecular epidemiology of adenovirus strains isolated from patients with ocular disease in the area of Thessaloniki, Greece (1998-2002). *J Med Virol* 2005; 75: 440-6.
- Fu J, Li L, Bouvier M. Adenovirus E3-19K proteins of different serotypes and subgroups have similar, yet distinct, immunomodulatory functions toward major histocompatibility class I molecules. *J Biol Chem* 2011; 286(20):17631-9.
- Fuji S, Kapp M, Grigoleit GU, Einsele H. Adoptive immunotherapy with virus-specific T cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011 Sep; 24(3):413-9.
- Fujimoto T, Hamamoto I, Taniguchi K, Chikahira M, Okabe N. Molecular epidemiology of adenovirus type 3 detected from 1994 to 2006 in Hyogo prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61: 143-5.
- Fujita Y, Rooney CM, Heslop HE. Adoptive cellular immunotherapy for viral diseases. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41:193–8.

- Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 2003; 9: 1408–12.
- Gahery-Segard H, Farace F, Godfrin D, *et al.* Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity. *J Virol* 1998; 72: 2388-97.
- Ganzenmueller T, Buchholz S, Harste G, Dammann E, Trenchel R, Heim A. High lethality of human adenovirus disease in adult allogeneic stem cell transplant recipients with high adenoviral blood load. *J Clin Virol.* 2011; 52(1): 55-9.
- Garbino J, Gerbase MW, Wunderli W, Kolarova L, Nicod LP, Rochat T, *et al.* Respiratory Viruses and Severe Lower Respiratory Tract Complications in Hospitalized Patients. *Chest* 2004; 125: 1033-9.
- García-Montoya IA, Cendón TS, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(3): 226-36.
- Garnett CT, Erdman D, Xu W, Gooding LR. Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J Virol* 2002;76(21):10608–616.
- Gavin PJ, Katz BZ. Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children. *Pediatrics* 2002; 110: e9.
- Gencay M, Roth M, Christ-Crain M, Muller B, Tamm M, Stolz D. Single and multiple viral infections in lower respiratory tract infection. *Respiration* 2010; 80: 560-67.
- Gerber SI, Erdman DD, Pur SL, Diaz PS, Segreti J, Kajon A, *et al.* Outbreak of adenovirus genome type 7d2 infection in a pediatric chronic –care facility and tertiary –care hospital. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 694-700.
- Ghanaïem H, Averbuch D, Koplewitz BZ, Yatsiv I, Braun J, Dehtyar N, Wolf DG, Mandelboim M, Engelhard D. An outbreak of adenovirus type 7 in a residential facility for severely disabled children. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30(11):948-52.
- Gimenez-Alejandre M, Cascallo M, Bayo-Puxan N, Alemany R. Coagulation factors determine tumor transduction in vivo. *Hum Gene Ther* 2008; 19:1415–1419.
- Goins WP, Talbot HK, Talbot TR. Health care-acquired viral respiratory diseases. *Infect Dis Clin North Am* 2011; 25 (1): 227-44.
- Gonçalves G, Gouveia E, Mesquita JR, *et al.* Outbreak of acute gastroenteritis caused by adenovirus type 41 in a kindergarten. *Epidemiol Infect* 2011; 139(11): 1672-5.
- González GG, Liprandi F, Ludert JE. Molecular epidemiology of enteric viruses in children with sporadic gastroenteritis in Valencia, Venezuela. *J Med Virol.* 2011; 83(11):1972-82.
- Goyenechea A, Savón C, Oropesa S, Valdivia A, Rogés G. Estudio virológico de infecciones respiratorias agudas en Cuba durante la temporada de octubre de 1991 a septiembre de 1992. IV congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, Ciudad Habana, Cuba, 1993.
- Graci JD, Cameron CE. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol* 2006; 16: 37–48.
- Gray GC, Setterquist SF, Jirsa SJ, Desjardin LE, Ermand DD. Emergent Strain of human adenovirus endemic in Iowa. *EID* 2005; 11 (1): 127- 8.

- Gray GC, McCarthy T, Lebeck MG, Schnurr DP, Rusell KL, Kajon AE, *et al.* Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. *Clin Infect Dis.* 2007; 45: 1120-31.
- Gregory SM, Nazir SA, Metcalf JP. Implications of the innate immune response to adenovirus and adenoviral vectors. *Future Virol.* 2011; 6(3):357-374.
- Guo L, González R, Zhou H, Wu C, Vernet G, Wang Z, Wang J. Detection of three human adenovirus species in adults with acute respiratory infection in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(6): 1051-8.
- Gupta P, Tobias J, Goyal S, Hervie P, Harris J, Sadot E, *et al.* Prolonged mechanical support in children with severe adenoviral infection: a case series and review of literature. *J Intensive Care Med* 2011; 26(4):267-72.
- Gupta¹ P, Goyal S, Tobias JD, Prodhan P, Purohit P, Gossett JM, Chow V, Noviski N. Risk factors associated with hospital admission among healthy children with adenovirus infection. *Turk J Pediatr.* 2011; 53(6):597-603.
- Gurung R, Rai SK, Kurokawa M, Shrestha MK, Thakur J, Rai CK, Ruit S, Ono K. Acute hemorrhagic conjunctivitis epidemic-2003 in Nepal. *Nepal Med Coll J.* 2003; 5(2): 59-60.
- Gustafsson I, Lindblom A, Yun Z, *et al.* Quantification of adenovirus DNA in unrelated donor hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Virol* 2008; 43:79-85.
- Hakim FA, Tleyjeh IM: Severe adenovirus pneumonia in immunocompetent adults: a case report and review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008, 27:153-8.
- Hall CE, Brandt CD, Frothingham TE, Spigland I, Cooney MK, Fox JP. The virus watch program: a continuing surveillance of viral infection in metropolitan New York families. IX. A comparison of infection with several respiratory pathogens in New York and New Orleans families. *Ann J Epidemiol* 1971; 94: 367-85.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999; 41:95-98.
- Hall K, Blair Zajdel ME, Blair GE. Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. *Biochem J.* 2010; 431(3):321-36.
- Halstead DC, Gray GC, Meyer KS, Stanciu SR, Gorospe WC. Recombinant Adenovirus (AdV) Type 3 and Type 14 Isolated From a Fatal Case of Pneumonia. *Rev Med Microbiol.* 2010; 21(2):28-30.
- Hamada N, Gotoh K, Hara K, *et al.* Nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis accompanying environmental contamination with adenovirus. *J Hosp Infect* 2008; 68(3): 262-8.
- Hamdan S, Verbeke CS, Fox N, Booth J, Bottley G, Pandha HS, Blair GE. The roles of cell surface attachment molecules and coagulation Factor X in adenovirus 5-mediated gene transfer in pancreatic cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 2011; 18(7):478-88.
- Hanley PJ, Shaffer DR, Cruz CR, Ku S, Tzou B, Liu H, Demmler-Harrison G, Heslop HE, Rooney CM, Gottschalk S, Bollard CM. Expansion of T cells targeting multiple antigens of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and adenovirus to provide broad antiviral specificity after stem cell transplantation. *Cytotherapy.* 2011; 13(8):976-86.

- Harrach, B. Adenoviruses. En: Mahy. W. J. B and Van Regenmortel.V.H.M Eds. Encyclopedia of Virology. 3th edition. 2008; p. 1-8.
- Heemskerk B, Lankester AC, van Vreeswijk T, *et al.* Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viremia in pediatric stem-cell recipients. *J Infect Dis* 2005; 191(4):520–30.
- Heim A. Advances in the management of disseminated adenovirus disease in stem cell transplant recipients: impact of adenovirus load (DNAemia) testing. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2011; 9(11): 943–5.
- Henquell C, Boeuf B, Mirand A, *et al.* Fatal adenovirus infections in a neonate and transmission to health care workers. *J Clin Virol* 2009; 45(4): 345-8.
- Herrera DH, de la Hoz F, Mariño C, Ramirez E, López J, Vélez C. Adenovirus en Niños Menores de Cinco Años. Patrones de Circulación, Características Clínicas y Epidemiológicas en Colombia, 1997-2003. *Rev Salud Pub* 2007; 9(3): 420-9.
- Heydari H, Mamishi S, Khotaei GT, Moradi S. Fatal type 7 adenovirus associated with human bocavirus infection in a healthy child. *J Med Virol.* 2011; 83(10):1762-3.
- Hilleman MR, Werner JH. Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1954; 85: 183-8.
- Hoffman JA. Adenovirus infections in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant* 2009; 14: 625–33.
- Homma M, Inoue Y, Hasegawa Y, *et al.* Blood ribavirin concentration in high-dose ribavirin for adenovirus- induced haemorrhagic cystitis—a case report. *J Clin Pharm Ther* 2008; 33: 75–78.
- Hong JY, Lee H J, Piedra PA, Choi HE, Park KH, Koh YY. Lower respiratory tract infection due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1423-9.
- Horwitz MS. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, *et al.*, eds. *Fields Virology*, Vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:2301-26.
- Houng HS, Gong H, Kajon AE, Jones MS, Kuschner RA, Lyons A, *et al.* Genome sequences of human adenovirus 14 isolates from mild respiratory cases and a fatal pneumonia, isolated during 2006–2007 epidemics in North America. *Respir Res.* 2010; 11:116-20.
- Huang ML, Nguy L, Ferrenberg J, Boeckh M, Cent A, *et al.* Development of multiplexed real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detecting human adenoviruses. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62:263–71.
- Humar A, Kumar D, Mazzulli T, *et al*; PV16000 Study Group. A surveillance study of adenovirus infection in adult solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5(10):2555–9.
- Imai Y, Kameya S, Ohkoshi M, Yamaki K, sakuragi S. identification of the hexón región of an adenovirus involved in a new outbreak of keratoconjunctivitis. *J Clin Microbiol* 2001; 2975-7.
- Ishiko H, Aoki K. Spred of epidemic keratoconjunctivitis due to a novel serotype of human adenovirus in Japan. *J Clin Microbiol* 2009; 47(8): 2678-9.

