

## TESINA DE GRADO

### LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

#### OPCIÓN BIOLOGÍA MOLECULAR

# Desarrollo de una metodología basada en biología molecular para la rápida detección de enterovirus en muestras clínicas

---

*Lic. Irena Chacón*

**Tutora: Dra. Laura García Aguirre**

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**CENTRO HOSPITALARIO PEREIRA ROSSELL**



**2012**

---



# INDICE

---

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>9</b>
1.1 Enterovirus.....	10
1.2 Morfología y Estructura genómica.....	10
1.3 Características antigénicas. Clasificación.....	12
1.4 Variabilidad genética.....	14
1.4.1 Procesos evolutivos.....	14
1.5 Epidemiología.....	14
1.5.1 Aspectos demográficos.....	14
1.5.2 Transmisión.....	15
1.5.3 Prevalencia e Incidencia de la enfermedad.....	16
1.6 Patogenia.....	17
1.7 Características clínicas.....	17
1.7.1 Infecciones asintomáticas.....	17
1.7.2 Síntomas clínicos.....	18
1.7.3 Meningitis aséptica.....	18
1.8 Diagnóstico.....	20
1.8.1 PCR de la región 5'UTR.....	21
1.8.2 PCR del gen VP1.....	21
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Optimización y puesta a punto de diferentes metodologías.....	26
3.1.2 Muestra.....	26

3.1.3 Extracción de ARN.....	26
3.1.4 Transcripción reversa y PCR (RT-PCR) utilizando los oligonucleótidos 1S, 1A y 2S.....	26
3.1.4.1 Procedimiento de transcripción reversa (RT).....	28
3.1.4.2 Procedimiento de round de PCR semi-anidada (sn-PCR).....	28
3.1.4.3 Modificación de procedimiento de RT y rounds de sn-PCR.....	29
3.1.5 Reacción de RT-PCR OneStep.....	30
3.1.6 2º round a partir de OneStep.....	30
3.1.7 Optimización del 2º round de PCR a partir de ADN obtenido a través de OneStep.....	31
3.1.8 Combinaciones de juegos de oligonucleótidos en ensayo de OneStep.....	33
3.1.9 2º round a partir de OneStep con combinaciones de oligonucleótidos.....	33
3.2 Procesamiento de muestras clínicas.....	34
3.2.1 Muestras Clínicas.....	34
3.2.2 Extracción de ARN a partir de LCR.....	34
3.2.3 Procedimiento para la amplificación de EV en LCR.....	34
3.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	35
3.3.1 Procedimiento.....	35
3.4 Controles.....	36
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 Optimización y puesta a punto.....	38
4.2 Epidemiología.....	47
<b>5. DISCUSION.....</b>	<b>49</b>

<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>7. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>55</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>57</b>

# ABREVIATURAS

---

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	Ácido Ribonucleico
APdA	ARN polimerasa dependiente de ARN
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EV	Enterovirus
g	Gramos
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
Kb	Kilobases
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	Molar
ml	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
ORF	Marco abierto de lectura
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-PCR	Transcripción reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa
SNC	Sistema Nervioso Central
U/ $\mu$ L	Unidades por microlitro
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$ M	Micromolar
UTR	Región no codificante
UV	Ultravioleta
VPg	Proteína unida al genoma

