



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

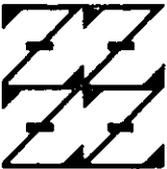
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

CONJUNTIVITIS EN MEXICO DURANTE 1998: ETIOLOGIA
Y COMPORTAMIENTO EPIDEMIOLOGICO
DE LA ENFERMEDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
BARRERA BADILLO GISELA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO NUESTRO ES
NUESTRA OBLIGACION

ASESOR: M. EN C. IRMA LOPEZ MARTINEZ
COASESOR: EPIDEMIOLOGIA ADALBERTO SANTAELLA

MEXICO, D.F.

2000.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

- PRESIDENTE: Dr. Rubén Marroquin Segura
VOCAL: M en C. Irma López Martínez
SECRETARIO: M. EN C. José Luis A. Mora Guevara
SUPLENTE: Q.F.B. Roberto C. González Melendez
SUPLENTE: Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera

*Este trabajo se realizó en el laboratorio de Virus
Respiratorios con el apoyo del Instituto Nacional
de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.*

**CONJUNTIVITIS EN MÉXICO DURANTE 1998:
ETIOLOGÍA Y COMPORTAMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE
LA ENFERMEDAD**

AGRADECIMIENTOS

Es difícil plasmar en un papel el reconocimiento que se le tiene a las personas que me han ayudado y mil palabras no me bastarían para darles las gracias a cada una de ellas, estoy convencida de que un hecho dice mil palabras, así que trataré de expresar mis más sinceros agradecimientos esperando que cada una de estas personas siempre estén conmigo para demostrármelos.

A DIOS:

Gracias por brindarme la oportunidad de vivir cada día colmada de tu inmenso amor y acompañada de las personas que más amo.

A MIS PADRES.

Gracias por darme la vida y la oportunidad de poder compartirla con ustedes y mis hermanos, agradezco su apoyo incondicional en todo momento, los sabios consejos que siempre me han brindado para tomar las mejores decisiones y poder seguir adelante, gracias por sus palabras de aliento en los momentos más difíciles y porque a pesar de todo nunca perdieron la confianza en mí.

Los quiero y admiro muchísimo, son la parte más importante en mi vida

A MI PAPÁ

Por tu gran esfuerzo para que yo tu hija pudiera culminar esta carrera y por las palabras de ánimo que siempre nos das cuando sentimos que ya no podemos seguir adelante. Gracias por ser mi papá.

Te quiero mucho papá.

A MI MAMÁ

Por tu paciencia, tu comprensión, tu dedicación y sobre todo tu gran amor. Gracias por ser la mejor mami del mundo.

Te quiero mucho mamá

A MIS HERMANOS

Por quererme tal y como soy. Gracias por su amistad, comprensión, paciencia y cariño.

*Los quiero mucho, mucho, mucho son los mejores amigos que tengo
(son buenisima onda)*

A SERGIO

Gracias por ser tan lindo, por tus cuidados y sobre todo porque nunca me reprochaste el que siempre te levantara temprano durante la carrera cuando se me hacia tarde.

A pesar de que eres mi hermano mayor siempre serás mi hermanito te quiero muchisimo

A ROCÍO

Eres la gruñona más linda que he conocido, gracias por tu ejemplo, tus buenos consejos, el inmenso cariño que siempre me has demostrado y la paciencia que me tuvieron tí e Ibet cuando no las dejaba dormir porque era época de exámenes.

Chio eres la mejor hermana que dios pudo haberme regalado, te quiero muchisimo

A IBET

Eres la hermana más disparatada que tengo y a pesar de que eres mi hermanita más chiquita he podido aprender muchas cosas de ti, gracias por tu confianza, tu paciencia y sobre todo por tus consejos siempre tan acertados.

Ibecita eres la mejor amiga que dios puso en mi camino, te quiero muchisimo

A MI TÍO JUAN

Gracias por formar parte de la familia y estar conmigo en la buenas y en las malas.

A MIS ABUELOS Y A MI TÍA ELENA

Gracias porque con el afán de verlos y compartir tiempo con ustedes cada fin de semestre la carrera se hizo menos pesada y mucho más corta.

Gracias por todo su amor, los quiero mucho

A IRMA.

Porque confiaste en mi, me apoyaste, me ofreciste tu amistad y me diste la oportunidad de realizar este trabajo. Gracias porque con tu paciencia y apoyo incondicional pude aprender muchas cosas.

A RITA

Por tu amistad, por el apoyo y toda la ayuda que me brindaste para que pudiera sacar adelante este trabajo. Agradezco tu tiempo para que mi tesis saliera lo mejor posible.

Gracias por ser tan buena onda.

A ADALBERTO SANTAELLA

Por todo su apoyo, confianza, tiempo y sus geniales ideas que me permitieron darle sentido a está tesis.

A ELY Y MARA.

Gracias porque siempre estuvieron ahí para ofrecerme su amistad incondicional, ejemplo y sus palabras llenas de buenos deseos para que juntas pudiéramos seguir adelante.

Las quiero mucho

A JESÚS GALLEGOS

Gracias por ayudarme a procesar las muestras para RT-PCR

A TODO EL PERSONAL DEL LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS.

Gracias por su amistad, apoyo, paciencia y sobre todo por permitirme compartir sus espacios para realizar mi tesis. Gracias a: Irma, Rita, Miguel, Elvia, Sra. Gisela, Sra. Clemencia, Sra. Luz María, Cecy, Gloria, Graciela, Lidia y Enrique.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	v
RESUMEN	1
MARCO TEÓRICO	
1. Antecedentes	3
2. Patrones de transmisión de la enfermedad	4
3. Epidemiología	
3.1 Conjuntivitis asociada a Adenovirus	4
3.2 Conjuntivitis hemorrágica aguda asociada a Enterovirus-70 y variante del virus coxsackie	5
4. Adenovirus	
4.1 Morfología	6
4.2 Clasificación	7
4.3 Características de los adenovirus	8
4.4 Composición antigénica	9
4.5 Actividad biológica de los antígenos principales sobre el cultivo celular	9
4.6 Multiplicación vírica	
4.6.1 Adherencia y penetración	10
4.6.2 Expresión de los genes	11
4.6.3 Replicación de DNA	11
4.7 Manifestaciones clínicas	12
5. Enterovirus-70 y Coxsackievirus A-24	
5.1 Morfología	13
5.2 Clasificación	14
5.2.1 Subclasificación de los enterovirus	14
5.3 Características de los enterovirus	15
5.4 Composición antigénica	15
5.5 Manifestaciones clínicas	15
6. Diagnóstico	
6.1 Cultivo celular	16

6.1.1 Líneas celulares	17
6.1.2 Efectos de la multiplicación vírica sobre las células huésped	18
6.2 Inmunofluorescencia	20
6.3 RT-PCR	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
OBJETIVOS	25
HIPÓTESIS	25
DISEÑO EXPERIMENTAL	
1. Tipo de estudio	26
2. Caso probable	26
2.1 Criterios de inclusión	26
2.2 Criterios de exclusión	26
3. Tamaño de la muestra	27
MÉTODOS	
4. Toma de muestra	27
4.1 Aplicación de formatos de envío	27
5. Tratamiento de la muestra	28
6. Propagación de líneas celulares Hep-2 y Vero	
6.1 Proceso de tripsinización	28
7. Producción de placas de 24 pozos	29
8. Inoculación de muestras en cultivos de células hep-2 y Vero	
8.1 Inoculación de muestras	29
8.2 Observación de placas inoculadas	30
9. Cosecha de muestras inoculadas en monocapas celulares	30
9.1 Muestras negativas	31
9.2 Muestras positivas	31
10. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	31
11. RT-PCR	32
12. Recolección de datos	33

RESULTADOS

1. Diagnóstico de exudados conjuntivales

1.1 Aislamiento e identificación de agentes etiológicos mediante la utilización de técnicas como cultivo celular, inmunofluorescencia indirecta y RT-PCR	34
1.1.1 Cultivo celular	35
1.1.2 Inmunofluorescencia indirecta	37
1.1.3 RT-PCR	39
2. Distribución de los casos positivos asociados a adenovirus en grupos de edad, sexo y entidad federativa	
2.1 Distribución en grupos de edad	39
2.2 Distribución por sexo	40
2.3 Distribución por entidad federativa	41
3. Sintomatología más frecuentemente presentada en los casos positivos de conjuntivitis	41
4. Distribución de los casos positivos en el período de agosto a noviembre de 1998	42
5. Aislamientos obtenidos dependiendo de los días transcurridos del inicio de la enfermedad a la toma de muestra	
5.1 Tiempo oportuno	43
5.2 Tiempo inoportuno	43
6. Aislamientos dependiendo de los días transcurridos de la toma de la muestra al procesamiento de la misma	
6.1 Tiempo oportuno	44
6.2 Tiempo inoportuno	45
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
CONCLUSIONES	51
APÉNDICES	52
ANEXO I	56
ANEXO II	57
ANEXO III	58

ABREVIATURAS

RT-PCR	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa
ELISA	Inmunoensayo enzimático
CHA	Conjuntivitis hemorrágica aguda
Hep-2	Epidermoid carcinoma, larynx, human
HeLa	Epidermoid carcinoma, cervix, human
Vero	Kidney, African green monkey
ECP	Efecto citopático
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
CDMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium complementado
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
IFA	Inmunofluorescencia
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
SFB	Suero fetal bovino

RESUMEN

La conjuntivitis es considerada como un problema de salud pública ocasionada por diferentes agentes etiológicos: enterovirus-70, virus coxsackie A24 y adenovirus tipos 3, 4, 7, 8, 19 y 37. En el periodo de agosto a noviembre de 1998 se presentó un brote de conjuntivitis en diferentes estados de la República Mexicana (Baja California, Chiapas, Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tamaulipas y Veracruz) obteniéndose de manera obligada 567 exudados conjuntivales. Por lo anterior el presente estudio tiene como finalidad realizar el diagnóstico de los agentes causales de la conjuntivitis presentes en las muestras recibidas, así como establecer su distribución en las diferentes entidades federativas, grupos de edad y sexo. Además de conocer la sintomatología más frecuentemente presentada en los casos comprobados de conjuntivitis.

El diagnóstico de los exudados conjuntivales fue demostrado por aislamiento viral en cultivos celulares utilizando líneas celulares Vero (Kidney, African green monkey) y Hep-2 (Epidermoid carcinoma, larynx, human) mediante la observación de efecto citopático, mientras que la identificación de la partícula viral se realizó por inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos monoclonales específicos contra el antígeno adenoviral hexón. Para complementar el diagnóstico se tomaron 100 muestras positivas al azar para realizar la técnica de RT-PCR y descartar la presencia de enterovirus-70.

De los 567 exudados conjuntivales procesados mediante las técnicas de cultivo celular e inmunofluorescencia, 204 muestras resultaron positivas para **adenovirus** en ambas pruebas; mientras que para la técnica de RT-PCR solo 1 de las muestras resultó positiva para **enterovirus**. Dentro de las 204 muestras positivas se encontró que los grupos de edad más afectados fueron: en primer lugar de 25 a 44 años, en segundo lugar de 15 a 24 años y en tercer lugar de 5 a 14 años, siendo el sexo femenino el más afectado en cada uno de los grupos de edad. Se determinó que el adenovirus afectó a los estados de Chiapas, Tamaulipas, Veracruz, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Puebla, Distrito Federal, Hidalgo, Michoacán, Nuevo León, Jalisco, México, Baja California y Guanajuato. La sintomatología más frecuentemente presentada en los casos positivos de conjuntivitis fue: conjuntivitis, derrame vascular, edema palpebral, secreción, cuerpo extraño, dolor ocular, prurito, lagrimeo, hiperemia, cefalea, fiebre, ardor ocular y escalofrío, manifestaciones como mialgias, artralgias y fatiga se presentaron en muy pocos casos. Por lo que se concluyó que las manifestaciones clínicas presentadas fueron conjuntivitis en la mayoría de los casos, fiebre faringoconjuntival en menor proporción y conjuntivitis hemorrágica aguda en solo uno de los casos.

MARCO TEÓRICO

1. ANTECEDENTES

La conjuntivitis es una infección oftálmica contagiosa ocasionada por diferentes agentes etiológicos. En 1973 se demostró que los adenovirus (serotipos 3, 4, 7, 8, 19 y 37) están asociados con síndromes clínicos como conjuntivitis, fiebre faringoconjuntival y queratoconjuntivitis epidémica. El enterovirus-70 ha sido responsable de decenas de millones de casos de conjuntivitis hemorrágica aguda desde 1969. Mientras que en 1970 una variante de coxsackievirus A24 causó una enfermedad similar, pero geográficamente más limitada, que afectó a cientos de miles de personas. (Lin HK, *et al.* 1993; Shiao S., 1996)

Diferentes técnicas de diagnóstico viral se han aplicado con la finalidad de identificar a los agentes etiológicos responsables de la conjuntivitis. Durante varios años, técnicas como inhibición de la hemaglutinación, neutralización, fijación de complemento, análisis con endonucleasas de restricción de DNA viral, transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) e inmunoensayo enzimático (ELISA) han servido para la identificación de los agentes causales; sin embargo, estas técnicas son costosas y poco aplicables a laboratorios de diagnóstico. Existen otras técnicas de diagnóstico que son fácilmente aplicables como el cultivo celular en donde primordialmente se realiza el aislamiento de las partículas virales, mientras que la inmunofluorescencia que es una técnica de diagnóstico rápido, es útil para detectar antígenos en muestras clínicas, así como en cultivos celulares después de varios días de inoculación.