- Ishiko H, Shimada Y, Konnot *et al.* Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Microbiol* 2008; 46(6): 2002-8.
- Ison G. Respiratory viral infections in transplant recipients. *Antiviral Therapy* 2007; 12: 627-38.
- Ison MG, Green M. Adenovirus in Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant* 2009; 9 (suppl 4): 161-5.
- Ivanova OE, Yurashko OV, Ereemeeva TP, Baikova OY, Morozova NS, Lukashev AN. Adenovirus isolation rates in acute flaccid paralysis patients. *J Med Virol*. 2012; 84(1):75-80.
- Jambo KC, Sepako E, Fullerton DG, Mzinza D, Glennie S, Wright AK, *et al.* Bronchoalveolar CD4+T cell responses to respiratory antigens are impaired in HIV infected adults. *Thorax* 2011; 66: 375-82.
- James L, Vernon MO, Jones RC, *et al.* Outbreak of human adenovirus type 3 infection in a pediatric long-term care facility—Illinois, 2005; *Clin Infect Dis* 2007; 45: 416–20.
- Jamil AJ, Teoh BT, Hassan EH, Roslan N, AbuBakar S. Molecular identification of adenovirus causing respiratory tract infection in pediatric patients at the University of Malaya Medical Center. *BMC Pediatr* 2010; 10: 46.
- Jartii T, Lethinen P, Vuorinen T, Koskenvuo M, Ruuskanen O. persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. *J Med Virol* 2004; 72: 695-9.
- Jennings LC, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Laing RT, Werno AM, *et al.* Incidence and characteristics of viral community-acquired pneumonia in adults. *Thorax*. 2008; 63:42–8.
- Jennings LC, Anderson TP, Werno AM, Beynon KA, Murdoch DR. Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: Role of PCR and demonstration of multiple infections. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23: 1003-1007.
- Jeon K, Kang CI, Yoon CH, *et al.* High isolation rate of adenovirus serotype 7 from South Korean military recruits with mild acute respiratory disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007; 26(7): 481-3.
- Ji W, Chen ZR, Guo HB, Wang MJ, Yan YD, Zhang XL, Ding YF. Characteristics and the prevalence of respiratory viruses and the correlation with climatic factors of hospitalized children in Suzhou children's hospital. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2011; 49(10):745-9.
- Johansson SM, Nilsson EC, Elofsson M, Ahlskog N, Kihlberg J, Arnberg N. Multivalent sialic acid conjugates Inhibit adenovirus type 37 from binding to and infecting human corneal epithelial cells. *Antiviral Res* 2007; 73: 92–100.
- Jones MS II, Harrach B, Ganac RD, Gozum MMA, de la Cruz WP, Riedel B, *et al.* New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol* 2007; 81: 5978-84.
- Jones MS, Hudson NR, Gibbins C, Fischer SL. Evaluation of Type-Specific Real-Time PCR Assays Using the LightCycler and J.B.A.I.D.S. for Detection of Adenoviruses in Species HAdV-C. *PLoS ONE*. 2011; 6(10):e26862.

- Jonhstone J, Majumdar S, Fox J and Marrie T. Viral infection in adults hospitalized with community acquired pneumonia: Prevalence, pathogens and presentation. *Chest* 2008; 134: 1141-48.
- Jonsson MI, Lenman AE, Frångsmyr L, Nyberg C, Abdullahi M, Arnberg N. Coagulation factors IX and X enhance binding and infection of adenovirus types 5 and 31 in human epithelial cells. *J Virol* 2009; 83: 3816–3825.
- Jordan WJ. The frequency of infection whith adenoviruses in a family study population. *Ann NY Acad Sci* 1957; 67: 273-8.
- Kajon AE, Mistchenko AS, Videla C, Hortal M, Wadell G, Avendano LF .Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the south cone of South America (1991–1994). *J MedVirol* 1996; 48: 151–6.
- Kajon AE, Lu X, Erdman DD, Louie J, Schnurr D, George KS, *et al.* Molecular epidemiology and brief history of emerging adenovirus 14 – associated respiratory disease in the United States.*J Infect Dis.* 2010; 202: 93-103.
- Kajon¹ AE, Dickson LM, Houng HS, Metzgar D, Lee V, Tan BH. Outbreak of febrile respiratory illness associated with adenovirus 11a infection in a Singapore military recruit training camp. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1438–41.
- Kandel R, Srinivasan A, D’Agata EM, Lu X, Erdman D, Jhung M. Outbreak of adenovirus type 4 infection in a long – term care facility of the elderly. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31(7): 755-7.
- Kaneko H, Maruko I, Iida T, Ohguchi T, Aoki K, Ohno S, *et al.* The possibility of human adenovirus detection from the conjunctiva in asymptomatic cases during Nosocomial infection. *Cornea* 2008; 27: 527-30.
- Kaneko H, Aoki K, Ishida S, Ohno S, Kitaichi N, Ishiko H, Fujimoto T, Ikeda Y, Nakamura M, Gonzalez G, Koyanagi KO, Watanabe H, Suzutani T. Recombination analysis of intermediate human adenovirus type 53 in Japan by complete genome sequence. *J Gen Virol* 2011; 92(Pt 6):1251-9.
- Kaufman HE. Adenovirus advances: new diagnostic and therapeutic options. *Curr Opin Ophthalmol* 2011; 22(4): 290-3.
- Kelsey DS. Adenovirus meningoencephalitis. *Pediatrics* 1978; 61: 291-3.
- Kendall EJC, Riddle RW, Tuck HA, Rodan KS, Andrews BE, McDonald JC. Pharyngo-conjunctival fever: school outbreaks in England during the summer of 1955 associated with adenovirus types 3, 7, and 14. *BMJ* 1957; 2:131–6.
- Keswani M, Moudgil A. Adenovirus associated hemorrhagic cystitis in a pediatric renal transplant recipient. *Pediatr Transplant* 2007; 11(5): 568-71.
- Kim MR, Lee HR, Lee MG. Epidemiology of acute viral respiratory tract infection in Korean children. *J Infect* 2000; 41:152-8.
- Kim SR, Ki CS, Lee NY. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *J Virol Methods* 2009; 156: 111-6.

- Kim YJ, Hong JY, Lee HJ, *et al.* Genoma type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children. *J Clin Microbiol* 2003; 41(10): 4594-9.
- Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, *et al.* Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 2008; 118: 639–48.
- Knowlton KU, Lim BK. Viral Myocarditis: Is Infection of the Heart Required? *JACC* 2009; 53(14): 1227-8.
- Kosulin K, Haberler C, Hainfellner JA, Amann G, Lang S, Lion T. Investigation of adenovirus occurrence in pediatric tumor entities. *J Virol* 2007; 81(14): 7629-35.
- Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz M. The impact of Adenovirus infections on the immunocompromised host. *Rev Med Virol.* 2003; 13:155-71.
- Kuhl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Nautas M, Poller W, *et al.* Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005; 112: 1965-70.
- Kunz AN, Ottolini M. The role of adenovirus in respiratory tract infections. *Curr Infect Dis Rep.* 2010; 12(2):81-7.
- Kurokawa M, Rai SK, Ono K, Gurung R, Ruit S. Viral investigation of acute hemorrhagic Conjunctivitis outbreak (2003) in nepal using Molecular methods. *Nepal Med Coll J.* 2006; 37 (5): 904-10.
- La Rosa AM, Champlin RE, Mirza N, Gajewski J, Giralt S, Rolston KV, *et al.* Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clin Infect Dis* 2001; 32(6):871-6.
- La Rosa G, Muscillo M, Iaconelli M, Di Grazia A, Fontana S, Sali M, *et al.* Molecular characterization of human adenoviruses isolated in Italy. *New Microbiologica* 2006; 29: 177-84.
- Landry M, Lebeck M, Capuano A, McCarthy T and Gray G. Adenovirus Type 3 Outbreak in Connecticut Associated with a Novel Variant. *J Med Virol* 2009; 81(8):1380-4.
- Lankester AC, Heemskerk B, Claas EC, *et al.* Effect of ribavirin on the plasma viral DNA load in patients with disseminating adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 2004; 38:1521-5.
- Lappalainen S, Ylitalo S, Arola A, Halkosalo A, Räsänen S, Vesikari T. Simultaneous presence of human herpesvirus 6 and adenovirus infections in intestinal intussusception of young children. *Acta Paediatr.* 2012; 101(6):663-70.
- Larcher C, Jeller V, Fischer H, Huemer HP. Prevalence of respiratory viruses, including newly identified viruses, in hospitalised children in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25(11): 681-6.
- Larrañaga C, Kajon A, Villagra E, Avendaño LF. Adenovirus surveillance on children hospitalized for acute lower infections in Chile (1988-1996). *J. Med. Virol.* 2000; 60: 342-6.
- Lebeck MG, McCarthy TA, Capuano AW, Schnurr DP, Landry ML, Setterquist SF, *et al.* Emergent US adenovirus 3 strains associated with and epidemic and serious disease. *J Clin Virol.* 2009; 46:331-6.

- Lee J, Choi EH, Lee HJ. Clinical severity of respiratory adenoviral infection by serotypes in Korean children over 17 consecutive years (1991–2007). *J Clin Virol* 2010; 49(2): 115-20.
- Lee¹ J, Choi EH, Lee HJ. Comprehensive serotyping and epidemiology of human adenovirus isolated from the respiratory tract of Korean children over 17 consecutive years (1991–2007). *J Med Virol* 2010; 82: 624-31.
- Leen AM, Rooney CM: Adenovirus as an emerging pathogen in immunocompromised patients. *Br J Haematol* 2005, 128:135–44.
- Lema CL, Cisterna DM, Freire MC. Enfermedad neurológica por Adenovirus. *Medicina (Buenos Aires)*. 2005; 65: 196-200.
- Lenaerts L, De Clercq E and Naesens L. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev Med Virol* 2008; 18: 357-74.
- Leruez-Ville M, Chardin – Ouachée M, Neven B *et al.* Description of an adenovirus A31 outbreak in a paediatric haematology unit. *Bone marrow Transplant* 2006; 38(1): 23-8.
- Lesser J, Reich NG, Brookmeyer R, *et al.*: Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systemic review. *Lancet Infect Dis* 2009, 9:291–300.
- Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H, Suzuki E, *et al.* Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol* 2005; 49(2): 121-8.
- Li QG, Wadell G. Analysis of 15 different genome types of adenovirus type 7 isolated on five continents. *J Virol* 1996; 60: 331-5.
- Lien-Do, van Doorn HR, Nghiem MN, Bryant JE, Hoang TH, *et al.* Viral Etiologies of Acute Respiratory Infections among Hospitalized Vietnamese Children in Ho Chi Minh City, 2004–2008. *PLoS ONE* 2011; 6(3): e18176.
- Lin KH, Lin YC, Chen HL, Ke GM, Chiang CJ, Hwang KP, *et al.* A two decade survey of respiratory adenovirus in Taiwan: reemergence of adenovirus types 7 and 4. *J Med Virol*. 2004; (73): 274-9.
- Lindemans CA, Leen AM, Boelens JJ. How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood* 2011; 116(25): 5476–85.
- Lion T, Baumgartner R, Watzinger F, Matthes- martin S, Suda M, Preuner S, *et al.* Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits an early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 2003; 102: 1114-20.
- Lion T, Kosulin K, Landlinger C, Rauch M, Preuner S, Jugovic D, *et al.* Monitoring of adenovirus load in stool by real-time PCR permits early detection of impending invasive infection in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2010; 1-9.
- Lord A, Bailey AS, Klapper PE, Snowden N, Khoo SH. Impaired Humoral Responses to Subgenus D Adenovirus Infections in HIV- positive Patients. *J. Med. Virol.* 2000; 62: 405- 9.
- Louie JK, Kajon AE, Holodniy M, Guardia-LabarL, Lee B, Petru AM, *et al.* Severe pneumonia due to adenovirus serotype 14: a new respiratory threat? *Clin Infect Dis* 2008; 46:421–5.