# RESUMEN

---

Los enterovirus (género *Enterovirus*, familia *Picornaviridae*) son un grupo de agentes virales responsables de importantes y frecuentes enfermedades humanas con manifestaciones clínicas muy variadas, que se transmiten en la mayoría de los casos por vía fecal-oral. Se encuentran asociados con diversas manifestaciones clínicas que van desde fiebre sin foco hasta casos más severos. Los enterovirus (EV) son la causa más común de meningitis viral en niños y en adultos hasta en un 70% de los casos. Actualmente se considera que aproximadamente el 85% de las meningitis virales son causadas por EV no polio (principalmente Echovirus y Coxsackie) en todo el mundo. El presente trabajo tuvo como objetivo la puesta a punto y optimización de una metodología basada en biología molecular para la rápida detección de EV en muestras clínicas (LCR). Dicho protocolo fue realizado para su utilización en el reciente laboratorio de biología molecular diagnóstica perteneciente al único hospital público de niños del Uruguay, Hospital Pereira Rossell. Este protocolo incluyó diversas técnicas como extracción de ARN viral a partir de LCR y la posterior amplificación de una región del gen que codifica para la proteína VP1 mediante una PCR semi-anidada. Durante este trabajo se probaron distintas combinaciones de oligonucleótidos como también se establecieron variables tales como temperatura, concentración de oligonucleótidos, ciclo de incubación, etc., más adecuadas que permitieran la correcta amplificación de la región de interés. Mediante el empleo de esta novedosa técnica se pudo realizar rápidamente la amplificación de 15 de las 33 muestras analizadas provenientes de pacientes pediátricos con EV. Así mismo, a partir de datos obtenidos de pacientes pediátricos, cuyas muestras fueron analizadas para detectar EV, se realizó un estudio epidemiológico y se observó que dichos virus presentan una determinada frecuencia temporal como una marcada estacionalidad. Finalmente, pudo elaborarse un protocolo que permitirá en un futuro, mediante el empleo de la secuenciación de los amplicones obtenidos, no solo detectar los EV sino genotipificar los mismos. De esta forma se podrá realizar un detallado estudio que contemple el análisis de la epidemiología molecular de estos importantes virus que afectan la salud de nuestros niños.

# 1. INTRODUCCIÓN

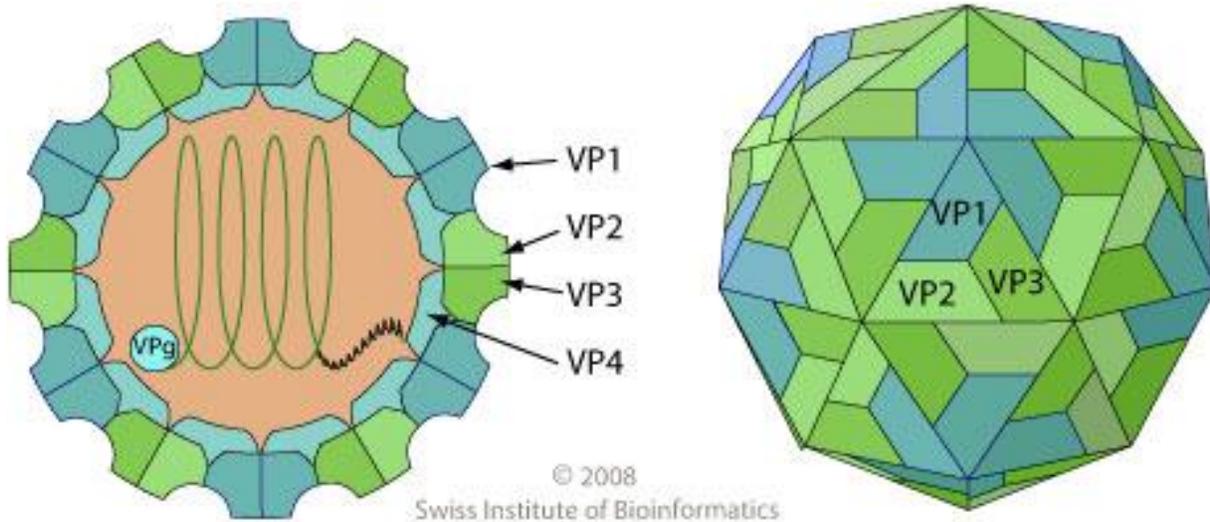
---

## 1.1 ENTEROVIRUS

Los enterovirus (EV) pertenecen al género Enterovirus, el cual se encuentra dentro de la familia *Picornaviridae*. Éstos, representan un grupo de agentes virales que habitan en el intestino y son los responsables de importantes y frecuentes enfermedades humanas con manifestaciones clínicas muy variadas (Sandín & Rodríguez, 2006).