Las técnicas de diagnóstico rápido son necesarias cuando se requiere reducir el tiempo de procesamiento de un gran número de muestras por lo que son clínicamente utilizadas. (Takeuchi R., *et al.* 1990; Shulman L., *et al.* 1997; Azar R., *et al.* 1998; Wood R., *et al.* 1997)

2. PATRONES DE TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD

Las manifestaciones oculares comúnmente están asociadas con una inadecuada cloración en agua de piscinas en época de verano, lo que ocasiona el contagio de una proporción que muchas veces excede al 60 % de las personas expuestas. Por otro lado la infección puede diseminarse por contacto directo e indirecto con exudado de ojos infectados, es decir la enfermedad es transmisible por medio de fomites contaminados como toallas para secar, colirios o instrumentos oftalmológicos mal desinfectados. El hacinamiento y el descuido en las normas higiénicas es un factor muy importante para la diseminación de estos VIRUS. (Mandell D., *et al.* 1995; Jernigan A.J., *et al.* 1993)

3. EPIDEMIOLOGÍA

3.1 Conjuntivitis asociada a Adenovirus

La enfermedad ocurre de dos formas, esporádica o epidémica afectando sobre todo a los adultos. En un principio se había descrito en trabajadores industriales; después fue común en los astilleros, donde se conocía como "el ojo de astillero". Aparentemente la enfermedad se diseminó desde Hawai hacia la costa oeste de los Estados Unidos para extenderse de manera gradual hacia

centro y Sudamérica. Más recientemente ha sido la causa de las epidemias ocurridas en los grandes centros de oftalmología. El adenovirus 8 está ampliamente distribuido en el sudeste de Asia, donde es endémico. En esta región, el 40 al 60% de los niños de edad escolar tiene títulos de anticuerpos contra este tipo de adenovirus. En Australia el adenovirus 4 y 8 se han distribuido en el sur y centro de Australia respectivamente. En Japón se ha reconocido una forma infantil de esta enfermedad, que se presenta como una conjuntivitis con síntomas sistémicos y sin compromiso de la córnea. (Joklik KW., *et al.* 1996; Schepetiuk KS., *et al.* 1993; McMinn CP., *et al.* 1991)

3.2 Conjuntivitis hemorrágica aguda (CHA) asociada a Enterovirus-70 y variante del virus Coxsackie

La enfermedad fue reconocida por primera vez casi simultáneamente en Ghana e Indonesia y se diseminó rápidamente a partir de estos dos focos. Durante 1970-1972, la epidemia llegó al oeste y norte a lo largo de la costa de África hasta Liberia, Sierra Leona, Marruecos y Egipto; al sudeste hasta Nigeria y finalmente a Zaire y Sudáfrica. En Europa, se produjeron pequeñas epidemias en 1971-1973 en Inglaterra, Unión Soviética, Holanda, Francia y Yugoslavia. Epidemias más pequeñas debidas a enterovirus-70 continuaron en Singapur hasta 1974-1975, cuando el coxsackievirus A24 reapareció como la cepa epidémica. Durante las dos últimas epidemias (Hong Kong, 1971, e India, 1975) ambos virus circularon en forma simultánea. Desde entonces la CHA ha sido epidémica en gran parte del Lejano Oriente e India. Ha habido epidemias en otras regiones de Asia incluyendo Vietnam, Bangladesh, Tailandia, Sri Lanka, Taiwán, Filipinas, Samoa americana y

Japón. La CHA no apareció en los estados Unidos hasta septiembre de 1981, cuando se observó por primera vez enfermedad por enterovirus-70 en Key West, Florida. Los casos de CHA por coxsackievirus A24 aparecieron por primera vez en el hemisferio occidental en Trinidad, Jamaica, St. Croix, Panamá y México en 1986. En Puerto Rico se produjeron 31,000 en 1987. Si bien la distribución geográfica de la CHA es amplia, las epidemias en gran escala se han producido sobre todo en áreas costeras hacinadas de países tropicales durante la estación cálida lluviosa. Las epidemias en países económicamente desarrollados y climas templados han sido mucho más limitadas (Mandell LG., *et al.* 1991)

4. ADENOVIRUS

Los adenovirus son muy importantes clínicamente debido a su capacidad para causar infecciones agudas del aparato respiratorio y conjuntiva. (Curtis S., *et al.* 1998)

4.1 Morfología

Los adenovirus son partículas icosaédricas no envueltas integradas por DNA lineal de doble cadena con una longitud de 30,000 a 42,000 pb (pares de bases), su diámetro es de 60 a 90 nm. La cápsida está compuesta de 252 capsómeros; 240 hexámeros componen las caras y bordes de los triángulos equiláteros y 12 pentámeros comprenden los vértices. Los hexámeros son prismas truncados triangulares o poligonales. Los pentámeros son más complejos, consistiendo en una base poligonal con una fibra adherida, cuya longitud varía con el tipo vírico (**figura 1**). (Fields NB., *et al.* 1996, Mclean MD., *et al.* 1989)

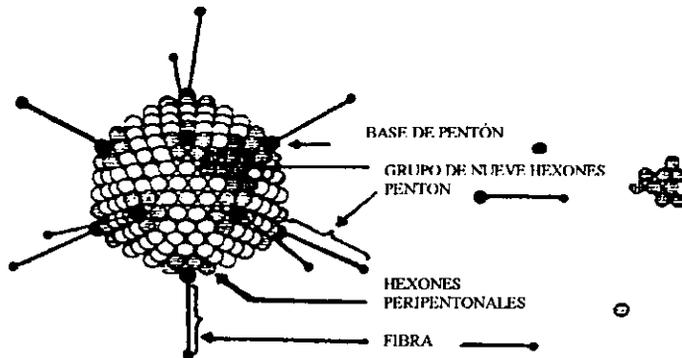


Figura 1. Estructura externa del adenovirus (Mandell D, Bennetts Principles and practice of infectious Diseases. 4ª edición. New York: Editorial Churchill Livingstone, 1995)

4.2 Clasificación

Los adenovirus pertenecen a la familia Adenoviridae, los cuales se dividen en dos géneros: Mastadenovirus y Aviadenovirus. Mientras que el género Aviadenovirus se limita a virus de aves, el género Mastadenovirus incluye virus de humanos, simios, bovinos, equinos, porcinos, ovinos y caninos. (Fields NB., *et al.* 1996)

Todos los adenovirus, excepto los aviarios contienen un antígeno común con especificidad de grupo relacionados con los capsómeros de hexones y un segundo determinante con la misma especificidad en la subunidad de pentones. Además los hexones también poseen un determinante antigénico extra que se emplea para subdividir estos virus en serotipos específicos. La fibra tiene un determinante tipo-específico que al igual que los hexones permite subdividir estos virus en serotipos. (Volk AW, *et al.* 1988)

Actualmente se conocen 49 serotipos diferentes de adenovirus humanos los cuales se han dividido en seis subgéneros (A-F) de acuerdo a sus

características estructurales, bioquímicas e inmunológicas y por su potencial oncogénico. Cada subgrupo contiene uno o más serotipos separados con base a la prueba de neutralización con antisuero tipo-específico.

Subgrupo A: el serotipo 12 causa infecciones discretas pero es clasificado como altamente oncogénicos en hamster, los serotipos 18 y 31 se aíslan de las heces de las personas aparentemente sanas.

Subgrupo B: los serotipos 3, 7, 14, 16 y 21 se aíslan con mayor frecuencia en las epidemias de enfermedades respiratorias agudas y pueden asociarse con neumonía severa, el serotipo 11 causa cistitis hemorrágica y los serotipos 34 y 35 se aíslan principalmente en pacientes con trasplantes renales. Este subgénero es moderadamente oncogénico en ratones

Subgrupo C: los serotipos 1, 2, 5 y 6 son comunes en enfermedades del tracto respiratorio superior e inferior e infecciones gastrointestinales en niños pequeños.

Subgrupo D: los serotipos 8 a 10, 13, 15, 17 a 20, 22 a 30, 32, 33 y 36 a 39 más a menudo se asocian con Queratoconjuntivitis epidémica.

Subgrupo E: el serotipo 4 se ha asociado con enfermedades respiratorias severas en reclutas militares y niños.

Subgrupo F: serotipos 40 y 41 causan diarrea. (Dolin R., *et al.* 1999)

4.3 Características de los adenovirus

Los adenovirus son extraordinariamente estables a agentes físicos y químicos y condiciones de pH adversas, resultando una prolongada supervivencia fuera de la célula huésped y gran potencial para diseminarse. Los adenovirus son resistentes al éter pero son destruidos por calor a 56 °C durante 30 minutos. El

tipo 4 es especialmente resistente al calor. Los virus soportan un rango de pH de 5.0 a 9.0 y rangos de temperatura entre 4 y 36 °C y sobreviven al congelamiento con una mínima disminución de infectividad. (Hjordi MF. 1995)

4.4 Composición antigénica

El hexon, pentón y fibra constituyen los antígenos principales de los adenovirus importantes en la clasificación de los mismos y en el diagnóstico de la enfermedad que producen los adenovirus. (Dolin R., *et al.* 1999) estos antígenos residen en la cápside externa, los hexones contienen dos determinantes antigénicos diferentes, uno grupo-específicos y el otro tipo-específico. La base pentónica contiene un determinante antigénico grupo-específico dominante. La fibra contiene un determinante tipo-específico que reside en la perilla distal y constituye el órgano de unión a la célula huésped, además de ser importante en la tipificación serológica. (Braude IA, *et al.* 1984)

4.5 Actividad biológica de los antígenos principales sobre el cultivo celular

Además de su reactividad inmunológica, tanto el pentámero como sus componentes tienen actividades biológicas características. Así el pentámero causa redondeamiento y aglomeración de las células cultivadas y las desprende de su soporte por lo que también recibe el nombre de toxina o factor de desprendimiento. La fibra presente en las células infectadas como una proteína soluble, al igual que en los pentámeros, posee una acción tóxica diferente: en las células cultivadas bloquea la biosíntesis del ADN, ARN, proteínas y detiene la división celular. (Davis DB., *et al.* 1990)

4.6 Multiplicación vírica

4.6.1 Adherencia y penetración

Los adenovirus se unen a los receptores presentes en la superficie de la célula blanco a través de las proteínas de las fibras; sin embargo se han identificado receptores secundarios que sirven como moléculas de adhesión de la célula huésped, las cuales se conocen como integrinas alfa-V-beta-3 y alfa-V-beta-5. Estas integrinas interactúan con las secuencias de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) en el penton adenoviral, luego de la adherencia e interacción con la integrinas celulares el complejo virus-receptor es internalizado por endocitosis, más tarde el endosoma formado transportara a la partícula viral al interior de la célula. Después de la internalización la base del penton promueve una disminución del pH lo que induce a los viriones a eliminar sus capsómeros de pentámeros y fibras adheridas. El cambio de la configuración de los viriones provoca la ruptura de los endosomas y la liberación de los viriones parcialmente desmontados hacia el citoplasma. El complejo de nucleoproteína ingresa en el núcleo donde tiene lugar la replicación. La abundancia en la expresión de las integrinas puede ser un factor limitante en la internalización viral y susceptibilidad a la infección viral. (Dolin R. & Wright FP. 1999; Schaechter M., *et al.* 1994) El proceso de entrada, penetración y replicación tiene una duración de 36 a 48 horas. (Volk AW., *et al.* 1998)

4.6.2 Expresión de los genes

En el caso de los adenovirus, la expresión de los genes ocurre en tres fases denominadas pretemprana, temprana y tardía. Durante la fase pretemprana se expresa una pequeña parte del genoma con la producción de dos proteínas reguladoras, una de estas proteínas induce la fase temprana, que se caracteriza por la expresión de un nuevo conjunto de genes virales, los genes tempranos son necesarios para la replicación del DNA viral y para la expresión de los genes virales restantes. Los productos genéticos tempranos permiten el ingreso a la fase tardía de la expresión de los genes, que se caracteriza por la abundante expresión de los genes tardíos que codifican los componentes de las partículas virales y las proteínas necesarias para el montaje de las partículas. (Schaechter M., *et al.* 1994)

4.6.3 Replicación de DNA

La replicación es iniciada dentro de secuencias repetidas invertidas en uno u otro extremo de la molécula adenoviral. Debido a su presencia, los dos extremos tienen secuencias idénticas y la iniciación de la replicación del DNA puede ocurrir en cualquiera de los extremos con una frecuencia aproximadamente igual. Después de la iniciación la síntesis del DNA procede a lo largo del DNA molde por medio de la copia de una cadena madre y el desplazamiento de la otra. La terminación de la síntesis de la primera cadena hija produce una molécula doble que consiste en una cadena madre y una cadena hija, más una cadena madre desplazada. Luego la síntesis del DNA comienza en el extremo de la cadena desplazada, la cual sirve como modelo para la síntesis de la otra cadena hija (**figura 2**). (Schaechter M., *et al.* 1994)

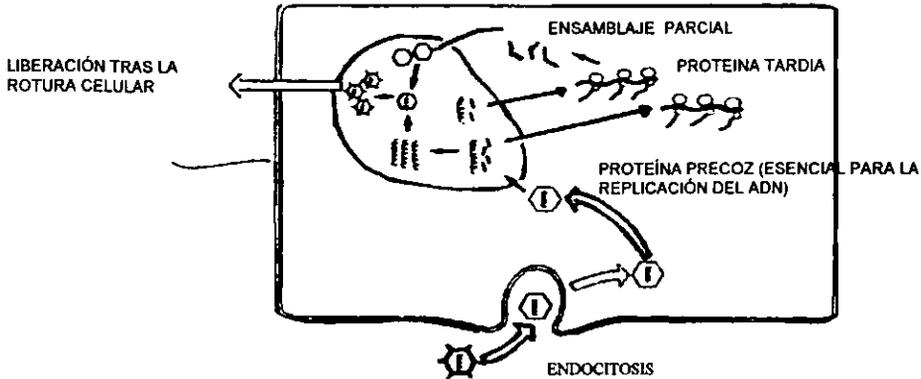


Figura 2. Replicación de los adenovirus (Murray P, Drew W, Kobayash G, Thompson J. Microbiología médica. España: Editorial Mosby, 1992)

4.7 Manifestaciones clínicas

Las principales manifestaciones clínicas de los adenovirus son: a) enfermedad respiratoria aguda; b) fiebre faringoconjuntival; C) infecciones respiratorias bajas d) queratoconjuntivitis epidémica; e) diversos síndromes incluyendo cistitis, meningitis y erupción de la piel; f) gastroenteritis. (McLean MD., *et al.* 1989)

Las infecciones oculares causadas por los adenovirus 3, 4, 7, 8, 19 y 37 se agrupan en tres entidades clínicas diferentes: la conjuntivitis folicular aguda, la fiebre faringoconjuntival y la queratoconjuntivitis epidémica.