- Lu X, Erdman DD. Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. *Arch Virol* 2006; 151: 1587–1602.
- Luiz LN, Leite JP, Yokosawa J, Carneiro BM, Pereira Filho E, Oliveira TF, *et al.* Molecular characterization of adenoviruses from children presenting with acute respiratory disease in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil, and detection of an isolate genetically related to feline adenovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105(5):712-6.
- Lukashok S, Horwitz MS. Adenovirus persistence. In: Ahmed R, Chen I, eds. *Persistent Viral Infections*. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2006:147-64.
- Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Ann Rev Immunol* 2007; 25: 619–647.
- Lynch JP, Fishbein M, Echavarria M. Adenovirus. *Sem Resp Critical Care Med* 2011; 32(4): 494-511.
- Lyons A, Longfield J, Kuschner R, *et al.*: A double-blinded, placebo-controlled study of the safety and immunogenicity of live, oral type 4 and type 7 adenovirus vaccines in adults. *Vaccine* 2008, 26:2890–8.
- Madisch I, Wolfel R, Harste G, Pommer H, Heim A. Molecular identification of adenovirus sequences: a rapid scheme for early typing of human adenoviruses in diagnostic samples of immunocompetent and immunodeficient patients. *J Med Virol* 2006; 78: 1210-7.
- Magwalivha M, Wolfaardt M, Kiulia NM, Van- Zil WB, Mwenda JM, Taylor MB. High prevalence of species D human adenoviruses in fecal specimens from urban Kenyan children with diarrhea. *J Med Virol* 2010; 82: 77-84.
- Mahadevan P, Seto J, Tibbetts C, Seto D. Natural variants of human adenovirus type 3 provide evidence for relative genome stability across time and geographic space. *Virology* 2010; 397: 113-8.
- Mahony J, Chong S, Merante F, *et al.* Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:2965–70.
- Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21:716–47.
- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, edn 7. Philadelphia: Elsevier; 2009.
- Maranhao AG, Soares CC, Albuquerque MC, Santos N. Molecular epidemiology of adenovirus conjunctivitis in Rio de Janeiro, Brazil, between 2004 and 2007. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009; 51(4): 227-9.
- Marttila M, Persson D, Gustafsson D, *et al.* CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol* 2005; 79: 14429–36.
- Matsui K, Saha S, Saitoh M, *et al.* Isolation and identification of adenovirus from conjunctival scrapings over a two year period (between 2001 and 2003) in Yokohama, Japan. *J Med Virol* 2007; 79(2): 200-5.

- May LJ, Patton DJ, Fruitman DS. The evolving approach to paediatric Myocarditis: a review of the current literature. *Cardiol Young* 2011; 28: 1-11.
- Mayeur N, Srairi M, Tetu L, Frugier CG, Fourcade O, Dahan M. Lethal hemorrhagic alveolitis after adenovirus pneumonia in a lung transplant recipient. *Heart Lung*. 2012; 41(4): 401-3.
- McNees AL, Mahr JA, Ornelles D, *et al.* Postinternalization inhibition of adenovirus gene expression and infectious virus production in human T-cell lines. *J Virol* 2004; 78:6955-66.
- Mejia H, Santacruz C, Matías M. Genetic characterization of adenovirus isolated from follicular conjunctivitis and epidemic keratoconjunctivitis in a group of mexican patients. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2008; 83: 161-8.
- Melón S, Méndez S, Iglesias B, *et al.* Involvement of adenovirus in clinical mononucleosis-like syndromes in young children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24(5):314-8.
- Meteorología Id. El Clima de Cuba. Características generales Ciudad de la Habana; 2010 [updated 2010; cited 20 Enero]; Available from: <http://www.met.inf.cu>
- Metzgar D, Osuna M, Yingst S, Rakha M, Earhart K, Elyan D, *et al.* PCR analysis of Egyptian respiratory adenovirus isolates, including identification of species, serotypes and coinfections. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11): 5743-52.
- Metzgar D, Osuna M, Kajon AE, Hawksworth AW, Irvine M, Russell KL. Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers. *J Infect Dis* 2007; 196: 1465-73.
- Metzgar D, Skochko G, Gibbins C, *et al.*: Evaluation and validation of a real-time PCR assay for detection and quantitation of human adenovirus 14 from clinical samples. *PLoS ONE* 2009, 4:e7081.
- Metzgar D, Gibbins C, Hudson NR, Jones MS. Evaluation of multiplex type-specific real-time PCR assays using the Light- Cyclers and joint biological agent identification and diagnostic system platforms for detection and quantitation of adult human respiratory adenoviruses. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:1397- 403.
- Mevzos LM, Il'ina TS, Makhmudov OS, Zolotarskaia EE, Drizin RS. An outbreak of acute respiratory infections among adults caused by adenovirus serotype 14 [in Russian]. *Vopr Virusol* 1966; 11:426-31.
- Minosse C, Selleri M, Zaniratti MS, Cappiello G, Longo R, Schifano E, *et al.* Frequency of detection of respiratory viruses in the lower respiratory tract of hospitalized adults. *J Clin Virol* 2008; 42: 215-20.
- MINSAP. Anuario estadístico de salud. República de Cuba 2011.
- Miyamoto SD, Brown RD, Robinson BA, Tyler KL, Long CS, DeBiasi RL. Cardiac cell-specific apoptotic and cytokine responses to virus infection: determinants of myocarditic phenotype. *J Card Fail* 2009; 15: 529-39.
- Mochizuki K, Katada T, Ohkusu K, Kaneko H. Three cases of acute conjunctivitis caused by human adenovirus in medical workers. *Kansenshogaku Zasshi (Abstract)* 2010; 84 (4): 469-73.

- Morfin F, Dupuis-Girod S, Frobert E *et al.* Differential susceptibility of adenovirus clinical isolates to cidofovir and ribavirin is not related to species alone. *Antiviral Ther* 2009; 14(1): 55–61.
- Mori K, Yoshihara T, Nishimura Y, *et al.* Acute renal failure due to adenovirus –associated obstructive uropathy and necrotizing tubulointerstitial nephritis in a bone marrow transplant recipient. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31(12): 1173-6.
- Moulik M, Breinholt JP, Dreyer WJ, *et al.* Viral endomyocardial infection is an independent predictor and potentially treatable risk factor for graft loss and coronary vasculopathy in pediatric cardiac transplant recipients. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56(7):582–92.
- Moura PO, Roberto AF, Hein N, *et al.* Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in Sao Paulo, Brazil. *J Med Virol* 2007; 79(2):174–81.
- Moyo SJ, Gro N, Kirsti V, Matee MI, Kitundu J, Maselle SY, Langeland N, *et al.* Prevalence of enteropathogenic viruses and molecular characterization of group A rotavirus among children with diarrhea in Dar es Salaam Tanzania. *BMC Public Health* 2007; 7: 356.
- Murtagh P, Cerqueiro C, Halac A, Avila M, Kajon A. Adenovirus type 7h respiratory infections: a report of 29 cases of acute lower respiratory disease. *Acta Paediatr* 1993; 82(6-7):557–61.
- Nemerow GR, Pache L, Reddy V, Stewart PL. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virol* 2009; 384: 380-8.
- Neofytos D, Ojha A, Mookerjee B, Wagner J, Filicko J, Ferber A, *et al.* Treatment of adenovirus disease in stem cell transplants recipients with cidofovir. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 74-81.
- Nepomuceno RR, Pache L, Nemerow GR. Enhancement of gene transfer to human myeloid cells by adenovirus- fiber complexes. *Mol Ther* 2007; 15: 571-8.
- Nichols WG, Campbell AJP, Boeckh M. Respiratory viruses other than influenza: impact and therapeutic advances. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:274–90.
- O’Flanagan D, O’Donnell J, Domegan L, Fitzpatrick F, Connell J, Coughlan S. First reported cases of human adenovirus serotype 14p1 infection, Ireland, October 2009 to July 2010. *Euro Surveill* 2011; 16 (8)1980-1.
- Ochiai RM, Shimada Y, Konno T, Yamazaki S, Aoki K, Ohno S, *et al.* Quantitative detection and rapid identification of human adenoviruses. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3): 958-66.
- Odivre MH, Dankova N, Picard C, Mesples B, BenCheikha Z, Avran D, De Blic J, Leruez-Ville M, Parez N. Pneumonia due to adenovirus type 7: a case report in a healthy infant. *Arch Pediatr.* 2011; 18(7):772-7.
- Ohtsuki N, Kimura S, Nezu A. Three cases with encephalopathy related with adenovirus type 7 infection. *No To Hattatsu* 2000; 32: 68-72.
- Otori NP, Michaels MG, Jaffe R, Williams P, Yousem SA. Adenovirus pneumonia in lung transplant recipients. *Hum Pathol* 1995; 26(10):1073–1079