## 1.2 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA GENÓMICA

Los EV son virus desnudos que presentan simetría icosaédrica y un diámetro de aproximadamente 30nm (Sandín & Rodríguez, 2006). La cápside viral está compuesta por 60 subunidades proteicas densamente empaquetadas y cada subunidad está constituida por 4 polipeptidos VP1, VP2, VP3 y VP4. Ésta última se encuentra localizada en la cara interna de la cápside (Fig.1). Así mismo, la cápside protege al genoma viral, el cual está constituido por un hebra simple de ARN de polaridad positiva con tamaño aproximado de 7.2 a 8.5kb (Hulo *et al.*, 2011). Dicho genoma se encuentra poliadenilado en su extremo 5' y presenta un único marco abierto de lectura (ORF) que codifica para una poliproteína (Sandín & Rodríguez, 2006). De forma de unificar criterios para la nomenclatura de las proteínas virales, la poliproteína ha sido dividida en tres regiones: P1, P2 y P3. La región P1 codifica para las proteínas de la cápside viral (proteínas estructurales), mientras que las regiones P2 y P3 codifican para las proteínas involucradas en la replicación y morfogénesis viral (Fields 5ª edición) (Fig. 2).



**Figura 1.** Estructura del virión. No envuelto, esférico, de aproximadamente 30 nm de diámetro, compuesto por una cubierta de proteína que rodea el ARN genómico desnudo. Extraído de Swiss Institute of Bioinformatics.

Por otro lado, el genoma de los EV es infeccioso debido a que puede ser traducido inmediatamente después a su entrada en la célula, y de este modo sintetizar todas las proteínas virales requeridas para la replicación viral. Además, el genoma de los miembros de la familia *Picornaviridae* es único, ya que se encuentra covalentemente unido en su extremo 5' no codificante (UTR) a una proteína llamada VPg (proteína del virión vinculada al genoma) (Flanegan *et al.*, 1977; Lee *et al.*, 1977). Dicha proteína puede variar en longitud, desde 22 a 24 residuos aminoacídicos (Forss & Schaller, 1982) (Fig. 2). La misma cumple un rol fundamental en el inicio de la síntesis de ARN por parte de la ARN Polimerasa Dependiente de ARN (APdA).

Análisis de secuencias nucleotídicas de muchos miembros de esta familia han revelado un patrón común de organización. Las regiones 5' UTR son extensas (624 a 1.199 nucleótidos) y altamente estructuradas. Las mismas, contienen secuencias que gobiernan y regulan la replicación y traducción del genoma viral. A su vez, la región 5' UTR contiene el sitio interno de entrada al ribosoma (del inglés IRES; Internal Ribosom Entry Site), una compleja estructura secundaria de ARN que presenta gran afinidad por la subunidad menor ribosomal y controla la traducción viral mediante la unión a este y posteriormente al complejo necesario para la misma. De esta manera la traducción de ARNm virales es regulada y

controlada por esta estructura situada en el 5'UTR del genoma viral (Duke *et al.*, 1990; Hahn & Palmenberg, 1995). El extremo 3' UTR es relativamente más corto y el mismo también está involucrado en procesos de regulación viral pero en menor medida (Jacobson *et al.*, 1993).

### 1.3 CARACTERÍSTICAS ANTIGÉNICAS. CLASIFICACIÓN

Los picornavirus se encuentran entre los virus ARN más simples, teniendo una cápside altamente estructurada con poco espacio para su elaboración. Sin embargo, a pesar del limitado material genético y las limitaciones estructurales, la evolución dentro de los mismos ha resultado en una gran diversificación de miembros fácilmente distinguibles. Ésta variabilidad ha sido categorizada antigénicamente como serotipo. Cada serotipo se correlaciona con la respuesta inmunológica del hospedero humano, la protección contra la enfermedad, el receptor usado, y en menor medida, el espectro de la enfermedad clínica. Estas correlaciones, sin embargo, tienen sólo una relación parcial con el esquema de nombres (Oberste *et al.*, 2000).