La primera de estas entidades es la infección ocular más común producida por adenovirus, se trata de una conjuntivitis folicular benigna unilateral sin manifestaciones extraoculares. Después de un periodo de incubación de 5 a 7

días la conjuntiva se vuelve hiperémica, hay aumento del lagrimeo, prurito y aparece una secreción límpida con sensación de cuerpo extraño, la afección es autolimitada y se resuelve por completo en 10 a 14 días. La fiebre faringoconjuntival es caracterizada por fiebre alta durante 3-4 días, cefalea, escalofrío, dolor de garganta, fatiga, ojos hiperémicos, con aumento de lagrimeo, secreción, prurito y la conjuntiva palpebral tiene un aspecto granular y puede haber pequeñas hemorragias en el globo ocular, puede ser unilateral o bilateral pero usualmente persiste por 2 a 4 semanas; Mientras que el virus es aislado de la conjuntiva hasta los 14 días. En raros casos, la hemorragia subconjuntival puede evolucionar a conjuntivitis hemorrágica aguda.

La infección ocular más severa causada por estos virus es la queratoconjuntivitis epidémica, el adenovirus aislados son el tipo 8, 19 y 37, la enfermedad es bilateral caracterizada por acumulación de sangre, edema palpebral, dolor, fotofobia y formación de pseudomembrana acompañados de adenopatías preauriculares. A medida que el compromiso conjuntival comienza a resolverse el adenovirus prolifera en el tejido epitelial de la cornea, produciendo queratitis se desarrollan erosiones corneanas que pueden alterar la visión y persistir durante meses. (Joklik KW., *et al.* 1996; Mclean MD., *et al.* 1996; Murray P., *et al.* 1992)

5. ENTEROVIRUS-70 Y COXSACKIEVIRUS A-24

5.1 Morfología

Los picornavirus representan una familia muy grande de virus con respecto al número de miembros, pero una de las más pequeñas en términos del tamaño

del virion. Los picornavirus son partículas icosaédricas no envueltas integradas por RNA lineal de cadena única y no segmentada con un peso molecular de 2.6×10^6 daltons (7.5 Kilobases) su diámetro es de 20 a 30 nm. La cápside del virión esta compuesta por 60 subunidades estructurales que consisten en: 1) una envoltura externa de proteínas que forma el 70 % de la masa y 2) una cadena interna de ARN, el 30 % restante (**figura 3**). (Braude IA. 1984; Mandell LG., *et al.* 1991)

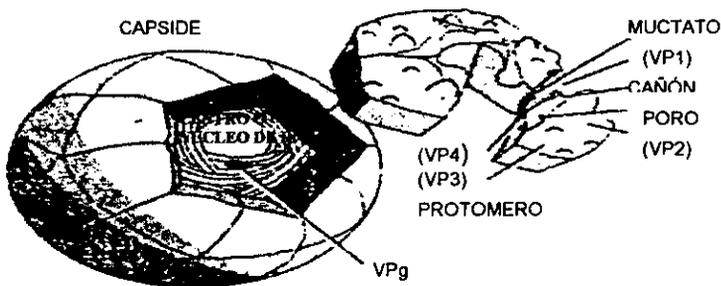


Figura 3. Estructura de un picornavirus típico (Fields NB, Howley MP. Fields virology. 3ª edición. Estados Unidos: Editorial Lippincott Raven, 1996)

5.2 Clasificación

Los picornavirus se subdividen en cuatro géneros: Enterovirus, Cardiovirus, Rhinovirus y Aphthovirus, basándose principalmente en su sensibilidad a los ácidos, densidad flotante del virión en cloruro de cesio y manifestaciones clínicas.

(Braude IA. 1984)

5.2.1 Subclasificación de los enterovirus

Los enterovirus de origen humano incluyen a: (1) poliovirus tipos 1 a 3; (2) coxsackievirus del grupo A, tipos 1 a 24; (3) coxsackievirus del grupo B, tipos 1 a 6; (4) echovirus, tipos 1 a 34 y (5) enterovirus, tipos 68 a 72. (Jawetz E., *et al.* 1992)

5.3 Características de los enterovirus

Por falta de una envoltura de lípidos, los viriones desnudos no son afectados por el éter, el alcohol y otros solventes lípidos, aunque son fácilmente inactivados por fenol, formaldehído o radiación ionizante, que dañan la cápside o el ácido nucleico encerrado. (Braude IA. 1984)

Los enterovirus son estables con un pH de 3 a 10 por una a tres horas, se les inactiva cuando se les calienta a 55 °C durante 30 minutos, pero se estabilizan con cloruro de magnesio contra la inactivación térmica. (Mandell LG., *et al.* 1991)

5.4 Composición antigénica

Los enterovirus muestran dos actividades antigénicas distintas C y D asociadas a formas físicas diferentes de la partícula de virus. Las cápsides vacías son C-antigénicas y dan lugar a reacciones grupo-específicas. En los viriones intactos el antígeno C está generalmente enmascarado por el antígeno D tipo-específico. (Braude IA. 1984)

5.5 Manifestaciones clínicas

La CHA es una infección ocular contagiosa, caracterizada por inicio repentino con enrojecimiento y la enfermedad llega a su pico durante el primer día. Por lo común aparece primero en un ojo y unas horas más tarde en el otro. Los principales síntomas son sensación de cuerpo extraño y quemadura, dolor ocular, fotofobia, edema palpebral y secreción serosa. La secreción ocular es serosa o seromucoide y contiene abundante cantidad de polimorfonucleares durante las

primeras 24 horas. Se observan síntomas constitucionales como fiebre, malestar general y cefaleas en un 20 % de los casos. El signo más distintivo es la hemorragia conjuntival, que se halla en el 70 a 90 % de los pacientes con CHA. Las hemorragias pueden ser puntiformes u ocupar toda la conjuntiva bulbar y son precipitadas por la eversión del párpado superior o frotado de los ojos. (Mandell L.G., *et al.* 1991)

6. DIAGNÓSTICO

La replicación viral produce enzimas, proteínas, antígenos y nuevos genomas que pueden ser detectados mediante observación de efectos citopáticos en cultivos celulares e identificación por inmunofluorescencia indirecta.

6.1 Cultivo celular

Hasta hace pocos años el estudio de los virus fue estimulado principalmente por la importancia de ciertas enfermedades víricas en el hombre y los animales. Esta era temprana se caracterizó al demostrarse la existencia de muchas clases diferentes de virus animales que causaban diferentes enfermedades; sin embargo la principal herramienta experimental para la propagación del virus en la mayor parte del trabajo primitivo fue el animal de laboratorio. Las dificultades de manejo de un número grande de animales para un trabajo cuantitativo preciso fue un serio obstáculo para el progreso. En 1949 Enders y colaboradores demostraron que los virus se podían incubar bajo condiciones precisas en tejidos.

Las técnicas de cultivo de células animales como huéspedes para el estudio de las interacciones virus-célula han progresado rápidamente. Las primeras

células usadas fueron las aisladas de tejidos tripsinizados, tales como riñón, testículo de mono y fibroblastos (cultivos primarios); sin embargo, estos cultivos no podían multiplicarse indefinidamente y la necesidad de volver a otro aislamiento primario introducía un factor de irreproducibilidad de los datos. Hacia el final de los años cuarenta Earle y colaboradores realizaron técnicas para el desarrollo continuo de células en cultivos apropiados para el trabajo con virus, con ello lograron realizar un procedimiento *in vitro* en el que se cultivan células disociadas que se pegan a superficies de vidrio o de plástico en condiciones asépticas y en donde se les provee de nutrientes de acuerdo a sus exigencias para multiplicarse. Existen tres tipos de cultivos celulares:

1. Los cultivos primarios que son mezclas de células sometidas a tripsinización. Pueden mantenerse vivas por tiempo limitado y resisten uno o dos subcultivos.
2. Los cultivos de células diploides, que resisten menos de 50 subcultivos y en general son fibroblastos diploides.
3. Los cultivos de células heterodiploides que resisten más de 70 pases son consideradas líneas establecidas. Derivan de tejido normal como las células Vero, o de neoplasias epiteliales como Hep-2 o HeLa. (Cumming H. 1985)

6.1.1 Líneas celulares

Debido al especial tropismo de los virus causantes de la conjuntivitis por las células epiteliales, estos microorganismos se recuperan mejor cuando los exudados conjuntivales se inoculan en líneas de células epiteliales. Las células primarias de riñón embrionario humano (HEK) son las más susceptibles, pero su costo prohíbe su utilización en los laboratorios de diagnóstico. Las células de riñón

de mono (Vero) son las líneas celulares epiteliales utilizadas con frecuencia para el aislamiento de adenovirus, también pueden utilizarse líneas de células malignas continuas, como Hep-2 (Epidermoid carcinoma, larynx, human) o HeLa (Epitheloid carcinoma, cervix, human). (Hjordis MF. 1995; Lennette HE. 1985)

❖ Línea celular Hep-2 (*Epidermoid carcinoma, larynx, human*)

Establecida por A. Moore, L. Sabachewsky y H. Toolan en 1952 de tumores que fueron inducidos en ratas inmunosuprimidas después de la inyección con tejidos de un carcinoma epidermoide laríngeo de un hombre caucásico de 56 años. Soporta el crecimiento de adenovirus, arbovirus, poliovirus y virus de la estomatitis vesicular, soportando aproximadamente 350 subcultivos. Las células fueron propagadas en DMEM.

❖ Línea celular Vero (*Kidney, African green monkey*)

Establecida por Y. Yasumura y Y. Kawakita en 1962 de un riñón normal de un mono verde africano adulto. Es empleada para el crecimiento de adenovirus, arbovirus, reovirus, rubéola, sarampión y poliovirus, soporta alrededor de 121 subcultivos. Las células fueron propagadas en DMEM. (Hay R., *et al.* 1992)

Las líneas celulares permisivas muestran efecto citopático (ECP) entre tres y cinco días. Sin embargo, algunas veces se puede requerir de varias semanas para que se lleve a cabo la replicación, lo cual depende del tipo de virus y de la cantidad de virus viables presentes en la muestra

6.1.2 Efectos de la multiplicación vírica sobre las células huésped

La replicación de los virus se detecta mediante la observación de cambios en la monocapa del cultivo celular (ECP) ya que la infección por adenovirus ejerce un efecto profundo sobre la fisiología de las células huésped. La producción de ADN del huésped cesa bruscamente entre las 8-10 horas después de la infección y la biosíntesis por el huésped de las proteínas y el ARN cesa de 6 a 19 horas más tarde. Por consiguiente, se suspende también la división de células infectadas. Esta inhibición de la mitosis está asociada con la producción de aberraciones cromosómicas. (Davis DB., *et al.* 1990)

La señal característica de la infección por adenovirus es el desarrollo de lesiones nucleares características causadas por la acumulación de componentes víricos esparcidos. De hecho el proceso de ensamblaje de adenovirus es bastante ineficaz, sólo un 10 a un 15 % de los nuevos ADN y proteínas víricos se incorpora a los viriones. Las alteraciones antes descritas dan como resultado efectos citopáticos característicos manifestados por redondeamiento, agrandamiento del núcleo, disminución del citoplasma, aumento de la opacidad y agregación de las células en racimos irregulares. A pesar de las extensas alteraciones, las células infectadas permanecen intactas y los núcleos no liberan los viriones recién sintetizados. Menos del 1 % del virus total se halla en el líquido de cultivo. (Joklik KW., *et al.* 1996)

Las células infectadas permanecen metabólicamente activas, e incluso experimentan un aumento de la utilización de glucosa y la producción de ácidos orgánicos, por lo tanto el medio de cultivo se vuelve ácido, contrariamente a la alcalinidad que se desarrolla en los cultivos infectados con agentes que lisan las células. (Davis DB., *et al.* 1990)

6.2 Inmunofluorescencia

Debido a que las líneas celulares utilizadas en la técnica de cultivo celular son permisivas para diferentes virus, es necesario realizar un diagnóstico que ayude a identificar a los virus causantes del ECP. Puede emplearse la inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales contra el antígeno hexon que se encuentra en la superficie de los adenovirus presentes en exudados conjuntivales.

La detección y localización de antígenos en células o tejidos, la lograron Coons y Kaplan en 1950, con la introducción de anticuerpos específicos conjugados con compuestos fluorescentes, sin alterar su reactividad inmunitaria. El anticuerpo conjugado se añade a las células o tejidos y se fija a los antígenos formando así un complejo inmunitario estable. El anticuerpo no fijado se elimina por lavado y la preparación se observa en un microscopio de luz ultravioleta. (Sites PD., *et al.* 1996)

Los fluorocromos más comúnmente utilizados en los laboratorios clínicos son el isotiocianato de fluoresceína que da una fluorescencia amarillo-verdosa, y el isotiocianato de rodamina, que da una fluorescencia color naranja-rojizo. Sin embargo en la práctica, se utiliza más frecuentemente el isotiocianato de fluoresceína (FITC) la cual se une con rapidez covalentemente a las proteínas en un pH alcalino. La fluoresceína absorbe la luz ultravioleta a 290 y 495 nm y emite una luz verde a una longitud de onda mayor 525 nm. (Weir MD. & Stewart J. 1995)

La inmunofluorescencia se puede llevar a cabo de tres formas: directa, indirecta y en sandwich. La técnica más empleada es la determinación indirecta la

cual consiste en colocar un anticuerpo sin marcar directamente sobre el sustrato y se visualiza por tratamiento con un antisuero anti- inmunoglobulina conjugado con el fluorocromo.