- Okimoto S, Hyodo S, Yamamoto M, Nakamura K, Kobayashi M. Association of viral isolates from stools samples with intussusceptions in children. *Int J Infect Dis* 2011; 15(9): 641-5.
- Olive M, Eisenloh R, Flomenberg P. Quantitative analysis of Adenovirus specific CD4+ T-cell responses from healthy adults. *Viol Immunol* 2001; 14: 403–13.
- Omar N, Hammouda E, Akanuma M, Ohguchi T, Ariga T, *et al.* Molecular epidemiology of adenoviral keratoconjunctivitis in Saudi Arabia. *Mol Vis* 2010; 16: 2132-6.
- Ong AE, Dashraath P, Lee VJ. Management of enteroviral conjunctivitis outbreaks in the Singapore military in 2005. *Emerg Infect Dis* 2008; 39 (3): 398-403.
- Onishi H. Lactoferrin delivery systems: approaches for its more effective use. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011; 8(11):1469-79.
- Ooi HM, Wong SC, Clear D, Perera D, Krishnan S, Preston T, *et al.*, Adenovirus type 21-associated acute flaccid paralysis during an outbreak of hand-foot-and mouth disease in Sarawak, Malaysia. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 550-9.
- Pabbaraju K, Wong S, Fox JD. Detection de adenoviruses. *Methods Mol Biol* 2011; 665: 1-15.
- Paolino K, Sande J, Perez E *et al.* Eradication of disseminated adenovirus infection in a pediatric hematopoietic stem cell transplantation recipient using the novel antiviral agent CMX001. *J Clin Virol* 2011; 50(2), 167–70.
- Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis.* 2011; 52 Suppl 4:S284-9.
- Peng D, Zhao D, Liu J, Wang X, Yang K, Xicheng H, Li Y, Wang F. Multipathogen infections in hospitalized children with acute respiratory infections. *J Virol* 2009; 29(6):155-9.
- Perlman J, Gibson C, Pounds SB, *et al.* Qualitative real time PCR detection of adenovirus in clinical blood specimens: a comparison of plasma, whole blood and peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Virol* 2007; 40:295–300.
- Persson BD, Reiter DM, Marttila M, *et al.* Adenovirus type 11 binding alters the conformation of its receptor CD46. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 164–6.
- Plot L, Amital H. Infectious associations of Celiac disease. *Autoimmun Rev.* 2009; 8(4):316-9.
- Potter RN, Cantrell JA, Mallak CT, Gaydos JC. Adenovirus-associated Deaths in US Military during Postvaccination Period, 1999-2010. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18(3):507-9.
- Pumariega T, Savón C, Muné M, Cancio R, González G, Valdivia A, *et al.* Isolation and Identification of Adenovirus in Hospitalized Children, Under five years, with Acute Respiratory Disease, in Havana, Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2000; 95 (6):859-61.
- Qurei L, Seto D, Salah Z, Azzeh M. A Molecular Epidemiology Survey of Respiratory Adenoviruses Circulating in Children Residing in Southern Palestine. *PLoS ONE* 2012; 7 (8): e42732.

- Rabella N, Rodríguez P, Labeaga R, Otequi M, Mercader M, Gurqui M, *et al.* Conventional respiratory viruses recovered from immunocompromised patients: clinical considerations. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1043- 8.
- Rebelo de Andrade H, Pereira C, Giria M, Prudencio E, Brito MJ, Cale E, *et al.* Outbreak of acute respiratory infections among infant in lisbon, Portugal caused by human adenovirus serotype 3 and new 7/3 recombinant strain. *J Clin Microbiol* 2010; 48 (4): 1391-6.
- Reina J, Ferres F, Gutiérrez O, Ruiz de Gopegui E, González-Cardenas M. Estudio de las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones respiratorias por adenovirus en una población infantil. *An Pediatr* 2004; 61(2): 137-42.
- Reither K, Ignatius R, Weitzel T, Seidu-Korkor A, Anyidoho L, Saad E, *et al.* Acute childhood diarrrea in northern Ghana: epidemiological, clinical, and microbiological characteristics. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 104.
- Ren L, González R, Wang Z, Xiang Z, Wang Y, Zhou H, *et al.* Prevalence of human respiratory viruses in adult with acute respiratory tract infections in Beijing 2005-2007. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 1146-53.
- Rezig D, Bhari O, Ben Ayed N, Ben Yahia A, Sardaoui A, Ayed S, Triki H. Identification of adenoviruses serotypes implicated in haemorrhagic conjunctivitis in Tunisia. *Pathol Biol* 2006; 54: 561-5.
- Robin M, Marque-Juillet S, Scieux C, Peffault de Latour R, Ferry C, Rocha V, *et al.* Disseminated adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and outcome. *Haematologica* 2007; 92: 1254-7.
- Robinson CM, Rajaiya J, Walsh MP, Seto D, Dyer DW, Jones MS, Chodosh J. Computational analysis of human adenovirus type 22 provides evidence for recombination between human adenoviruses species D in the penton base gene. *J Virol*, 2009; 83 (17): 8980-5.
- Robinson CM, Singh G, Henquell C, Walsh MP, Peigue-Lafeuille H, *et al.* Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality. *Virology* 2011; 409: 141-7.
- Robinson¹ CM, Seto D, Jones MS, Dyer DW, Chodosh J. Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infect Genet Evol.* 2011; 11(6):1208-17.
- Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, *et al.* The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* 1998; 72: 7909–15.
- Rojas LJ, Jaramillo CA, Mojica MF, Escalante MP, Delgado P. Molecular typing of adenovirus circulating in a Colombian pediatric population with acute respiratory infection. *Epidemiol Infect* 2011; 7: 1-5.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gillmore LK. Isolation of citopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp Biol Med.* 1953; 84: 570-3.
- Rusell KL, hawksworth AW, Ryan MA, *et al.* Vaccine-preventable adenoviral respiratory illness in US military recruits 1999-2004. *Vaccine* 2006; 24(15): 2835-42.

- Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet* 2011; 377(9773): 1264-75.
- Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG, *et al.* Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods* 2005; 126: 101-9.
- Sarantis H, Johnson G, Brown M, Petric M, Tellier R. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3963–9.
- Savón C, Muné M, Goyenechea A, Valdivia A, Soto Y, Pérez L. Conjuntivitis Folicular por adenovirus, caracterización por endonucleasas de restricción. *Rev Cub Med Trop* 1995; 47 (3):193-5.
- Savón C. en Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. OPS-OMS-IPK 2003; p 23-30.
- Schultheiss HP, Kuhl U. Overview on chronic viral cardiomyopathy/ chronic myocarditis. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2006 (55):3-18.
- Schwarze J, O'Donnell DR, Rohwedder A, Openshaw PJ. Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 801-5.
- Sdiri-Loulizi K, Gharbi- Khelifi H, de Rougemont A, Chouchhane S, Sakly N, Ambert-Balay K, *et al.* Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric virus in Tunisia. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1349-55.
- Selvaraju M, Kovac M, Dickison LM, Kajon AE, Selvarangan R. Molecular epidemiology and clinical presentation of human adenovirus infection in Kansas city children. *J Clin Virol* 2011; 51(2): 126-31.
- Sendra- Gutierrez JM, Martin – Rios D, Casas I, Saéz P, Trovar A, Moreno C. An outbreak of adenovirus type 8 keratoconjunctivitis in a nursing home in Madrid. *Euro Surveill* 2004; 9(3): 27-30.
- Sethuraman U, Kamat D. The Red Eye: evaluation and management *Clin Pediatrics* 2009; 48(6): 588-600.
- Sharma P, Kolawole AO, Wiltshire SM, Frondorf K, Excoffon KJ. Accessibility of the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) and its importance in adenovirus gene transduction efficiency. *J Gen Virol*. 2011; 93(Pt1): 155-8.
- Shi Y, Chen C, Lisewski U, *et al.* Cardiac deletion of the Coxsackievirus adenovirus receptor abolishes Coxsackievirus B3 infection and prevents myocarditis in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1219–26.
- Short JJ, Vasu C, Holterman MJ, Curiel DT, Pereboev A. Members of adenovirus species B utilizes CD80 and CD86 as cellular attachment receptors. *Virus Res* 2006; 122: 144-53.
- Shuman EK. Global Climate Change and Infectious Diseases. *N Engl J Med* 2010; 362: 1061- 3.
- Silva RC, Benati FG, Pena GP, Santos N. Molecular characterization of viruses associated with gastrointestinal infection in HIV- positive patients. *Braz J Infect Dis* 2010; 14(6): 549-52.

- Siminovich MH, Murtagh PS. Acute lower respiratory infections by adenovirus in children. Histopathological findings in 18 fatal cases. *Pediatr Dev Pathol* 2011; 14(3): 214-7.
- Sirena D, Lilienfeld B, Eisenhut M, *et al.* The human membrane cofactor CD46 Is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J Virol* 2005; 78: 4454–62.
- Smith CA, Woodruff LS, Kitchingman GR. Extensive cross-reactivity of Adenovirus-specific cytotoxic cells. *Hum Gene Ther* 1998; 9:1419–27.
- Smith JG, Nemerow GR. Mechanism of adenovirus neutralization by human α -defensins. *Cell Host Microbe*. 2008; 3(1):11–19.
- Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, Nemerow GR. Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010; 343: 195–224.
- Soeur M, Wouters A, Saint-Georges A. Meningoencephalitis and meningitis due to an adenovirus type 5 in two immunocompetent adults. *Acta Neurol Belg* 1991; 91:141-50.
- Spjut S, Qian W, Bauer J, Storm R, Frängsmyr L, Stehle T, Arnberg N, Elofsson M. A potent trivalent sialic acid inhibitor of adenovirus type 37 infection of human corneal cells. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011; 50(29):6519-21.
- Stecker K, Vieth M, Koschel A, Wiedenmann B, Racken C, Anders M. Impact of the coxsackievirus and adenovirus receptor on the adenoma-carcinoma sequence of colon cancer. *Br J Cancer*. 2011; 104(9):1426-33.
- Stock R, Harste G, Madisch I, Heim A. A rapid PCR based assay for testing antiviral agents against human adenoviruses demonstrates type specific differences in ribavirin activity. *Antivir Res* 2006; 72:34–41.
- Storsley L, Gibson IW. Adenovirus interstitial nephritis and rejection in an allograft. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22(8):1423-7.
- Straliotto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fisher GB, Cunha ML and Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Revista da Sociedade de Brasileira de Medicina Tropical*. 2002; 35(4): 283-291.
- Straussberg R, Harel L, Levy Y, Amir J. A syndrome of transient encephalopathy associated with adenovirus infection. *Pediatrics* 2001; 107(5): E69.
- Stroparo E, Cruz CR, Debur MC, Vidal LR, Nogueira MB, Almeida SM, *et al.* Adenovirus respiratory infection: significant increase in diagnosis using PCR comparing with antigen detection and culture methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2010; 52(6): 317-21.
- Sujeet K, Vasudev B, Desai P, *et al.* Acute kidney injury requiring dialysis secondary to adenovirus nephritis in renal transplant recipient. *Transplant Infect Dis* 2011; 13(2): 174-7.
- Sung RYT, Chan PKS, Tsen T, Li AM, Lam WY, Yeung ACM, Nelson EAS. Identification of viral and atypical bacterial pathogens in children hospitalized with acute respiratory infections in Hong Kong by multiplex PCR assays. *J Med Virol* 2009; 81: 153-59.
- Symeonidis N, Jakubowski A, Pierre-Louis S, *et al.* Invasive adenoviral infections in T-cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: high mortality in the era of cidofovir. *Transpl Infect Dis* 2007; 9(2):108–13.

- Symeonidis N, Jakubowski A, Pierre-Louis S, *et al.* Invasive adenoviral infections in T-cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: high mortality in the era of cidofovir. *Transpl Infect Dis* 2007; 9(2):108–13.
- Tabbara KF, Omar N, Hammouda E, Akanuma M, Ohguchi T, Ariga T, *et al.* Molecular epidemiology of adenoviral keratoconjunctivitis in Saudi Arabia. *Mol Vis* 2010; 16: 2132-6.
- Tang L, Wang L, Tan X, Xu W. Adenovirus serotype 7 associated with a severe lower respiratory tract disease outbreak in infants in Shaanxi Province, China. *Virology Journal* 2011; 8(23): 1-7.
- Tang¹ LY, Liu XY, Xu WB. Genetic analysis of a strain of adenovirus Ad7d2 isolated from an infant died of pneumonia *J Exp Clin Virol.* 2009; 23:127-8.
- Tate JE, Bunning ML, Lott L, Lu X, Su J, Metzgar D, *et al.* Outbreak of severe respiratory disease associated with emergent human adenovirus serotype 14 at a US air force training facility in 2007. *J Infect Dis* 2009; 199 (10): 1419-26.
- Tebruegge M, Curtis N. Adenovirus infection in the immunocompromised host. *Hot topics in infection and immunity in children VI.* A. Finn editors. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 659: Springer Science+ Business Media, LCC; 2010.p 153-74.
- Teclé T, Tripathi S, Hartshorn KL. Review: defensins and cathelicidins in lung immunity. *Innate Immun* 2010; 16(3):151–159.
- Tecu C, Mihai ME, Alexandrescu VI, Orășanu D, Zapucioiu C, Matei D, Craiu M, Cochino A. The adenoviral infections in children admitted to hospital with pneumonia, acute bronchiolitis or respiratory viral infections. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 2012; 71(1):24-8
- Tenorio A, Echevarría J, Casas I, J.M. Echevarría JM, Tabares E. Detection and typing of human herpesviruses by multiplex PCR. *J Virol Methods* 1993; 44: 261-69.
- Toivonen R, Mäyränpää MI, Kovanen PT, Savontaus M. Dilated cardiomyopathy alters the expression patterns of CAR and other adenoviral receptors in human heart. *Histochem Cell Biol.* 2010; 133(3):349-57.
- Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3352– 6.
- Top Jr FH, Grossman RA, Bartelloni PJ, Segal HE, Dudding BA, Russell PK, *et al.* Immunization with live types 7 and 4 adenovirus vaccines I. Safety, infectivity antigenicity and potency of adenovirus type 7 vaccine in humans. *J Infect Dis* 1971; 124 (2): 148-54.
- Torres. G, Goyenechea A, Savón CE, Valdés O, Oropesa I. Incidencia de los Adenovirus en las conjuntivitis virales. *Rev Cubana Med Trop* 1998; 50 (3): 182-5.
- Traylen CM, Patel HR, Fondaw W, Mahatme S, Williams JF, Walker LR, Dyson OF, Arce S, Akula SM. Virus reactivation: a panoramic view in human infections. *Future Virol.* 2011; 6(4):451-463.
- Treacy A, Carr MJ, Dunford L, Palacios G, Cannon GA, O’Grady A, *et al.* First report of sudden death due to Myocarditis caused by adenovirus serotype3. *J Clin Microbiol* 2010; 48:642–5.

- Trei JS, Johns NM, Garner JL, Noel LB, Ortman BV, Ensz KL, *et al.* Spread of adenovirus to geographically dispersed military installations, May–October 2007. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16:769–75.
- Tregoning JS, Schuarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology and immunology. *Clin microbiol Rev* 2010; 23 (1): 74-98.
- Tsekoura EA, Konstantinidou A, Papadopoulou S, Athanasiou S, Spanakis N, Kafetzis D, Antsaklis A, Tsakris A. Adenovirus genome in the placenta: association with histological chorioamnionitis and preterm birth. *J Med Virol* 2010; 82:1379–83.
- Tsirioni M, Aessopos A. The heart in sickle cell disease. *Acta Cardiol* 2005; 60: 589–98.
- Tsirioni M, Korovesis K, Farmakis D, Deftereos S, Aessopos A. Hypoparathyroidism and heart failure in thalassemic patients: a case report. *Pediatr Endocrinol Rev* 2004; 2(Suppl):S310–2.
- Tuve S, Wang H, Jacobs JD, Yumul RC, Smith DF, Lieber A. Role of cellular heparan sulfate proteoglycans in infection of human adenovirus serotype 3 and 35. *PLoS Pathog* 2009; 83: 673–86.
- Valdés O, Acosta B, Piñón A, Savón C, Goyenechea A, González G, *et al.* First report of fatal Myocarditis associated with adenovirus infection in Cuba. *J Med Virol* 2008; 80: 1756-61.
- Valero N, Larreal Y, Arocha F, Gotera J, Mavarez A, Bermudez J, *et al.* Etiología viral de las infecciones respiratorias agudas. *Invest Clin* 2009; 50(3): 359 – 68.
- Van der Veen J, Kok G. Isolation and typing of adenoviruses recovered from military recruits with acute respiratory disease in The Netherlands. *Am J Hyg* 1957; 65:119–29.
- Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, *et al.* Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: Family Adenoviridae. San Diego, CA: Academic Press; 2000:227-37.
- Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The Airway Epithelium: soldier in the fight against Respiratory Viruses *Clin Microbiol Rev* 2011; 24 (3): 631-40.
- Viegas M, Barrero PR, Maffey AF, Mistchencko AS. Respiratory viruses seasonality in children under five years of age in Buenos Aires, Argentina. A five years analysis. 2003; *J Infect* : 1-7
- Vindrieux D, Le Corre L, Hsieh JT, Mactivier R, Escobar P, Caicedo A, Brigitte M, Lazennec G. Coxsackie and adenovirus receptor is a target and a mediator of estrogen action in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2011; 18(3):311-21.
- Waddington SN, McVey JH, Bhella D, *et al.* Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* 2008; 132: 397–409.
- Walsh MP, Chintakuntlawar A, Robinson CM, Madisch I, Harrach B, Hudson NR, Schnurr D, Heim A, Chodosh J, Seto D, Jones MS. Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. *PLoS ONE* 4. 2009; (6) e 5635.

- Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, *et al.* Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 2002; 110:789-99.
- Watcharananan SP, Avery R, Ingsathit A, Malathum K, Chantratita W, Mavichak V, Chalermpanyakorn P, Jirasiritham S, Sumethkul V. Adenovirus disease after kidney transplantation: course of infection and outcome in relation to blood viral load and immune recovery. *Am J Transplant.* 2011; 11(6):1308-14.
- Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, *et al.* Real-time quantitative PCR assays for the detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5189-98.
- Weigt JAI, Puppe W, Schmitt HG. Seasonality of respiratory Syncytial virus- positive hospitalization in children in Kiel, Germany over a 7- year period. *Infection* 2002; 30: 186-192.
- Weigt SS, Gregson AL, Deng JC, Lynch JP, Belperio JA. Respiratory viral infections in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. *Semin Respir Crit Care Med.* 2011; 32(4):471-93.
- Weitzel T, Reither K, Mockenhaupt FP, Stark K, Ignatius R, Saad E, *et al.* Field evaluation of the rota- and adenovirus immunochromatographic assay using stool samples for children with acute diarrhea in Ghana. *J Clin Microbiol* 2007, 45: 2695-97.
- Welch J, Svensson K, Kucharzewska P, Belting M. Heparan sulfate proteoglycan-mediated polyamine uptake. *Methods Mol Biol.* 2011; 720: 327-38.
- WHO. The world Health Report 2004. Changing history. In: WHO Library cataloging in publication data. WHO, Geneva, Switzerland 2004: 120-4.
- Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L, Nemerow GR. Adenovirus protein VI mediate membrane disruption following capsid disassembly. *J Virol* 2005; 79: 1992-2000.
- William BG, Gouws F, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 25-32.
- Wold WSM, Horwitz MS. Adenoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia (PA): Lippincott-Raven; 2007.p 2395-436.
- Wong S, Pabbaraju K, Pang XL, *et al.*: Detection of a broad range of human adenoviruses in respiratory tract samples using a sensitive multiplex real-time PCR assay. *J Med Virol* 2008; 80:856–65.
- Wu W, Tang YW. Emerging molecular assays for detection and characterization of respiratory viruses. *Clin Lab Med.* 2009; 29:673–93.
- Wu XQ, Li YH, Zhu X, Wu MW, Hu SM. Expression of Fas protein in myocardial tissue of viral myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Fa Yi Xue Za Zhi* 2011; 24:414-6.
- Xu HF, Chen JL, Da XP, Wu KR, Liu GQ, Zhao ZQ, *et al.* Expression of CAR in myocardial of viral Myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Fa Yi Xue Za Zhi* 2010; 26(5): 328-31.
- Xu W and Erdman DD. Type-specific identification of human adenovirus 3, 7 and 21 by a multiplex PCR assay. *J Med Virol* 2001; 64: 537-42.