Esta técnica tiene varias ventajas, en primer lugar la fluorescencia es más intensa que en la prueba directa dado que varias anti-inmunoglobulinas fluorescentes se unen a cada una de las moléculas de anticuerpo presentes en la primera capa. En segundo lugar, dado que el proceso de conjugación es largo, se ahorra tiempo cuando se estudian varios sueros para la determinación de anticuerpo ya que sólo es necesario preparar un único reactivo marcado. Sin embargo, como sucede en la mayor parte de las técnicas inmunológicas, a medida que se incrementa la sensibilidad, se reduce progresivamente la especificidad.

(Roitt MI. 1994)

Las células en las cuales los conjugados reaccionan necesitan estar en un estado fresco. La descomposición natural que ocurre con el almacenamiento inadecuado y por supuesto la fijación inadecuada, no sólo tiende a destruir los antígenos sino también a causar que los anticuerpos y proteínas semejantes se adhieran en forma inespecífica a través del tejido. (Thompson AR. 1996)

La técnica es más sensible que la precipitación o la fijación de complemento, y es posible detectar oligo-cantidades de proteína fluorescente a concentraciones del orden de 1 µg de proteína por mililitro de líquido corporal.

(Stites PD., *et al.* 1996)

6.3 RT-PCR

En 1984 Kary Mullis y colaboradores desarrollaron un procedimiento enzimático denominado reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el cual permite sintetizar *in vitro* un gran número de copias de fragmentos de fragmentos específicos de DNA (amplificación). Con esta técnica es posible la amplificación de secuencias genéticas a partir de una sola molécula de DNA o RNA. En el caso de utilizar RNA como material genético en el ensayo de PCR es indispensable la síntesis del DNA complementario (cDNA), esta reacción es catalizada por la enzima transcriptasa reversa. El acoplamiento del proceso de transcripción reversa para la producción de cDNA y la técnica de PCR se conoce como RT-PCR. La técnica de PCR se fundamenta en ciclos repetidos de desnaturalización de la estructura de doble cadena del DNA, lo que permite la exposición de las secuencias blanco a ser amplificadas. Posteriormente, la alineación del par de oligonucleotidos cebadores específicos, los cuales flanquean la región a amplificar y finalmente la región de extensión de la cadena sintetizada de *novο* catalizada por una DNA polimerasa. En la reacción de PCR se utiliza preferentemente la DNA-polimerasa de la bacteria *Thermophilus aquaticus* (Taq) por su estabilidad enzimática a altas temperaturas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A la conjuntivitis se le puede considerar como un problema de salud pública ya que en los últimos siete años se han presentado en promedio anual alrededor de 21 500 casos, y aunque es una enfermedad curable es altamente transmisible, lo cual trae consigo problemas que afectan la vida cotidiana de los individuos. Los estados de la República Mexicana que han presentado la mayor incidencia o por lo menos los que más casos han reportado en los últimos siete años son Baja California, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán, siendo los individuos de 25 a 44 años el grupo de edad más afectado. Es importante resaltar que las estadísticas reportadas en estos años mencionan como única infección conjuntival a la conjuntivitis hemorrágica aguda, sin mencionar a los agentes etiológicos relacionados; lo cual nos hace pensar que las estadísticas se basaron únicamente en un diagnóstico clínico, con esto surgen dos grandes preguntas basadas en el marco teórico tales como ¿se han generalizado a las diferentes manifestaciones oculares que involucran a la conjuntiva como un problema de conjuntivitis hemorrágica aguda causada por enterovirus-70 y una variante del coxsackie A-24? y ¿se desconoce la participación del adenovirus como agente causal de conjuntivitis, fiebre faringoconjuntival y queratoconjuntivitis en México?. En 1969 se encontró que el enterovirus-70 y una variante del virus coxsackie A24 han sido los agentes etiológicos causantes de esta enfermedad. Sin embargo, en 1973 se demostró que estos virus no son los únicos en afectar el epitelio de la conjuntiva, ya que con ayuda de técnicas de diagnóstico se comprobó la presencia del adenovirus como otro agente causal de la conjuntivitis. Por

lo anterior y con base a los casos y brotes de conjuntivitis reportados en el periodo de agosto a noviembre de 1998 en los estados de Baja California, Chiapas, Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tamaulipas y Veracruz, se consideró poner en práctica las técnicas de cultivo celular, por su sensibilidad como estándar de oro y la inmunofluorescencia indirecta por su especificidad, para aislar e identificar el o los agente(s) etiológico(s) y con ello contribuir en el diagnóstico de la conjuntivitis, además de obtener conocimiento epidemiológico de la enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo general

- ❖ Aislar e identificar los agentes etiológicos virales en los casos de conjuntivitis presentados en el periodo de agosto a noviembre de 1998 en diferentes estados de la República Mexicana.

Objetivos particulares

- ❖ Establecer la distribución de los agentes etiológicos en las diferentes entidades federativas por grupos de edad y sexo.
- ❖ Establecer la sintomatología más frecuentemente presentada en los casos comprobados de conjuntivitis.
- ❖ Resaltar la importancia que tiene la toma de muestra en la fase aguda de la enfermedad.
- ❖ Destacar la importancia que tiene el tiempo que transcurre de la toma de la muestra a su procesamiento en el laboratorio.

HIPÓTESIS

- ❖ Con base a la sintomatología presentada en los casos probables de conjuntivitis se espera que el o los agente(s) etiológico(s) causantes de esta enfermedad sean adenovirus y/o enterovirus principalmente.

OBJETIVOS

Objetivo general

- ❖ Aislar e identificar los agentes etiológicos virales en los casos de conjuntivitis presentados en el periodo de agosto a noviembre de 1998 en diferentes estados de la República Mexicana.

Objetivos particulares

- ❖ Establecer la distribución de los agentes etiológicos en las diferentes entidades federativas por grupos de edad y sexo.
- ❖ Establecer la sintomatología más frecuentemente presentada en los casos comprobados de conjuntivitis.
- ❖ Resaltar la importancia que tiene la toma de muestra en la fase aguda de la enfermedad.
- ❖ Destacar la importancia que tiene el tiempo que transcurre de la toma de la muestra a su procesamiento en el laboratorio.

HIPÓTESIS

- ❖ Con base a la sintomatología presentada en los casos probables de conjuntivitis se espera que el o los agente(s) etiológico(s) causantes de esta enfermedad sean adenovirus y/o enterovirus principalmente.

DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Tipo de estudio

Estudio observacional, prospectivo, transversal y descriptivo

2. Caso probable

El caso de conjuntivitis se define como una infección ocular contagiosa caracterizada por fiebre, cefalea, dolor, edema palpebral, prurito, hemorragias conjuntivales, secreción seromucosa, fotofobia y sensación de cuerpo extraño en por lo menos un globo ocular, que en general remite en forma espontánea en una semana. (Dolin R. & Wright F. 1999)

2.1 Criterios de inclusión

- ❖ Toda persona que sea considerada como caso probable.
- ❖ El caso probable debe encontrarse dentro de la fase aguda de la enfermedad.
- ❖ Toda muestra deberá presentar formato de envío

2.2 Criterios de exclusión

- ❖ Toda persona que no cumpla con la definición de caso probable.
- ❖ Toda persona que sea considerada como caso probable y se encuentre fuera de la fase aguda de la enfermedad.
- ❖ Toda muestra que se encuentre sin formato de envío.

3. Tamaño de la muestra

Muestra por cuotas obligada. 567 exudados conjuntivales obtenidos de personas que presentaron casos probables de conjuntivitis en distintos estados de la República Mexicana (Baja California, Chiapas, Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tamaulipas y Veracruz) en el periodo de agosto a noviembre de 1998.

MÉTODOS

4. Toma de muestra

La toma de la muestra se realizó de la siguiente manera: se le pidió al paciente que tomara asiento e inclinara levemente la cabeza hacia atrás, se bajó el párpado y se realizó un raspado de conjuntiva con un hisopo de algodón, el cual posteriormente se colocó en un tubo que contenía solución salina estéril al 0.85 %, se etiquetó perfectamente la muestra con el nombre del paciente y se mantuvo a 4 °C hasta su procesamiento.

4.1 Aplicación de formato de envío

Después de tomar la muestra fue indispensable llenar el formato de envío en el cual se registraron los datos del paciente como: nombre completo, edad, sexo, fecha de inicio de la enfermedad, entidad federativa y sintomatología presentada. **(Anexo I)**

3. Tamaño de la muestra

Muestra por cuotas obligada. 567 exudados conjuntivales obtenidos de personas que presentaron casos probables de conjuntivitis en distintos estados de la República Mexicana (Baja California, Chiapas, Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tamaulipas y Veracruz) en el periodo de agosto a noviembre de 1998.

MÉTODOS

4. Toma de muestra

La toma de la muestra se realizó de la siguiente manera: se le pidió al paciente que tomara asiento e inclinara levemente la cabeza hacia atrás, se bajó el párpado y se realizó un raspado de conjuntiva con un hisopo de algodón, el cual posteriormente se colocó en un tubo que contenía solución salina estéril al 0.85 %, se etiquetó perfectamente la muestra con el nombre del paciente y se mantuvo a 4 °C hasta su procesamiento.

4.1 Aplicación de formato de envío

Después de tomar la muestra fue indispensable llenar el formato de envío en el cual se registraron los datos del paciente como: nombre completo, edad, sexo, fecha de inicio de la enfermedad, entidad federativa y sintomatología presentada. **(Anexo I)**

5. Tratamiento de la muestra*

A las muestras de raspado conjuntival contenidas en los tubos se les extrajo el hisopo girándolo contra las paredes del tubo, se les agregó un volumen similar al que contenía el tubo de caldo soya tripticaseína, se centrifugo la muestra a 2400 rpm durante 10 minutos, se decantó separando el sobrenadante del sedimento, al sobrenadante se le agregó antibiótico (Penicilina 10, 000 UI/mL-Estreptomicina 10, 000 mg/mL) equivalente a la décima parte de su volumen, el sedimento se resuspendió en PBS para la realización posterior de la prueba de inmunofluorescencia indirecta.

6. Propagación de líneas celulares Hep-2 y Vero*

6.1 Proceso de tripsinización

Una vez alcanzada la confluencia celular en botellas de 75 cm², las células fueron sometidas a un proceso de tripsinización, en donde primeramente se le retiró el medio que contenía la botella, se colocaron 2 mL de solución tripsina-versenato, se agitó la botella unos segundos y la tripsina fue retirada, nuevamente se colocaron 2 mL de tripsina-versenato, se agitó durante 1 minuto retirando la tripsina para colocar por tercera ocasión 2 mL de tripsina-versenato, se incubó durante 5 minutos a 37 °C, esperando que las células se desprendieran de la superficie, una vez desprendidas se agregaron 30 mL de DMEM, las células

fueron resuspendidas y trasladadas a nuevas botellas en volúmenes de 15 mL, se incubaron a 37 °C durante 48 horas.

7. Producción de placas de 24 pozos*

Una vez alcanzada la confluencia celular en las botellas de 75 cm², las células fueron sometidas a un proceso de tripsinización, una vez que las células se desprendieron se agregaron 100 mL de medio DMEM, las células fueron resuspendidas, 4 placas fueron utilizadas para la suspensión de células colocando 1 mL de ésta en cada uno de los pozos de las placas, se colocó una mica sobre los pozos y se incubaron a 37 °C durante 48 horas.

*Actividades realizadas en campana de flujo laminar previamente esterilizada con luz ultravioleta y desinfectada con solución alcohol-benzal (1:1)

8. Inoculación de muestras en cultivos de células Hep-2 y Vero*

8.1 Inoculación de muestras

Una vez que las monocapas celulares de cada uno de los pozos alcanzaron un 80 a 90 % de confluencia celular se procedió a la inoculación de los sobrenadantes de las muestras tratadas, primeramente se ordenaron y anotaron las muestras en el orden en el que iban a ser inoculadas colocándolas en una charola de hielo, enseguida a cada una de las placas se les levantó la mica y se retiró el medio de cada uno de los pozos, inoculando 50 µL de muestra en cada pozo, cada muestra fue inoculada por duplicado, dejando 2 pozos como controles negativos a los cuales se les colocaron 50 µL de DMEM como medio de

mantenimiento, las micas fueron colocadas nuevamente, las placas se incubaron a 33 °C durante 1 hora, pasado el tiempo de incubación se colocó 1 mL de DMEM de mantenimiento en cada uno de los pozos, la mica fue colocada nuevamente y las placas fueron incubadas a 33 °C durante 8-9 días.

8.2 Observación de placas inoculadas

Las placas fueron revisadas detenidamente cada 24 horas con el objeto de detectar la presencia de ECP en muestras positivas o monocapas celulares inalteradas en muestras negativas. (**Anexo II**)

9. Cosecha de muestras inoculadas en monocapas celulares*

Después de haber observado las placas durante un período de 8-9 días, algunas monocapas celulares comenzaron a presentar alteraciones morfológicas, desprendimiento celular y algunas monocapas no presentaron alteración alguna, después de este periodo a las placas se les retiró la mica, con pipetas Pasteur estériles se raspó el fondo de los pozos depositando las células y el medio en tubos etiquetados con el número de la muestra, los controles no fueron cosechados, las muestras cosechadas se mantuvieron en refrigeración a 4-8 °C. Posteriormente las células inoculadas recolectadas se sometieron a un proceso de congelamiento y descongelamiento. Debe utilizarse este procedimiento cuando una muestra clínica de un caso altamente sospechoso continúa siendo negativa a pesar del empleo de las líneas celulares y las muestras adecuadas.

9.1. Muestras negativas

Las muestras que no presentaron ECP se inocularon nuevamente en monocapas celulares siguiendo el mismo procedimiento de inoculación y cosecha antes descritos. Las muestras inoculadas que no presentaron alteraciones morfológicas o efecto citopático se sometieron por tercera vez a inoculación en monocapas celulares, para dar por descartada una posible muestra positiva.

9.2. Muestras positivas

A las muestras que presentaron ECP se les realizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta.

10. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se centrifugó la muestra cosechada a 2500 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante fue transferido a un tubo etiquetado con el número de muestra, el sedimento fue resuspendido en 1 mL de PBS, se rotularon los portaobjetos y se colocaron las muestras en cada uno de los pozos, se dejaron secar a temperatura ambiente, se colocaron los portaobjetos con las muestras ya secas en una caja de Couplin, se agregó acetona fría (4 °C) hasta cubrirlos y se dejó fijando durante 10 minutos, se quitó el exceso de acetona de los portaobjetos lavando con PBS para inmunofluorescencia (PBS para IFA), se dejó secar a temperatura ambiente, se colocó una gota de anticuerpo específico de ratón (IgG) sobre las muestras fijadas, se incubaron los portaobjetos a 37 °C durante 30 minutos en cámara

húmeda, transcurrido el tiempo se lavaron con PBS para IFA, se quitó el exceso de buffer de los portaobjetos y se agregó una gota del conjugado anti-IgG de ratón marcado con FITC a cada pozo, se incubaron nuevamente los portaobjetos a 37 °C durante 30 minutos en cámara húmeda, enseguida se lavaron los portaobjetos con PBS para IFA, se quitó el exceso de buffer de los portaobjetos y se colocó una gota de yoduro de propidio en cada pozo, se incubaron los portaobjetos a 37 °C durante 5 minutos en cámara húmeda y en la obscuridad, se lavó con PBS para IFA y se secó a temperatura ambiente, se agregó una gota de líquido de montaje en cada uno de los pozos y se colocaron los cubreobjetos, se observó al microscopio de luz ultravioleta.

11. RT-PCR

Se sabe que la conjuntivitis es una manifestación clínica ocasionada por diferentes agentes etiológicos, entre ellos el enterovirus 70 por lo que se eligieron al azar 100 muestras con efecto citopático positivo para llevar a cabo la técnica de RT-PCR.

Se realizó la extracción de RNA viral según protocolo del kit QIAamp viral RNA purification, en un tubo tipo eppendorf de 500 μ L se agregaron los siguientes reactivos: 5.5 μ L Buffer (10X), 10 μ L dNTP'S (1 μ M), 0.72 μ L EV/PCR1 (7pM), 0.69 μ L EV/PCR2 (7pM), 3.09 μ L H₂O DEPC, 5.0 μ L muestra, enseguida se agregaron dos gotas de aceite mineral, el tubo se calentó 5 minutos a 95 °C, se paso rápidamente a hielo y se agregaron los siguientes reactivos: 24.67 μ L H₂O DEPC, 0.10 μ L RNAsin (39U/ μ L), 0.15 μ L Taq (9U/ μ L), 0.08 μ L RTM-MULV (20U/ μ L), el tubo se incubó a 37 °C durante 45 minutos seguido de un ciclo de 5 minutos a 95

°C; posteriormente se sometió a 30 ciclos donde cada uno consta de los siguientes pasos: desnaturalización 45 segundos a 95 °C, alineación 45 segundos a 55 °C, extensión 45 segundos a 72°C por último se incubó el tubo en un ciclo de 7 minutos a 72 °C con el producto obtenido durante la RT-PCR se realizó una electroforesis en gel de bisacrilamida al 12 %.

12. Recolección de datos

Una vez procesadas todas las muestras y obtenidos los resultados mediante técnicas de laboratorio, se ordenaron todos los resultados en positivos y negativos, más tarde los casos positivos se agruparon de acuerdo a la entidad federativa por: sexo, grupos de edad, sintomatología y período en el que fueron reportados los casos. Por último se agruparon los casos positivos y negativos de acuerdo a los días transcurridos desde el inicio de la enfermedad a la toma de la muestra y los casos positivos y negativos de acuerdo a los días transcurridos desde la toma de la muestra y su recepción. (**Anexo III**).

RESULTADOS

1. Diagnóstico de exudados conjuntivales

1.1 Aislamiento e identificación de agentes etiológicos mediante la utilización de técnicas como cultivo celular, inmunofluorescencia indirecta y RT-PCR.

En el presente estudio se determinó, mediante la aplicación de las técnicas de cultivo celular, inmunofluorescencia indirecta y RT-PCR, que la conjuntivitis producida en el período de agosto a noviembre de 1998 en la República Mexicana fue causada por **adenovirus**, además se presentó un caso aislado de coinfección ocasionado por **enterovirus**. (*figura 1*)

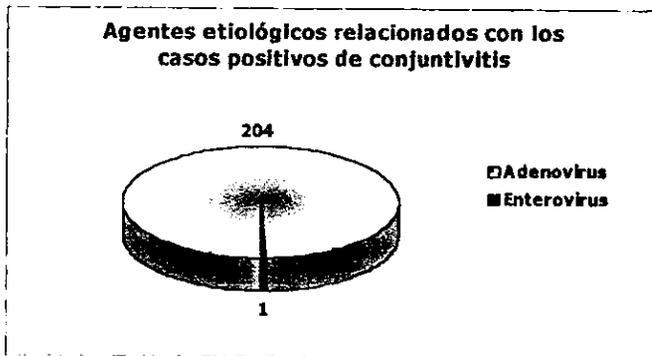


Figura 1. La gráfica muestra los casos de conjuntivitis producida por adenovirus 204 casos, enterovirus 1 caso.

De 567 exudados conjuntivales procesados por cultivo celular e inmunofluorescencia indirecta, 204 muestras resultaron positivas para adenovirus; mientras que con la técnica de RT-PCR resultó 1 muestra positiva para enterovirus. Por otro lado, 363 muestras resultaron negativas en cada una de las técnicas utilizadas después de haber sido sometidas a cultivo celular en tres ocasiones consecutivas. (*figura 2*)

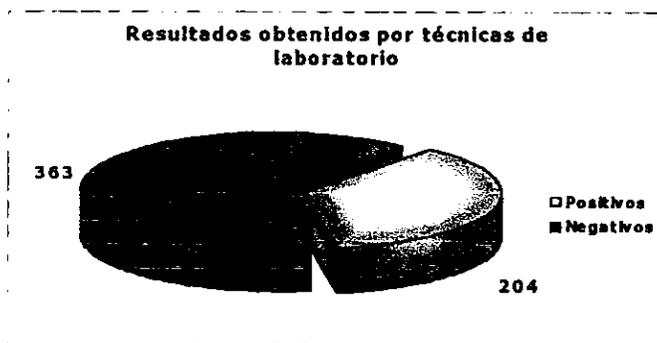
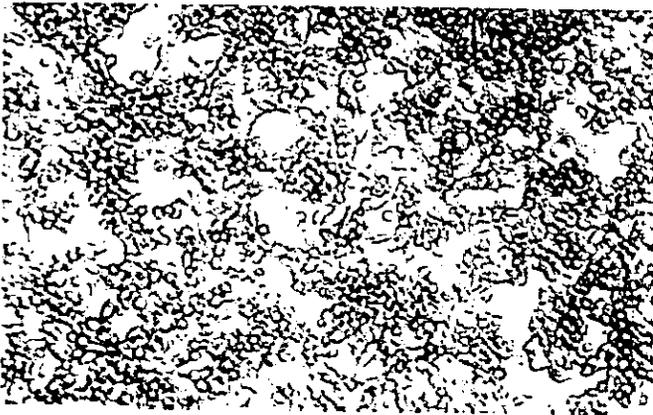
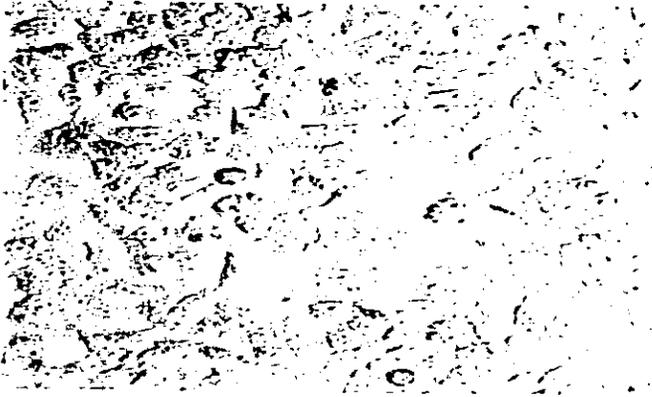


Figura 2. La gráfica muestra el número de muestras positivas y negativas obtenidas del procesamiento de 567 exudados conjuntivales mediante técnicas de laboratorio

1.1.1 Cultivo celular

567 exudados conjuntivales fueron inoculados en cultivos celulares. Las 204 muestras positivas por cultivo celular presentaron un efecto citopático característico de adenovirus en las monocapas celulares Hep-2 y Vero. Las muestras negativas no presentaron alteración alguna en las monocapas, lo cual fue comparado simultáneamente con un control negativo. (*figura 3*)



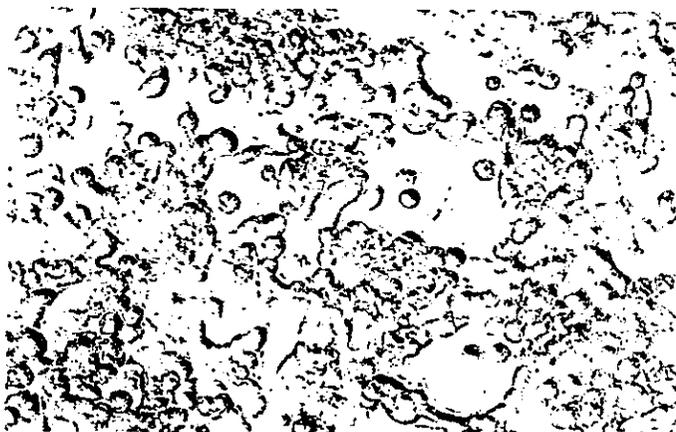
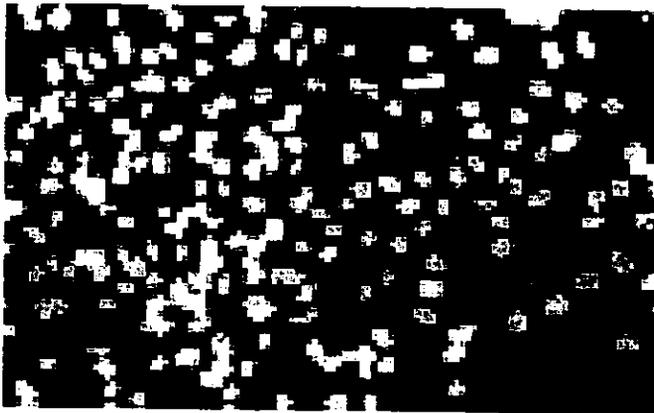
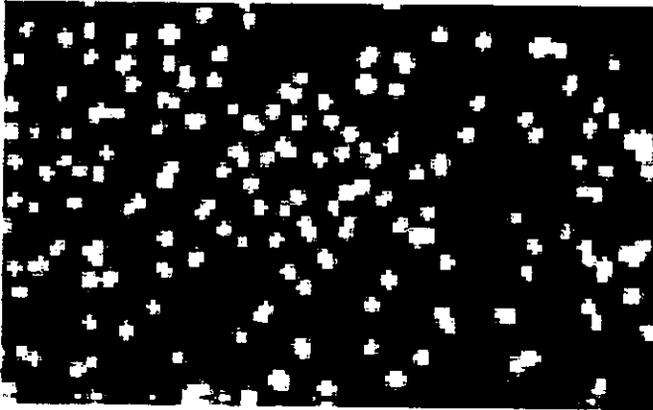


Figura 3 A) monocapa de células Hep-2 sin alteración de morfología celular (10 X) B) alteración de una monocapa celular en donde las células presentan agrandamiento, redondeamiento y agrupación en racimos irregulares o ECP (10X) C) alteración de la morfología celular o efecto citopático (40X).

1.1.2 Inmunofluorescencia indirecta

Para la identificación de las partículas virales presentes en las células conjuntivales y cultivos celulares con efecto citopático positivo se aplicó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. De la aplicación de esta técnica en sedimentos obtenidos del tratamiento de las muestras resultaron 63 muestras positivas para adenovirus. Por otro lado las 204 muestras positivas por cultivo celular presentaron una fluorescencia amarillo-verdosa en núcleo y/o citoplasma de las células, al mismo tiempo se monto un control negativo en donde las células se observaron de color rojo. (*figura 4*)



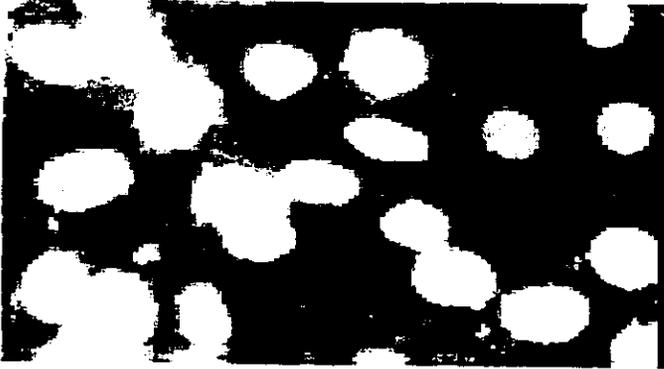


Figura 4. A) Control negativo de inmunofluorescencia indirecta; B) Inmunofluorescencia indirecta positiva a adenovirus (10X), C) Inmunofluorescencia indirecta positiva a adenovirus (40X)

1.1.3 PCR

De las 100 muestras sometidas a la técnica de RT-PCR, una muestra resultó positiva para enterovirus; sin embargo, esta muestra también fue positiva para adenovirus por cultivo celular e inmunofluorescencia indirecta.