- Xu W, McDonough MC, Erdman DD. Specie - specific identification of human Adenoviruses by multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4114-20.
- Yagci R, Akcali A, Yagci S, Konno T, Ishiko H, Duman S, Ozkaya E. Molecular identification of adenoviral conjunctivitis in Turkey. *Eur J Ophthalmol* 2009; 20(4): 669-674.
- Yaghoobi R, Langari MJ, Ramzi M, Geramizadeh B, Zakerinia M, Khojasteh HN, Dehghani M. Molecular impact and inducible factors associated with adenovirus infection in hematopoietic skin cell transplant patients. *Transplant Proc.* 2011; 43(2):644-6.
- Yamadera S, Yamashita K, Akatsuka M, Kato N, Inouye S. Trend of adenovirus type 7 infection, an emerging disease in Japan: a report of the National Epidemiological Surveillance of Infectious Agents in Japan. *Jpn J Med Sci Biol* 1998;51(1): 43–51
- Yang Z, Zhu Z, Tang L, Wang L, Tan X, Yu P, *et al.* Genomic Analyses of recombinant adenovirus type 11a in China. *J Clin Microbiol.* 2009 47(10): 3082-90.
- Yeung R, Eshaghi A, Lombos E, *et al.* Characterization of culture-positive adenovirus serotypes from respiratory specimens in Toronto, Ontario, Canada: September 2007–June 2008. *Virology* 2009; 6:11.
- Yokose N, Hirakawa T, Inokuchi K. Adenovirus-associated hemorrhagic cystitis in a patient with plasma cell myeloma treated with bortezomib. *Leuk Res* 2009, 33(8): e106.
- Yuen S, Smith J, Caruso L, Balan M, Opavsky MA. The coxsackie- adenovirus receptor induces an inflammatory cardiomyopathy independent of viral infection. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 50(5): 826-40.
- Yusof MA, Abdul- Rashid TR, Thayan R, Othman KA, Abu-Hasan N, Adnan N, Saat Z. Human adenovirus Type 7 Outbreak in Police Training Center, Malaysia. *EID* 2012; 18 (5): 852-4.
- Yusuf U, Hale GA, Carr J, *et al.* Cidofovir for the treatment of adenoviral infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Transplantation* 2006; 81: 1398–1404.
- Zaiss AK, Lawrence R, Elashoff D, Esko JD, Herschman HR. Differential effects of murine and human factor X on adenovirus transduction via cell-surface heparan sulfate. *J Biol Chem.* 2011; 286(28):24535-43.
- Zaki MS, Fatah GA. Rapid Detection of Oculopathogenic Adenovirus in Conjunctivitis. *Curr Microbiol* 2008; 56:105–109
- Zhang S, Jia H, Gong B, Zhang SJ, Li X, Yu B. Role of coxsackievirus and adenovirus receptor in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy and its influencing factor. *Chin Med J Engl* 2008; 21 (15): 1445-9.
- Zhang S, Zhang W, Tang YW. Molecular Diagnosis of Viral Respiratory Infections. *Curr Infect Dis Rep* 2011; 13:149–58.
- Zheng X, Lu X, Erdman DD, Anderson E, Guzman- Cottrill J, Kletzel M, *et al.* Identification of Adenoviruses in specimens from High- Risk Pediatric Stem Cell Transplant Recipients and Controls. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (1): 317-20.
- Zhu Z, Zhang Y, Xu S. Outbreak of acute respiratory disease in China caused by B2 species of adenovirus type 11. *J Clin Microbiol* 2009; 47(3): 697-703.

Anexo1.

1.1 Novedad científica y valor práctico de los resultados

- Primer estudio donde de manera integral es analizado el comportamiento de la infección por AdV sobre la base del patrón de circulación, la población más susceptible, las condiciones que favorecen la transmisión y los serotipos circulantes dentro y fuera del ámbito respiratorio.
- Se demuestra por primera vez la asociación de la infección por AdV con los cuadros severos, las complicaciones y casos fatales en un período extenso y con un gran número de muestras, reflejando el impacto actual de la infección por adenovirus en la morbilidad.
- Se demuestra la participación de los AdV en síndromes de etiología viral aguda como la miocarditis viral y la conjuntivitis hemorrágica por primera vez en la población cubana.
- Primer estudio donde se evidencia la significación patogénica de los AdV en los cuadros diarreicos y las manifestaciones respiratorias de larga evolución en pacientes cubanos infectados con el VIH y por tanto, la necesidad de tenerlos en cuenta dentro del diagnóstico para un mejor manejo y tratamiento de la infección.
- Se muestra el carácter endémico de los serotipos de las especies C y se alerta del peligro de la introducción del serotipo 7 dentro de la población cubana.
- Nuestro laboratorio, cuenta actualmente con métodos moleculares, aplicables a diferentes tipos de muestras que posibilitan el diagnóstico y caracterización de las especies y serotipos más importantes que nos afectan, contando con una batería de pruebas rápidas y de alta sensibilidad capaces de detectar cualquier cambio en el patrón de circulación que pueda representar una emergencia sanitaria.

1.2 Publicaciones donde se muestran los resultados de este estudio.

González G, Poumier O, Piñón A, Savón C, Valdés O, Acosta B, Goyenechea A, Oropesa S, González-Báez G. Detection of adenoviruses from bronchoalveolar lavage fluid in HIV- infected Cuban patients. Rev Biomed 2011; 22 (3): 95- 101.

Savón C, Goyenechea A, Valdés O, **González G**, Acosta B, Piñón A, Guelsys González-Baéz. Etiología de la Bronquiolitis y factores de riesgo asociados en niños cubanos hospitalizados. Rev Saludarte, 2010, Vol8:67-84.

Goyenechea A, Savón C, Valdés O, **González G**, Acosta B, Piñón A, Alvarez I, Reyes MC, Marchena J, Herrera F, González- Baéz G, Tejeda M. Differential molecular diagnosis of viral acute respiratory infection in children younger than 1 year. Rev Saludarte 2009; 7 (2): 68-81.

Savón C, Acosta B, Valdés A, Goyenechea A, **González G**, Piñón A, Mas P, Rosario D, Capó V, Kourí V, Martínez PA, Marchena J, González- Baéz G, Rodríguez H and Guzmán MG. A myocarditis outbreak with fatal cases associated with adenovirus subgenera C among children from Havana City in 2005. J Clin Virol 2008; 43:152–7.

González G, Salgado A, Poumier O, Goyenechea A, González ME, Acosta B, Rodríguez H. Aislamiento y caracterización de cepas de Adenovirus que colonizan el tracto gastrointestinal de pacientes cubanos seropositivos al VIH. Rev Cub Med Trop. 2008; 60(3): 112-4.

González G. Adenovirus: ¿patógenos oportunistas en la infección por VIH? Rev Biomed 2005; 16:139-46.

Savón C, Valdés O, **González G**, Palerm L, González-Báez G, Goyenechea A. Diagnostico molecular en un brote de bronquiolitis en la Ciudad de Cienfuegos, Cuba, en 2002. Rev Biomed 2005; 16: 13-19.

1.3 Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis

- XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM), VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, III Congreso cubano de Medicina Tropical, IPK, Habana, Cuba, Noviembre 2002.

“Detección e identificación en especies de adenovirus causantes de infección respiratoria aguda por PCR”.

- VI Congreso Centroamericano de Parasitología y medicina tropical. Guatemala, 2003.

“Diagnóstico de la infección respiratoria aguda baja en niños menores de 1 año”.

- V Jornada Internacional de Infectología Pediátrica (SLIPE). Cuba, 2004.

“Diagnóstico molecular de la infección respiratoria aguda baja por AdV en niños menores de 1 año en tres temporadas epidémicas”.

- Jornada científica SIDA. Cuba, 2005.

“Prevalencia de la infección por AdV en pacientes cubanos seropositivos al VIH”.

- VII Congreso centroamericano de parasitología y medicina tropical. El Salvador, 2005.

“Diagnóstico molecular de la infección respiratoria aguda en 5 temporadas epidémicas”.

- 12th International Congress of Infectious Diseases (ICID). Portugal, 2006.

“Unusual outbreak with different clinical presentation caused by adenovirus in Cuba”.

“Fatal cases of Myocarditis among Cuban children. Evidence of adenovirus as etiological agents”.

“Isolation of adenovirus during an unusual outbreak of acute febril syndrome in Cuba”.

- 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Alemania, 2006.

“Myocarditis heart failure associated with adenovirus infection”.

- VIII Congreso Centroamericano de Parasitología y medicina tropical. Cuba, 2007.

“Diagnóstico molecular diferencial de la IRA de etiología viral en niños menores de 1 año”.

“Desarrollo de un sistema de RCP múltiple para el diagnóstico de agentes virales que son causa frecuente de bronquiolitis y neumonía”.

- VIH/SIDA- ITS. Cuba, 2008.

“Frequent occurrence of adenovirus-related severe diarrhoea in hospitalized HIV-positive patients in Cuba”.

- 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). España, 2008.

“Myocarditis outbreak with fatal cases associated to adenovirus subgenera C among children, Havana City, 2005”.

- Resultado Relevante del IPK, 2008

Primer reporte en Cuba de Adenovirus asociados a Miocarditis fatales, dentro del Síndrome Febril Agudo Idiopático (SFAI). Clara Savón Valdés, Odalys Valdés, Belsy Acosta, **Grehete González**, Angel Goyenechea, Alexander Piñón, Guelsys González, Pedro Más Lago, Luís Sarmiento, Vivian Kourí, Pedro Ariel Martínez, Delfina Rosario, Hermis Rodríguez, Virginia Capó, A. Llop. Maria Guadalupe Guzmán.

- Convención CPHM. Cuba, 2008.

“Infecciones respiratorias causadas por AdV. Diagnóstico y caracterización en población infantil”.

- 26 Conferencia Científica del CIMEQ y 21 Jornada de Enfermería y Tecnólogos de Salud. CIMEQ, Febrero 2009.

“Prevalencia de la infección por AdV en una población infantil menor de 5 años”.

- XIII Exposición Forjadores del Futuro y X Conferencia Municipal de las BTJ. IPK, Marzo 2009.

“Detección de AdV en casos fatales de niños con miocarditis”

- Congreso 70 Aniversario del IPK, VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, IV Congreso Nacional de Medicina Tropical. IPK, 2009

“Primer reporte en Cuba de Adenovirus como agente etiológico de conjuntivitis hemorrágica no epidémica”.

“Prevalencia de adenovirus asociados con cuadros diarreicos en pacientes cubanos infectados con VIH”.

“Detección de Adenovirus en líquido broncoalveolar de pacientes cubanos infectados con VIH”.

- X Bienal Latinoamericana de Pediatría. Bogotá Colombia 6-10 Nov 2010

“Etiología de la Bronquiolitis y factores de riesgo asociados en niños cubanos hospitalizados”.

- Logro de la Academia de Ciencias de Cuba en 2010

Etiología Viral de la infección respiratoria aguda baja en niños menores de un año. Estudio Integral. *Clara Estela Savón, Odalys Valdés, **Grehete Gonzalez**, Belsy Acosta, Alexander Piñón, Angel Goyenechea, Guelsys Gonzalez Amely Arencibia.*

- VIII Jornada Internacional de Infectología Pediátrica. Hotel Occidental – Miramar. La Habana, Cuba 16 al 18 de noviembre 2011.

“Diagnóstico etiológico viral de infecciones respiratorias en niños cubanos menores de 5 años de edad”.

“Diagnóstico etiologico de la bronquiolitis y algunos factores de riesgo asociados en niños cubanos hospitalizados”

Anexo 2 Metodología de las RCP

Metodología de la RCP utilizada para el diagnóstico de las IRA por Adenovirus.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el diagnóstico de AdV en muestras clínicas (RCP-M1).

Reacciones	Cebadores	Secuencia(5' - 3')	Gen
RT-RCP	ADV 1F (+)	CAACACCTAYGASTACATGAA	Hexon
	ADV 1R (-)	KATGGGGTARAGCATGTT	Hexon
RCP Anidada	ADV 2F (+)	CCCITTYAACCACCACCG	Hexon
	ADV 2R (-)	ACATCCTTBCKGAAGTTCCA	Hexon

Fuente: Avellón *et al.*, 2001.

Tabla 2. Condiciones establecidas para la RCP-Múltiple 1.

RCP (etapas)	RCP*	No. de ciclos	RCP anidada*	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	5:00 (95)	1	4:00 (94)	1
Desnaturalización	0:30 (94)	45	0:30 (94)	35
Hibridación	2:00 (50)	45	1:00 (55)	35
Elongación	1:00 (72)	45	0:30 (72)	35
Extensión Final	5:00 (72)	1	5:00 (72)	1

Fuente: Coiras *et al.*, 2003 *Tiempo (min.) Temperatura (⁰C).

Metodología de RCP para la identificación de AdV a partir de aislamientos

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en la RCP genérica para la identificación de AdV

Especies	Cebadores	Secuencia (5' - 3')	Gen	Referencia
A - F	Ad 1+	TTCCCCATGGCIAAACAC	Hexón	Xu et al., 2000
	Ad 2-	CCCTGGTAKCCRATRITGTA		

Tabla 4. Condiciones de la RCP genérica

RCP (etapas)	RCP*	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	5:00 (94)	1
Desnaturalización	1:00 (94)	30
Hibridación	0:45 (54)	30
Elongación	2:00 (72)	30
Extensión Final	5:00 (72)	1

Fuente: Xu *et al.*, 2000. *Tiempo (min.) Temperatura (⁰C)

Metodología empleada para la caracterización en especies y serotipos de AdV.

Tabla 5 Oligonucleótidos empleados para la amplificación por RCP múltiple de las especies de AdV

Especies	Cebadores	Gen	Secuencia (5'→3')	Talla (pb)
A	AdA 1 AdA 2	Fibra	GCTGAAGAAMCWGAAGAAAATGA CRTTTGGTCTAGGGTAAGCAC	1444-1537
B	AdB 1 AdB 2	Fibra	TSTACCCYTATGAAGATGAAAGC GGATAAGCTGTAGTRCTKGGCAT	670-772
C	AdC 1 AdC 2	Fibra	TATTCAGCATCACCTCCTTTCC AAGCTATGTGGTGGTGGGGC	1988-2000
D	AdD 1 AdD 2	Fibra	GATGTCAAATTCCTGGTCCAC TACCCGTGCTGGTGTAAAAATC	1205-1221
E	AdE 1 AdE 2	Fibra	TCCCTACGATGCAGACAACG AGTGCCATCTATGCTATCTCC	967
F	AdF 1 AdF 2	Fibra	ACTTAATGCTGACACGGGCAC TAATGTTTGTGTTACTCCGCTC	541-586

Fuente: Xu *et al.*, 2000

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en la RCP múltiple para la identificación de serotipos de la especie B (AdV-3, 7 y 21)

Serotipos	Cebadores	Gen	Posición	Secuencia (5'→3')	Talla(pb)	Referencia
3	AdV3 F+	Hexón (lazo1)	796-816	GGTAGAGATGCTGTTGCAGGA	502	Xu y Erdman, 2001
	AdV3 R-	Hexón (lazo2)	1297-1276	CCCATCCATTAGTGTCATCGGT		
7	AdV7 F+	Hexón (lazo1)	509-529	GGAAAGACATTACTGCAGACA	311	
	AdV7 R-		819-798	AATTCAGGCGAAAAAGCGTCA		
21	AdV21 F+	Hexón (lazo1)	547-567	GAAATTACAGACGGCGAAGCC	237	
	AdV21 R-		783-763	AACCTGCTGGTTTTGCGGTTG		

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en la RCP para identificar el serotipo AdV-14.

Serotipos	Cebadores	Gen	Secuencia (5'→3')	Talla(pb)	Referencia
14	Ad14F+	Hexon	AAATGCTAATCTTGGACAGCAGTC	324	Metzgar <i>et al.</i> , 2007
	Ad14R-		AGCCGTCCAGTGGAAAACAGTAGT		

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en la RCP múltiple para identificar serotipos de la especie C.

Serotipos	Cebadores	Gen	Posición	Secuencia (5'-3')	Talla (pb)	Referencia
1, 2, 5 y 6	AdvC F+		657-677	TGC TTG CGC THA AAA TGG GCA		
1	AdvC1R-		895-873	CGA GTA TAA GAC GCC TAT TTA CA	630	
2	AdvC2R-	Fibra	838-857	CGC TAAGAG CGC CGC TAG TA	204	Adhikary <i>et al.</i> , 2005
5	AdvC5R-		1093-1111	ATG CAA AGG AGC CCC GTA C	455	
6	AdvC6R-		1209-1188	CTT GCA GTC TTT ATC TGA AGC A	929	

Tabla 9. Condiciones de los diferentes ciclos de las 3 RCP empleadas para determinar los serotipos de Adv de las especies B y C.

RCP(etapas)	Adv3/7/21*	No. ciclos	Adv14*	No. ciclos	Adv1/2/5/6*	No. Ciclos
Desnaturalización (1ra.)	5:00 (94)	1	5:00 (95)	1	3:00 (94)	1
Desnaturalización	1:00 (94)	30	1:00 (94)	35	1:00 (94)	35
Hibridación	1:00 (56)	30	1:00 (63)	35	1:00 (47)	35
Elongación	2:00 (72)	30	1:30 (72)	35	2:00 (72)	35
Extensión Final	7:00 (72)	1	7:00 (72)	1	7:00 (72)	1

Fuente: Xu and Erdman, 2001; Metzgar *et al.*, 2007; Adhikary *et al.*, 2005 *Tiempo (min.) Temperatura (°C)

Tabla 10. Secuencia de los cebadores y sondas marcadas ("probes") para la detección de serotipos de AdV de las especies C por RCP-TR.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Nucleótidos	Conc. (μM)
AdV1F+	ATACCCAAACTGAAGGCAATCC	592-614	0,4
AdV1probe	ACTGAGATTCTCCAACCTGAGGTT	620-643	0,2
AdV1R-	ACTGAGATTCTCCAACCTGAGGTT	645-648	0,4
AdV2F+	AACCTGTATACGCAGATCCTTCCTA	607-632	0,4
AdV2probe	AGAACCTCAAATTGGCGAATCTCAGTGGA	638-667	0,2
AdV2R-	CCTGCCGCATTAGCATCAG	675-694	0,4
AdV5F+	CACTCATATTTCTTACATGCCCACTATT	890-918	0,4
AdV5probe	AGGAAGGTAACCTCACGAGAACTAATGGGCCA	920-950	0,2
AdV5R-	GGCCTGTTGGCATAGATTG	953- 973	0,4
AdV6F+	AAACCCTGCTATGGCTCATACG	717- 739	0,4
AdV6probe	CCACCAATTCCAACGGCGGACA	747-769	0,2
AdV6R-	TTTTACCATTTTGTTCACCATAACG	772-797	0,4

Fuente: Ebner *et al.*, 2005

Tabla 11. Condiciones de amplificación de la RCP-TR para la determinación de los serotipos de la especie C

RCP(etapas)	RCP*	No. ciclos
Desnaturalización (1ra.)	10:00 (95)	1
Desnaturalización	00:15 (95)	50
Hibridación	1:00 (60)	50
Elongación	1:00 (60)	50

Fuente: Ebner *et al.*, 2005 *Tiempo (min.) Temperatura (°C)

Tabla 12. Cebadores utilizados para la serotipificación de los AdV en la RCP previa a la electroforesis capilar

Cebadores(marcaje)	Secuencia (5'-3')	Concentración. (μ M)
AdV B F 1- (F) ^a	GCCCCAGCTTCAAACCCTAC	0,2
AdV B F 2- (F) ^a	GTCCTAGCTTCAAGCCATAT	0,2
AdV B F 3- (F) ^a	GTCCCAGTTTCAAACCCTAT	0,2
AdV B F 4- (F) ^a	GCCCTAGCTTCAAGCCATAC	0,2
AdVB R 1	GTCTGGCAAATGAACCATAGC	0,2
AdVB R 2	GTTTAGCAAAAGACCCATAGC	0,2
AdVB R 3	GCTTGGCGAAAGAACCATAGC	0,2
AdVB R 4	GTTTGGCAAAGGACCCGTAGC	0,2
AdVB R 5	GTCTCGCAAAAGACCCGTAGC	0,2
AdVC F-(J) ^b	ACTGCCTACAACGCTCTRGC	0,4
AdVC R	CCRTAGCATGGTTTCATGGG	0,4
AdV E F-(J) ^b	CTGGCTCCCAAGGGAGCGCC	0,4
AdV E R	AGTGTCTTTAGAGCTCTGC	0,4

Fuente: Ebner *et al.*, 2006 a -Fluoresceína (F); b -JOE (J)

Tabla 13. Condiciones de amplificación para la RCP previa a la electroforesis capilar

RCP (etapas)	RCP*	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	10:00 (96)	1
Desnaturalización	00:30 (95)	30
Hibridación	00:30 (50)	30
Elongación	00:30 (72)	30
Extensión Final	03:00 (60)	1

Fuente: Ebner *et al*, 2006 *Tiempo (min.) Temperatura (°C)

Tabla 14. Talla de los fragmentos de los productos de RCP de las cepas patrones utilizadas en la electroforesis capilar.