2. Distribución de los casos positivos asociados a adenovirus en grupos de edad, sexo y entidad federativa.

2.1 Distribución en grupos de edad

Una vez diagnosticados los exudados conjuntivales, los grupos de edad más afectados en los casos positivos fueron: en primer lugar de 25 a 44 años (41.2%), en segundo lugar de 15 a 24 años (20.6%), en tercer lugar de 5 a 14 años (17.2%), en cuarto lugar de 45 a 64 años (13.2%), los grupos de edad menos

afectados fueron de 1 a 4 años y mayores de 65 años con (4.4 y 3.4%) respectivamente, en los menores de un año no se presentaron casos. (*figura 5*)

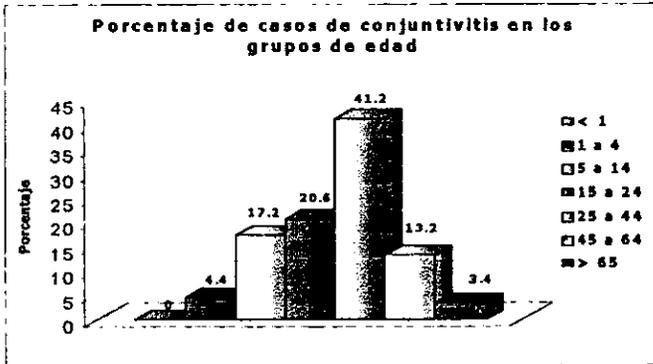


Figura 5. La gráfica muestra el porcentaje de los casos positivos en grupos de edad

2.2 Distribución por sexo

De los 204 casos positivos de conjuntivitis asociada a adenovirus se encontró que el sexo femenino fue el más afectado en un 59.8% de los casos; mientras que en el sexo masculino la enfermedad se presentó en un 40.2% de los casos. (*figura 6*)

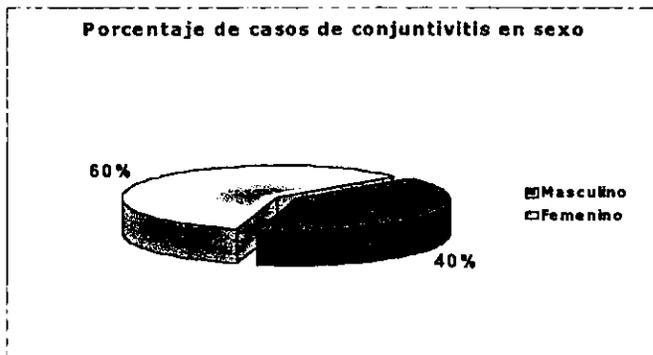


Figura 6. La gráfica muestra el porcentaje de los casos positivos en sexo

2.3 Distribución por entidad federativa

Las entidades federativas reportadas con conjuntivitis fueron ordenadas de forma decreciente, de acuerdo a los casos positivos presentados. Chiapas (24%), Tamaulipas (18%), Veracruz (15.2%), Nayarit (10.3%), Oaxaca (8.8%), Querétaro (6.4%), Puebla (3.4%), Distrito federal (3.4%), Hidalgo (2.9%), Michoacán (2.5%), Nuevo León (2%), Baja California, Jalisco y México con (1%) cada uno y por último Guanajuato con (0.5%). (*figura 7*)

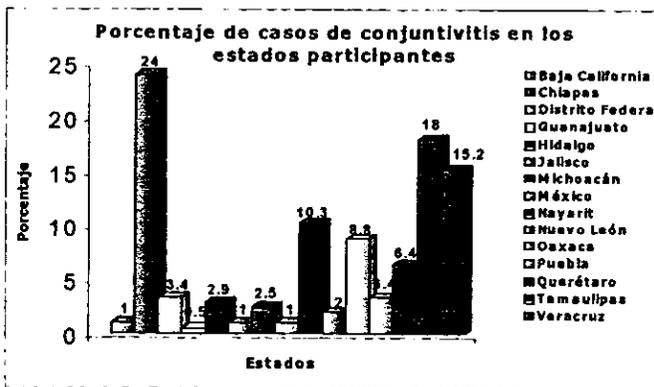


Figura 7. La gráfica muestra la distribución del porcentaje de casos positivos en las entidades federativas.

3. Sintomatología más frecuentemente presentada en los casos positivos de conjuntivitis.

La sintomatología más frecuentemente presentada en los casos positivos de conjuntivitis fue: conjuntivitis (95.6%), derrame vascular (73.5%), edema palpebral (72.1%), secreción (67.2%), cuerpo extraño (61.8%), dolor ocular (56.9%), prurito (56.9%), lagrimeo (54.4%), hiperemia (55%), cefalea (25.5%), fiebre (19.6%), ardor ocular y escalofrío (24%), manifestaciones como mialgias, artralgias y fatiga se presentaron en menos del 3% (*figura 8*)

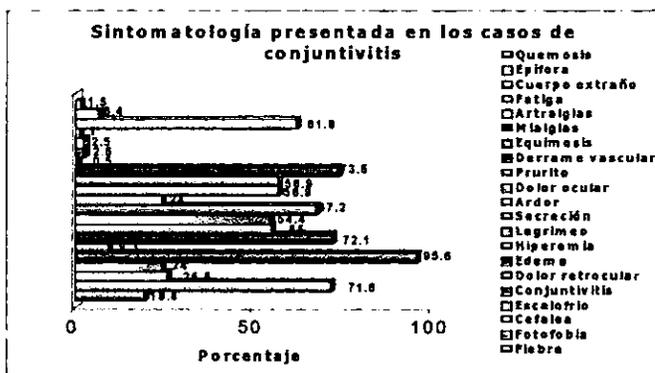


Figura 8. Sintomatología presentada por los casos positivos

4. Distribución de los casos positivos en el periodo de agosto a noviembre de 1998.

Los casos positivos de conjuntivitis se presentaron entre los meses de agosto a noviembre de 1998, los resultados muestran que en el mes de agosto se presentaron 19 casos, en septiembre los casos aumentaron a 95, en octubre disminuyó a 75 casos, y en noviembre los casos disminuyeron considerablemente a 15 casos y a finales del año ya no se reportaron casos nuevos. (figura 9)

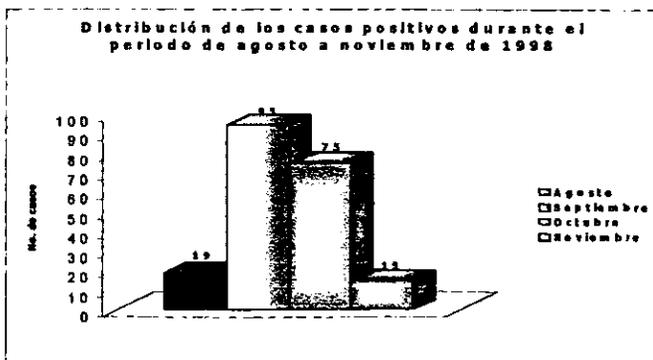


Figura 9 Distribución de los casos positivos durante el periodo de agosto a noviembre de 1998

5. Aislamientos obtenidos dependiendo de los días transcurridos del inicio de la enfermedad a la toma de muestra.

5.1 Tiempo oportuno

Los resultados muestran que entre menos tiempo pase del inicio de la enfermedad y la toma de la muestra hay más probabilidad de aislamiento para los agentes causales. Se observó que la oportunidad para un mayor número de aislamientos es dentro de las primeras 72 horas; obteniéndose 160 casos positivos y 122 casos negativos. (*figura 10*)

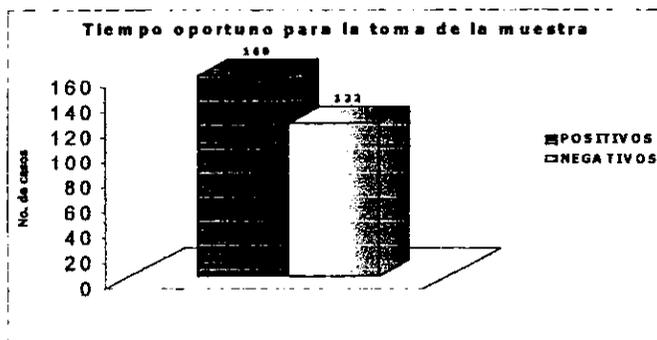


Figura 10. La gráfica muestra los casos positivos y negativos en el tiempo oportuno desde el inicio de la enfermedad a la toma de muestra

5.2 Tiempo inoportuno

Se observó que el tiempo inoportuno para el aislamiento viral fue después de las 72 horas y hasta los 14 días, obteniéndose 44 muestras positivas y 241 muestras negativas. (*figura 11*)

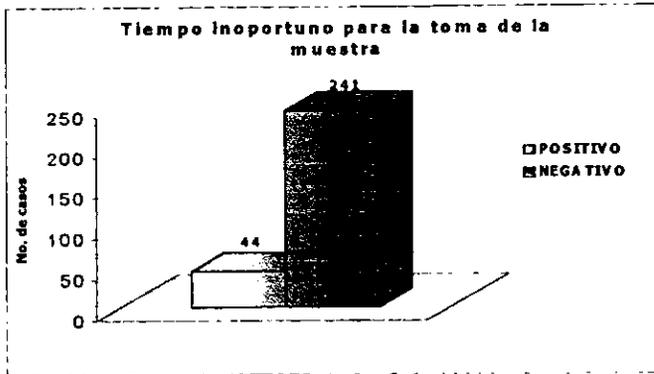


Figura 11. La gráfica muestra los casos positivos y negativos obtenidos en el tiempo inoportuno desde el inicio de la enfermedad a la toma de la muestra

6. Aislamientos dependiendo de los días transcurridos de la toma de la muestra al procesamiento de la misma

6.1 Tiempo oportuno

Los resultados muestran que entre menos tiempo pase del día de la toma de la muestra al procesamiento de la misma hay más probabilidad de aislamiento para los agentes etiológicos. Se observó que el tiempo oportuno para obtener un mayor número de aislamientos es en las primeras 48 horas después de haber tomado la muestra en donde se obtuvieron 172 casos positivos y 119 casos negativos. (*figura 12*)

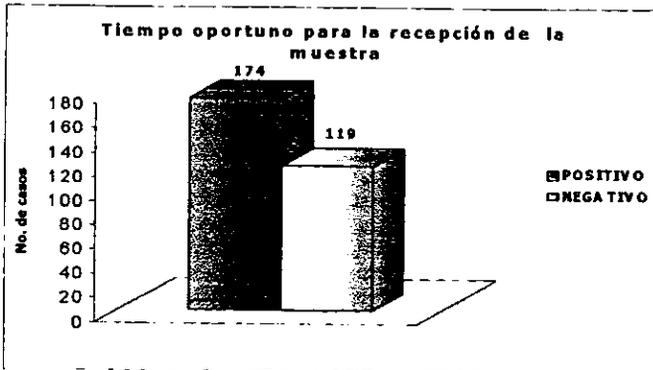


Figura 12 La gráfica muestra el número de casos positivos y negativos obtenidos dentro de 48 horas transcurridas de la toma de la muestra al procesamiento de la misma

6.2 Tiempo inoportuno

Se observó que el tiempo inoportuno para el aislamiento viral fue después de las 72 horas, obteniéndose en este tiempo 30 muestras positivas y 244 muestras negativas. (*figura 13*)

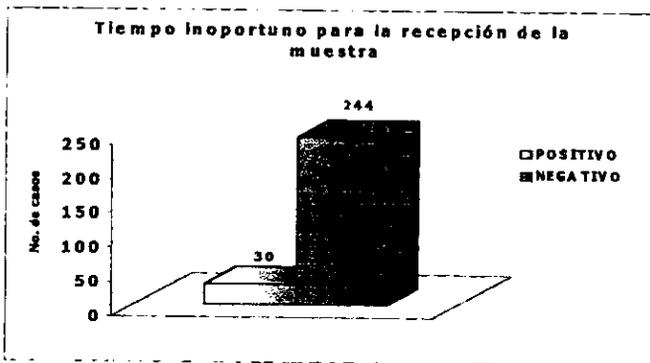


Figura 13 La gráfica muestra el número de casos positivos y negativos obtenidos en el tiempo inoportuno de la toma de la muestra al procesamiento de la misma.

DISCUSION DE RESULTADOS

El objetivo primordial de este estudio fue el aislamiento y la identificación de los agentes causales de la conjuntivitis en el periodo de agosto a noviembre de 1998 en diferentes estados de la República Mexicana, debido a que no se tiene la información suficiente sobre las diferentes manifestaciones oculares y los agentes etiológicos relacionados a ellas. La conjuntivitis es ocasionada por tres diferentes agentes etiológicos; adenovirus serotipos 3, 4, 7, 8, 19 y 37, enterovirus-70 y coxsackie A-24, este último se encuentra más limitado geográficamente que los dos anteriores; por tal motivo no se realizó un diagnóstico que lo identificara. Las técnicas utilizadas demostraron que el agente causal de la conjuntivitis en México durante el periodo de agosto a noviembre de 1998 fue el adenovirus en todos los casos positivos y solamente en uno de los casos resultó ser enterovirus-70.

Es importante destacar que el diagnóstico basado en la utilización de cultivo celular e IFI se realizó únicamente para el aislamiento y la identificación del adenovirus; sin embargo, debido a la posibilidad de encontrar presente al enterovirus-70 como agente etiológico, se realizó la técnica de RT-PCR en 100 de las 204 muestras positivas de las cuales solamente 1 muestra resultó positiva para enterovirus, esta misma muestra resultó positiva para adenovirus, estudios demuestran que existen casos en los que las hemorragias conjuntivales evolucionan a conjuntivitis hemorrágica aguda, son raros los casos pero llegan a presentarse.

El cultivo celular se utilizó como estándar de oro en el diagnóstico por su alta sensibilidad y fue de vital importancia, ya que permitió la observación de la replicación de los adenovirus mediante un ECP marcado el cual se manifestó por agrandamiento, redondeamiento y agrupamiento en racimos irregulares de las células. A pesar de la alta sensibilidad que ofrece esta técnica es esencial mantener las condiciones óptimas de temperatura y pH ya que la modificación de estos factores podría provocar una alteración en la morfología celular lo que ocasionaría un resultado falso positivo. Entre las modificaciones que pueden llegar a provocar confusiones con un ECP es la acidez del medio ya que normalmente el metabolismo celular tiende a disminuir el pH de éste. En las células infectadas esto sucede con mayor rapidez debido a que el metabolismo se encuentra más acelerado, lo que induce a una alteración en la monocapa celular seguida de un desprendimiento de las mismas si no se mantienen las condiciones adecuadas, la basicidad es menos confusa ya que ésta provoca un desprendimiento muy rápido; sin embargo, después de un fin de semana se puede pensar en un efecto citopático muy marcado seguido de un desprendimiento total de las células, en estas situaciones el color del medio es un buen indicador para conocer las condiciones de pH. La temperatura es otro factor importante ya que un aumento o una disminución de esta pueden alterar el ciclo de replicación de los virus lo que traería como consecuencia la ausencia o retraso del ECP. Muchas veces las condiciones no se pueden manipular como se quisiera por lo que es necesaria la aplicación de la IFI, para confirmar o descartar la presencia del virus.