Serotipos	Talla del fragmento (pb)
AdV B	
AdV 3	355
AdV 7	346
AdV 11	378
AdV 14	382
AdV 16	337
AdV 21	379
AdV 34	388
AdV 35	389
AdV 50	340
AdV C	
AdV 1	377
AdV 2	375
AdV 5	342
AdV 6	368
AdV E	
AdV4	259

Fuente: Ebner *et al*, 2006

Tabla 15. Cebadores utilizados para la amplificación de los serotipos de AdV causantes de infecciones oculares

Serotipos	Cebadores	Gen	Nucleótidos	Secuencia (5'-3')	Talla (pb)
AdV-3	AdnB1 +	Fibra	292-312	TAC CCY TAT GAA GAT GAA AGC	517
	Adn3t -	Fibra	808-786	TGT TTT TAA ATA AGG TGT TAA CG	
AdV-7	Adn7t -	Fibra	2623-2601	GCC ATT ATT TGA CAG TTG GCT GT	404
AdV-4	Adn4f +	Fibra	695-716	ACC AGT AGT ACA GAA ACA GGA G	295
	Adn4t -	Fibra	989-968	CTT GAG CAC TGC TTA CTG TGC C	
AdV- 8	AdnD1+	Fibra	1-22	AAG GGA TGT CAA ATT CCT GGT C	243
	Adn8t -	Fibra	243-225	CCT TGA GTG ATA CAT TTT G	
AdV-19	Adn19/37t -	Fibra	333-309	GCA AGC TCA AGTTTT TTA TCA GTA T	333
AdV-37	AdHxD +	Hexon	34-51	AGC TTC AAA CCC TAC TCG	935
	AdHx37t	Hexon	968-946	ACT CCG CCT CCTGTT TGT ACA GG	

Fuente: Banik *et al*, 2005

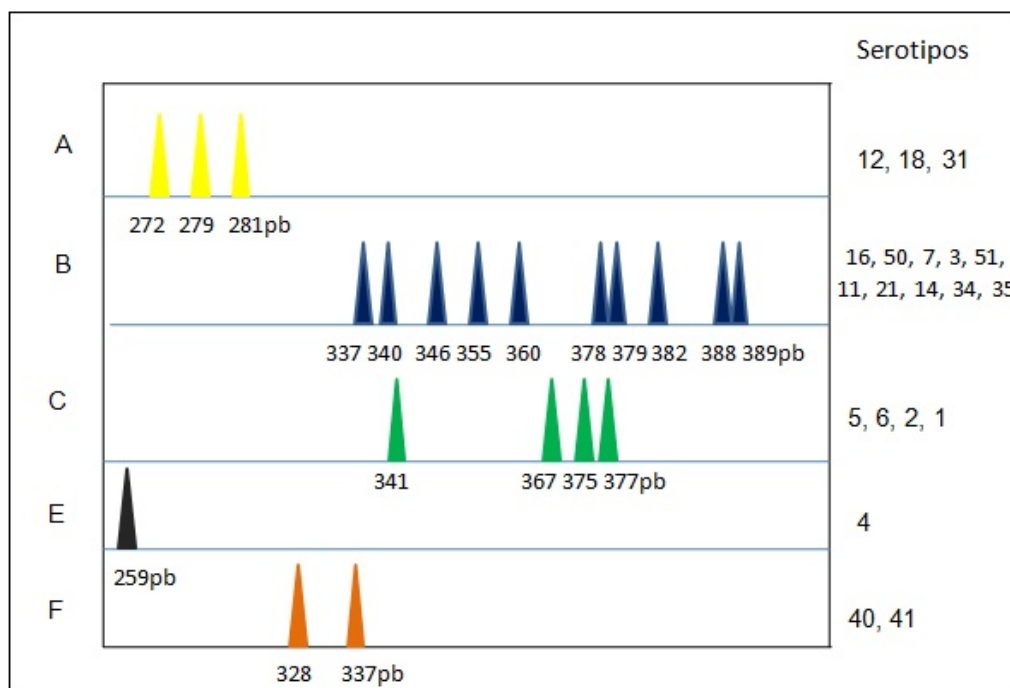


Figura 1. Ilustración esquemática de la referencia externa de los serotipos de las especies A, B, C E y F utilizados en la electroforesis capilar.

Tabla 16. Condiciones de amplificación para la RCP múltiple de los serotipos de AdV causantes de infecciones oculares.

RCP(etapas)	AdV- 3, 4, 7, 8, 19 y 37*	No. ciclos
Desnaturalización (1ra.)	3:00 (94)	1
Desnaturalización	1:00 (94)	35
Hibridación	1:00 (50)	35
Elongación	2:00 (72)	35
Extensión Final	7:00 (72)	1

Fuente: Banik et al, 2005 *Tiempo (min.) Temperatura ($^{\circ}$ C)

Tabla 17. Cebadores y sondas para la detección de las especies de AdV por RCP-TR

Especies	Genes	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Conc. (nM)	Nucleótidos
AdV A	Hexon	AdV1F+	GGK CTG GTG CAA TTC GCC	300	17818-17835
		AdV1probe	CCA CGG ACA CCT ACT TCA CCC TGG G	200	17840-17864
		AdV1R-	CAC GGG CAC AAA ACG CA	300	17936-17952
AdV B	Hexon	AdV2F+	CGC CGG ACA GGA TGC TT	900	45-61
		AdV2probe	AGT CCG GGT CTG GTG CAG TTC GCC	200	73-96
		AdV2R-	CTA CGG TCG GTG GTC AC	900	166-182
AdVC	Hexon	AdV3F+	ACC TGG GCC AAA ACC TTC TC	300	2884-2903
		AdV3probe	AAC TCC GCC CAC GCG CTA GA	200	2910-2929
		AdV3R-	CGT CCA TGG GAT CCA CCT C	900	2940-2958
AdV D	VA-RNA	AdV4F+	AAA AAC GAA AGC GGT TGA GC	300	2-21
		AdV4probe	CCA ATA CCA CGT TAG TCG CGG CT	200	104-126
		AdV4R-	CGG GTC GAG ACG GGA GT	50	128-144
AdV E	Hexon	AdV5F+	CAA CAC CTA CTC GTA CAA AGT GCG	900	225-248
		AdV5probe	CGC CCA CGG CCA GCG TGT	200	251-268
		AdV5R-	TAG GTG CTG GCC ATG TCC A	300	281-299
AdV F	Hexon	AdV6F+	GCA GGA CGC CTC GGA GTA	300	268-285
		AdV6probe	TAC TTC AGC CTG GGG AAC AAG TTC AGA AA	200	329-357
		AdV6R-	TGT CTG TGG TTA CAT CGT GGG T	900	374-395

Fuente : Lion *et al*, 2003

Tabla 18 Condiciones de amplificación para la RCP-TR para la determinación de las especies de AdV

RCP(etapas)	RCP*	No. ciclos
Desnaturalización (1ra.)	10:00 (95)	1
Desnaturalización	00:15 (95)	50
Hibridación	1:00 (60)	50
Elongación	1:00 (60)	50

Fuente: Lion *et al*, 2003 *Tiempo (min.) Temperatura (⁰C)

Tabla 19 Cebadores utilizados en la RCP para la determinación de la especie D por secuenciación

Cebadores	Gen	Secuencia (5'→3')	Talla(pb)
AdDF+	Hexon	GCGGTGGACAGCTATGATCC	250
AdDR-		CAGGCCAACCTGTGGAAGA	
		GTT	

Fuente: Ebner *et al.*, 2005

Tabla 20 Condiciones de amplificación para la RCP que detecta la especie D de AdV

RCP(etapas)	RCP	No. ciclos
Desnaturalización (1ra.)	10:00 (96)	1
Desnaturalización	00:30 (95)	35
Hibridación	00:30 (45)	35
Elongación	00:30 (72)	35
Extensión	07:00 (72)	1

Fuente: Ebner *et al*, 2005 *Tiempo (min.) Temperatura (⁰C)

Anexo 3. Planilla de Consentimiento informado.

El Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) desean realizar el siguiente Proyecto de Investigación: *Estudio de la Prevalencia de la Infección por Adenovirus del Subgrupo D y su posible significación Patogénica en el tracto Gastrointestinal de Pacientes Cubanos infectados por el VIH.* con el fin de contribuir al mejor diagnóstico y tratamiento de la etiología de la diarrea en este grupo de pacientes. Esta investigación no conlleva riesgos ni daños para el voluntario. Los resultados de dicho estudio serán utilizados y publicados de forma anónima. Por lo antes expuesto solicitamos su colaboración, absolutamente voluntaria para ser incluido en esta investigación. Si accede se le tomará una única muestra de heces fecales para obtener aislamiento y tendrá derecho a conocer los resultados.

Certifico por la presente que autorizo a las entidades sanitarias nacionales y/o extranjeras, al comité ético a que consulten los informes hospitalarios que posean mi nombre, sin que por ello pierdan su carácter confidencial.

Nombre y Apellidos del paciente:

Firma del paciente:

Fecha:

Yo: Grehete González Muñoz responsable del Protocolo de Investigación certifico por medio de la presente haberle explicado al paciente todo lo relacionado con este estudio e igualmente certifico que el mismo ha participado de forma absolutamente voluntaria en el ensayo.

Fecha: _____ Firma: _____