Al practicarse la IFI sobre las células epiteliales muchas muestras resultaron negativas y más tarde positivas por cultivo celular e IFI aplicada en las células infectadas de la monocapa celular; el hecho de que las muestras fueran negativas se debió a que quizás la carga viral era tan baja que difícilmente los anticuerpos monoclonales se unieron a los pocos antígenos presentes en la muestra y por tal razón no se pudieron detectar las partículas virales por esta técnica, se sabe que el cultivo celular es una técnica capaz de aumentar el título viral hasta 1:4 a 1:16 dependiendo de la permisividad de la línea celular utilizada, por ello la razón de inocular los exudados conjuntivales en líneas celulares permisivas a los virus, además con ello demostramos la alta sensibilidad que posee esta técnica. Sin embargo, la permisividad que tienen las líneas celulares a otros virus no asegura su especificidad y es por ello que se requirió de una técnica más específica como es la IFI para la confirmación del diagnóstico del agente causal de la conjuntivitis. Las muestras positivas por IFI en las células conjuntivales fueron sometidas a la técnica de cultivo celular para corroborar la especificidad de la técnica de IFI, ya que en el cultivo celular se pudo constatar la presencia del adenovirus por su característico efecto citopático, con esto podemos destacar la gran importancia que tiene el utilizar ambas pruebas para el diagnóstico de los adenovirus.

Cabe recordar que las muestras con las cuales se trabajó fueron obtenidas de manera obligada, es decir que no se utilizó un método estadístico de muestreo por lo que toda muestra recibida que cumpliera con los principios de inclusión fue procesada para su diagnóstico, mediante este principio se encuentra dada la

distribución del adenovirus en los grupos de edad, sexo y entidad federativa, por lo tanto los resultados están reportados en porcentaje y no en tasas, ya que se desconoce el total de la población afectada.

Los datos obtenidos de los últimos 7 años referentes a los grupos de edad más afectados en los casos de conjuntivitis muestran que el rango de edad que va de 24 a 45 años, es el grupo más comprometido en esta enfermedad infecciosa, con la aplicación de cuestionarios se obtuvieron datos que señalan a ese mismo grupo de edad como uno de los más afectados para adenovirus, se presume que la razón de esto se debe a que es uno de los grupos más activos, es decir la mayoría de las personas de ambos sexos se dedican a trabajar en diferentes actividades por lo que se encuentran más en contacto con objetos contaminados por lo que es más fácil la transmisión. En el caso del sexo se observó que las mujeres fueron las más afectadas, una de las propuestas que se tiene para explicar este comportamiento es que las mujeres sufren cambios hormonales lo que provoca una disminución de la respuesta inmune facilitando la replicación viral.

La conjuntivitis es una enfermedad ocular contagiosa que se presenta generalmente en la estación de verano durante el periodo vacacional, se cree que los focos de contaminación están dados por la falta de cloración en el agua de las piscinas, lo cual fue confirmado ya que el brote de conjuntivitis comenzó a manifestarse a finales del verano en centros vacacionistas como Oaxaca y Puebla, lo cual provocó la diseminación del adenovirus y por lo tanto el contagio de los vacacionistas a familiares, compañeros de escuela y trabajo, esto trajo como

consecuencia que en los meses de septiembre y octubre los casos se elevaran en los estados de Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Querétaro, Tamaulipas, Chiapas y Veracruz, sobre todo en los dos últimos estados ya que las condiciones de hacinamiento, la utilización de agua y objetos contaminados a causa de lluvias y huracanes favorecieron el incremento de los casos, en el mes de noviembre los casos disminuyeron considerablemente presentándose únicamente en los estados de Baja California, Distrito Federal, México y Guanajuato con muy pocos casos cada uno, en el mes de diciembre ya no se reportaron casos nuevos.

Por último cabe mencionar que fueron 567 muestras recibidas en donde cada una señalaba una marcada sintomatología correspondiente a una manifestación ocular de conjuntivitis; sin embargo, solamente 204 resultaron positivas, esto no quiere decir que las personas a las que se les tomó la muestra no presentaban conjuntivitis, sino que lo más probable fue que la muestra fue tomada varios días después de haber iniciado el padecimiento en el caso de los adenovirus la posibilidad de aislamiento es hasta los 14 días y en el casos de los enterovirus es dentro de las 72 horas; otra causa por la que se hayan obtenido tantas muestras negativas se debe a que las muestras pasaron varios días en solución salina fisiológica sin ser procesadas por lo que a pesar de ser estos virus muy resistentes, no resistieron más de 72 horas en esas condiciones.

CONCLUSIONES

Después de haber realizado este estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

- ❖ Los brotes de conjuntivitis producidos en el periodo de agosto a noviembre de 1998 en diferentes estados de la República Mexicana fueron causados por **adenovirus**.
- ❖ Los estados de la República Mexicana que presentaron más casos positivos por arriba de la media son: Chiapas (24%), Tamaulipas (18%), Veracruz (15.2%), Nayarit (10.3%) y Oaxaca (8.8%).
- ❖ Los grupos de edad más afectados en los casos positivos de conjuntivitis fueron: 25 a 44 años (41.2 %), 15 a 24 años (20.6 %), 5 a 14 años (17.2 %).
- ❖ El sexo más afectado fue el femenino en (59.8 %), mientras que en el sexo masculino se presentó en (40.2 %).
- ❖ Las manifestaciones clínicas de acuerdo a la sintomatología presentada fueron conjuntivitis (76.5%), fiebre faringoconjuntival (23 %) y sólo en (0.5%) de los casos se presentó conjuntivitis hemorrágica aguda.
- ❖ Aunque no se realizó una serotipificación de los adenovirus por las manifestaciones clínicas presentadas se presume basandonos en el marco teórico, que los serotipos relacionados fueron 3, 4 y 7 ya que los serotipos 8, 19 y 37 se asocian con la queratoconjuntivitis epidémica la cual no se presentó en ninguno de los casos ya que no hubo compromiso corneal.
- ❖ Se confirmó que el éxito del aislamiento depende en gran parte de la toma de la muestra en la fase aguda de la infección y del procesamiento inmediato o casi inmediato de las muestras.

APÉNDICES

1. Material y reactivos

Líneas celulares

- ◆ Células HEP-2 (ATCC # CCL 23)
- ◆ Células Vero (ATCC # CCL 81)

Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification Kit (Chemicon # 3105)

- ◆ Anticuerpo monoclonal de ratón específico para adenovirus (Chemicon # 5000)
- ◆ Anti-Mouse IgG conjugado con FITC (Chemicon # 5008)
- ◆ Fluido de montaje (Chemicon # 5013)

Medio de cultivo

- ◆ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL # 12100-061)

Suplementos para medio de cultivo

- ◆ Suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL # 16000-044)
- ◆ Hepes Buffer 1 M (Sigma # 0-0887)
- ◆ Bicarbonato de sodio al 4.4 % (Na_2HCO_3) (Pctos. Químicos de Monterrey # 1290)
- ◆ Penicilina 10, 000 UI/mL -Estreptomicina 10, 000 Mg/mL (ICN Biomedicals # 16-702-44)

Reactivos y sales

- ◆ Acetona ($\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (J.T Baker # 9006-03)
- ◆ Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma # E-48849)
- ◆ Caldo soya tripticaseína
- ◆ Cloruro de potasio (KCl) (Reactivos y Productos Químicos Finos # RA 40162)
- ◆ Cloruro de sodio (NaCl) (Pctos. Químicos de Monterrey # 2491)
- ◆ Dimetilsulfóxido ($\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (Pctos. Químicos de Monterrey # 0700)
- ◆ Fosfato de sodio dibásico de sodio (Na_2HPO_4) (J.T Baker # 3828)
- ◆ Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) (J.T Baker # 3818)
- ◆ Tripsina-EDTA 1X (1:250) (Irvine Scientific # T-9341)

Material desechable

- ◆ Botellas para cultivo de tejidos de 75 cm² (Corning # 25110-75)
- ◆ Botellas para cultivo de tejidos de 25 cm² (Corning # 25100-25)
- ◆ Micas (Becton Dickinson # 6073)
- ◆ Pipetas serológicas de 10 mL estériles (VWR Scientific)
- ◆ Placas para cultivo de tejidos de 24 pozos (Corning # 25820)
- ◆ Puntas para micropipeta 20-200 μL (Gibco BRL # 14867-014)
- ◆ Puntas para micropipeta 200-1000 μL (Gibco BRL # 14868-0129)
- ◆ Raspador de células (Costar # 3010)
- ◆ Tubos de polipropileno de fondo cónico (Falcon # 35-2098)

- ◆ Tubos de plástico estériles (American Scientific Products # T-1226-12)
- ◆ Viales criogénicos (Nalgene # 5000-0020)
- ◆ Sistema de filtración con membrana de acetato de celulosa de 0.22 μm (Corning # 430769)
- ◆ Unidades de filtración con membrana de acetato de celulosa de 0.22 μm (MSI-micron separations inc. # DDA02025SO)

Material de vidrio

- ◆ Frascos de 100 y 500 mL (Sigma)
- ◆ Matraces aforados de 1000 mL (Kimax)
- ◆ Pipetas graduadas de 10 mL (Kimax)
- ◆ Probetas graduadas de 100 mL (Profesional)
- ◆ Vasos de precipitado de 100 y 500 mL (Kimax, Pyrex)
- ◆ Láminas para inmunofluorescencia (Bio Mériux # 75751)

Equipo

- ◆ Autoclave (Lab. Med # AERG508)
- ◆ Balanza granataria (Ohaus)
- ◆ Baño maría (Lab-line instruments # 137000)
- ◆ Bomba de vacío (General Electric)
- ◆ Campana de flujo laminar (Labconco)
- ◆ Centrifuga (Solbat # 2013)
- ◆ Cronómetro (Baxter # C6510-1)
- ◆ Estufa (Boekel)
- ◆ Micropipeta 20-200 μL (Labsystem)
- ◆ Microscopio de luz ultravioleta (Olympus # B071)
- ◆ Microscopio invertido (Olympus # M02)
- ◆ Pipetor automático (Eppendorf Easypet)

2. Preparación de soluciones

Agua de cultivo

Agua destilada c.b.p. 500 mL
 Esterilizar por autoclave

Descomplementación de suero fetal bovino

Descongelar el SFB
 Colocar en baño maría a 56 °C durante 30 minutos
 Envasar en tubos y mantener en refrigeración a - 70 °C*

Medio DMEM *

DMEM 9.98 gr
 Agua destilada c.b.p. estéril 1000 mL
 Esterilizar por filtración (0.22 μm). Guardar a 4-8 °C

Medio CDMEM para crecimiento*

SFB	10 mL
Bicarbonato de sodio al 4.4 %	2.5 mL
Hepes buffer 1M	1.5 mL
Penicilina/Estreptomina	1.0 mL
Aforar con medio DMEM a 100 mL	
Guardar a 4-8 °C	

Medio CDMEM para mantenimiento*

Bicarbonato de sodio al 4.4 %	2.5 mL
Hepes buffer 1M	1.5 mL
Penicilina/Estreptomina	1.0 mL
Aforar con medio DMEM a 100 mL	
Guardar a 4-8 °C	

Solución de Versenato

Cloruro de sodio	8.0 gr
Fosfato de potasio monobásico	0.2 gr
Cloruro de potasio	0.2 gr
Fosfato de sodio dibásico	1.15 gr
EDTA	0.2 gr
Agua c.b.p.	1000 mL
Esterilizar por autoclave. Guardar a 4-8 °C	

Solución de tripsina- versenato*

Tripsina	1.0 mL
Solución de versenato estéril	99.0 mL
Guardar a 4-8 °C	

Solución amortiguadora de fosfatos para inmunofluorescencia (PBS para IFA)

Cloruro de sodio	8.0 gr
Cloruro de potasio	0.2 gr
Fosfato de sodio dibásico	0.2 gr
Fosfato de potasio monobásico	0.2 gr
Agua destilada c.b.p	1000 mL
Esterilizar por autoclave. Guardar a 4-8 °C	

Solución de stock

Fosfato de sodio anhidro	5.98 gr
Fosfato de sodio hidratado	1.57 gr
Agua destilada c.b.p	200 mL
Se ajusta el pH a 7.2. Esterilizar por autoclave. Guardar a 4-8 °C	

Solución de trabajo

Cloruro de sodio	8.5 gr
Solución de stock	40 mL

Agua destilada c.b.p 1000 mL
Esterilizar por filtración (0.22 μ m). Guardar a 4-8 °C

Yoduro de propidio

Solución de stock (1 μ g/mL) 1.5 mL
Solución de trabajo 300 mL
Esterilizar por autoclave

Solución salina al 0.85 %

Cloruro de sodio 8.5 gr
Agua destilada c.b.p. 1000 mL
Esterilizar por autoclave

ANEXO I

DGE ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE CASO DE CONJUNTIVITIS INDRE

DATOS DEL PACIENTE

NOMBRE: _____
Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno

LOCALIDAD: _____ MUNICIPIO: _____

ESTADO: _____ EDAD: _____

SEXO: M F OCUPACIÓN: _____

INFORMACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO

ESTUDIO(S) SOLICITADO(S): _____

FECHA DE INICIO DE SINTOMAS: _____

FECHA DE TOMA DE MUESTRA: _____

SINTOMATOLOGÍA

<input type="checkbox"/> FIEBRE	<input type="checkbox"/> HIPEREMIA	<input type="checkbox"/> EQUIMOSIS
<input type="checkbox"/> FOTOFOBIA	<input type="checkbox"/> LAGRIMEO	<input type="checkbox"/> MIALGIAS
<input type="checkbox"/> CEFALEA	<input type="checkbox"/> SECRECIÓN	<input type="checkbox"/> OARTRALGIAS
<input type="checkbox"/> ESCALOFRIO	<input type="checkbox"/> ARDOR	<input type="checkbox"/> FATIGA
<input type="checkbox"/> CONJUNTIVITIS	<input type="checkbox"/> DOLOR OCULAR	<input type="checkbox"/> CUERPO EXTRAÑO
<input type="checkbox"/> DOLOR	<input type="checkbox"/> PRURITO	<input type="checkbox"/> EPIFORA
<input type="checkbox"/> RETROULAR	<input type="checkbox"/> DERRAME	
<input type="checkbox"/> EDEMA	<input type="checkbox"/> VASCULAR	
<input type="checkbox"/> QUEMO		

TRATAMIENTO

¿HA RECIBIDO TRATAMIENTO ESPECÍFICO? _____

¿CUAL? _____

ANEXO II

HOJA DE REGISTRO PARA INOCULACIÓN EN CULTIVO CELULAR
 FECHA: _____

NO.	NO. MUESTRA	NO. PASE	EFECTO CITOPÁTICO (ECP)								
			DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8	DÍA
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											

NÚMERO DE PLACA: _____
 DE LAS LECTURAS: _____

RESPONSABLE _____

LINEA CELULAR (indicar número de pase): _____

COMENTARIOS: _____

ANEXO III

	POSITIVOS	%	NEGATIVOS	%	TOTAL	%
BAJA CALIFORNIA	2	1	0	0	2	0.35
CHIAPAS	49	24	83	22.8	132	23.3
DISTRITO FEDERAL	7	3.4	13	3.6	20	3.5
GUANAJUATO	1	0.5	0	0	1	0.17
HIDALGO	6	2.9	8	2.2	14	2.5
JALISCO	2	1	3	0.8	5	0.9
MICHOACÁN	5	2.5	25	6.9	30	5.3
MÉXICO	2	1	0	0	2	0.35
NAYARIT	21	10.3	54	14.9	75	13.2
NUEVO LEÓN	4	2	5	1.4	9	1.6
OAXACA	18	8.8	15	4.1	33	5.8
PUEBLA	7	3.4	14	3.8	21	3.7
QUERÉTARO	13	6.4	26	7.2	39	6.9
TAMAULIPAS	36	18	57	15.7	93	16.4
VERACRUZ	31	15.2	60	16.5	91	16
TOTAL	204	100	363	100	567	100

TABLA 1. Agrupación del total de muestras procesados en casos positivos y negativos en cada uno de los estados de la República Mexicana involucrados.

	MASCULINO	FEMENINO	TOTAL
BAJA CALIFORNIA	1	1	2
CHIAPAS	19	30	49
DISTRITO FEDERAL	3	4	7
GUANAJUATO	0	1	1
HIDALGO	3	3	6
JALISCO	2	0	2
MICHOACÁN	2	3	5
MÉXICO	0	2	2
NAYARIT	7	14	21
NUEVO LEÓN	1	3	4
OAXACA	6	12	18
PUEBLA	2	5	7
QUERÉTARO	3	10	13
TAMAULIPAS	20	16	36
VERACRUZ	13	18	31
TOTAL	82	122	204
PORCENTAJE TOTAL	40.2 %	59.8 %	100 %

TABLA 2. Agrupación de las muestras positivas por sexo en cada uno de los estados

	B.C	CHIS	D.F	GTO	HGO	JAL	MICH	MÉX	NAY	NVO LEON	OAX	PUEB	QRO	TAMPS	VER	TOTAL	% TOTAL
< 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-4	0	4	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	9	4.4
5-14	0	9	1	0	2	0	4	0	3	1	3	0	4	5	3	35	17.2
15-24	0	9	0	1	1	0	0	0	8	0	5	2	4	8	4	42	20.6
25-44	0	20	1	0	2	1	1	1	5	3	4	2	5	21	18	84	41.2
45-64	2	6	1	0	0	1	0	0	3	0	4	2	0	2	6	27	13.2
> 65	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	2	1	0	0	0	7	3.4
TOTAL	2	49	7	1	6	2	5	2	21	4	18	7	13	36	31	204	100

TABLA 3. Agrupación de los casos positivos por grupos de edad en cada uno de los estados

	B.C	CHIS	D.F	GTO	HGO	JAL	MICH	MÉX	NAY	NVO LEON	OAX	PUEB	QRO	TAMPS	VER	TOTAL	% TOTAL
fiebre	1	11	0	0	3	1	1	0	4	1	6	2	2	5	3	40	19.6
Fotofobia	0	45	6	0	5	2	4	0	17	3	13	3	11	21	16	146	71.6
Cefalea	1	6	1	0	6	0	1	0	11	2	2	1	1	16	4	52	25.5
Escalofrío	1	38	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	5	2	49	24
Conjuntiv.	2	48	7	1	5	2	5	1	20	3	18	7	12	35	29	195	95.6
Dolor retrocular	0	5	1	0	0	0	0	0	6	3	0	0	1	3	0	19	9.3
Edema	0	43	7	0	6	1	5	1	0	2	15	5	13	29	20	147	72.1
Hiperemia	0	37	4	0	6	2	5	0	6	1	12	4	9	9	17	112	55
Lagrimeo	0	39	5	0	6	2	4	0	11	1	14	3	8	7	11	111	54.4
Secreción	0	42	4	10	6	2	5	0	11	1	15	6	12	2	21	137	67.2
Ardor	0	19	2	0	5	0	3	0	1	0	3	2	5	4	5	49	24
Dolor ocular	0	32	5	0	6	2	5	0	7	0	7	4	9	16	23	116	56.9
Prurito	0	27	6	0	5	0	4	1	10	2	9	5	11	19	17	116	56.9
Derrame vascular	0	45	7	1	1	2	5	1	10	1	13	6	13	27	18	150	73.5
Equimosis	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.5
Mialgias	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5	2.5
Atraiglas	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5	2.5
Fatiga	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	1
Cuerpo extraño	0	41	7	0	0	0	4	0	9	0	17	5	12	16	15	126	61.8
Epifora	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	4	13	6.4
Quemosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	1.5

TABLA 4. Agrupación de la sintomatología presentada por los casos positivos en cada uno de los estados afectados

	B.C	CHIS	D.F	GTO	HGO	JAL	MICH	MÉX	NAY	NVO LEON	OAX	PUEB	QRO	TAMPS	VER	TOTAL
AGOSTO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	1	0	0	0	19
SEPTIEMBRE	0	49	0	0	0	0	5	0	4	0	0	6	0	30	1	95
OCTUBRE	0	0	0	0	6	2	0	0	17	4	0	0	13	6	27	75
NOVIEMBRE	2	0	7	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	3	15
TOTAL	2	49	7	1	6	2	5	2	21	4	18	7	13	36	31	204

TABLA 5. Agrupación de los casos positivos de acuerdo al mes en que fueron reportados

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

ESTADOS	OPORTUNO		INOPORTUNO	
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
BAJA CALIFORNIA	1	0	1	0
CHIAPAS	34	14	15	69
DISTRITO FEDERAL	5	4	2	9
GUANAJUATO	0	0	1	0
HIDALGO	6	8	0	0
JALISCO	1	3	1	0
MICHOACÁN	5	0	0	25
MÉXICO	0	0	2	0
NAYARIT	19	25	2	29
NUEVO LEÓN	4	3	0	2
OAXACA	13	3	5	12
PUEBLA	5	0	2	14
QUERÉTARO	13	0	0	26
TAMAULIPAS	27	23	9	34
VERACRUZ	27	39	4	21

TABLA 6. Agrupación de los casos positivos de acuerdo a los días transcurridos desde el inicio de la enfermedad a la toma de muestra

ESTADOS	OPORTUNO		INOPORTUNO	
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
BAJA CALIFORNIA	0	0	2	0
CHIAPAS	47	1	2	82
DISTRITO FEDERAL	5	13	2	0
GUANAJUATO	1	0	0	0
HIDALGO	5	8	1	0
JALISCO	0	0	2	3
MICHOACÁN	5	0	0	25
MÉXICO	0	0	2	0
NAYARIT	16	46	5	8
NUEVO LEÓN	4	1	0	4
OAXACA	17	10	1	5
PUEBLA	5	0	2	14
QUERÉTARO	13	0	0	26
TAMAULIPAS	32	27	4	30
VERACRUZ	24	13	7	47

TABLA 7. Agrupación de los casos positivos de acuerdo a los días transcurridos desde la toma de la muestra a su recepción

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ 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: 291-94.
- ❖ Braude IA, Davis EC, Fierer J. *Microbiología clínica*. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1984: 611, 665-67
- ❖ Cumming H. *Virología. Cultivo de tejidos*. México: Editorial El manual moderno, 1985: 12-14
- ❖ Curtis S, Wilkinson G, Westmoreland D. An outbreak of epidemic keratoconjuntivitis caused by adenovirus type 37. *J. Med. Microbiol.* 1998; 47: 91-2.
- ❖ Davis DB, Dulbeco R, Eisen NH, Ginsberg SH. *Tratado de microbiología*. 3ª edición. México: Editorial Salvat, 1990: 857, 860-61
- ❖ Dolin R, Wright FP. *Viral infections of the respiratory tract*. New York: Editorial Marcel Dekker, 1999: 224-27, 232, 237-3
- ❖ Fields NB, Howley MP. *Fields virology*. 3ª edición. Estados Unidos: Editorial Lippincott Raven, 1996: 2112-13
- ❖ Hay R, Caputo J, Chen TR, Macy M, Reid Y, McClintock P. *American type culture collection catalogue of cell lines & hybridomas*. 7ª edición. Estados Unidos: 1992: 17,48
- ❖ Hjordis MF. *Viral infections of human epidemiology and control*. 3ª edición. Estados Unidos: 1995: 79-80
- ❖ Jawetz E, Melnick LJ, Adelberg AE, Brooks FG, Butel J, Ornston NL. *Microbiología*

- médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 14ª edición. México: Editorial El Manual Moderno, 1992: 506
- ❖ Jernigan AJ, Lowry SB, Hayden GF, Kyger AS, Conway PB, Gröschel AS., *et al.* Adenovirus type 8 epidemic keratoconjunctivitis in an eye clinic: risk factors and control. *J. Infect. Dis.* 1993; 167: 1307-13
 - ❖ Joklik KW, Wilett PH, Amos BD, Wilfert MC. *Zinsser microbiología*. 20ª edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1996: 1289-94
 - ❖ Lennette HE. *Laboratory diagnosis of viral infections*. Estados Unidos: Editorial Marcel Dekker, 1985: 139-43
 - ❖ Lin HK, Wang LH, Sheu MM, Huang LW, Chen WC, Yang SC., *et al.* Molecular epidemiology of a variant of coxsackievirus A24 in Taiwan: two epidemics caused by phylogenetically distinct viruses from 1985 to 1989. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 1160-61
 - ❖ Mandell LG, Douglas GR, Benett EJ. *Enfermedades infecciosas principios y práctica*. 3ª edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1991: vol 2: 1427, 1452-53
 - ❖ Mandell D, Bennetts. *Principles and practice of infectious Diseases*. 4ª edición. New York: Editorial Churchill Livingstone, 1995.
 - ❖ Mclean MD, Thomas CC. *Virological infections for students and practitioners of medicine and allied*. Springfield Illinois: Editorial Health Sciences, 1989: 266-69
 - ❖ McMinn CP, Stewart J, Burrell JC. A community outbreak of epidemic keratoconjunctivitis in central Australia due to adenovirus type 8. *J. Infect. Dis.* 1991; 164: 1113
 - ❖ Murray P. Drew W, Kobayash G, Thompson J. *Microbiología médica*. España:

- Editorial Mosby, 1992: 495-96
- ❖ Roitt MI. *Essential immunology*. 8ª edición. Francia: Editorial Blackwell scientific publications, 1994: 131-132
 - ❖ Schaechter M, Medoff G, Eisenstein IB, Guerra H. *Microbiología mecanismos de las enfermedades infecciosas (enfoque mediante resolución de problemas)*. 2ª edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1994: 518-24
 - ❖ Schapetiuk KS, Norton R, Kok T, Irving GL. Outbreak of adenovirus type 4 conjunctivitis in south Australia. *J. Med. Virol.* 1993; 41: 136
 - ❖ Shiao S, Aoki K, Isobe K, Tsuzuki LW, Itoh N, Toba K., *et al.* Genome analysis of adenovirus type 3 isolated in japan. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 413
 - ❖ Shulman LM, Manor Y, Azar R, Handsher R, Vonsover A, Mendelson E., *et al.* Identification of a new strain of fastidious enterovirus 70 as the causative agent of an outbreak of hemorrhagic conjunctivitis. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 2145-46.
 - ❖ Stites PD, Terr IA, Parslow GT. *Inmunología básica y clínica*. 8ª edición. México: Editorial El manual moderno, 1996. 224
 - ❖ Takeuchi R, Nomura Y, Kojima M, Uchio E, Kobayashi N, Matumoto M. A nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis due to adenovirus type 37. *Microbiol. Immunol.* 1990; 34: 749-50.
 - ❖ Thompson AR. *La práctica de la inmunología clínica*. México: Editorial El manual moderno. 1996: 85
 - ❖ Volk AW, Benjamin CD, Kadner JR, Parsons TJ. *Microbiología médica*. 3ª edición. México: Editorial Interamericana-McGraw-Hill, 1988: 647-48
 - ❖ Weir MD, Stewart J. *Inmunología*. 2ª edición. México: Editorial El manual moderno,

1995: 298-299

- ❖ Wood RS, Sharp IR, Owen CE, Paul I, Bailey AS, Hawkins M., *et al.* Rapid detection and serotyping of adenovirus by direct immunofluorescence. *J. Med. Virol.* 1997; 51: 198-99.