Ésta limitación proviene de la clasificación original de los EV en virus Polio, virus Coxsackie A y B, y Echovirus, basada en la enfermedad específica humana que causan (poliomielitis), patogenicidad en ratones lactantes (virus Coxsackie) y su crecimiento en cultivos celulares (Echovirus). Dentro de cada uno de estos grupos, los virus aislados pueden ser fácilmente distinguibles sobre la base de su antigenicidad medida a través de antisueros animales. Estos grupos antigénicos, que definen los serotipos, se han convertido en algo más complicado a medida que el número de virus se ha incrementado. A pesar de estas limitaciones, los serotipos siguen siendo la única propiedad física más importante que diferencia los distintos EV (Fields 5ª edición).

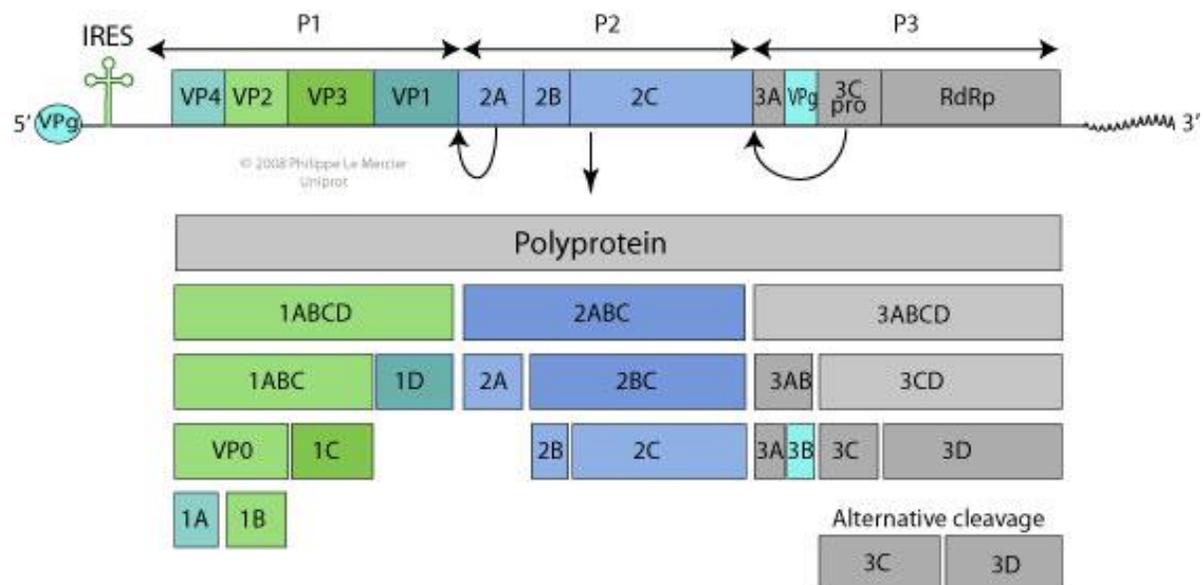
La familia *Picornaviridae* está integrada por 6 grupos:

1. Aphthovirus
2. Cardiovirus
3. EV
4. Hepatovirus
5. Parechovirus
6. Rinovirus

Los dos primeros (Aphthovirus y Cardiovirus) son virus patógenos de animales solamente a diferencia de EV y rinovirus, donde hay serotipos patógenos humanos y serotipos patógenos animales (Sandín & Rodríguez, 2006).

Los EV replican en el tracto digestivo como su nombre indica y como es de esperar son resistentes a ambientes con bajo pH. Éste género incluye a los Poliovirus (3 serotipos), Coxsackievirus A (23 serotipos), Coxsackievirus B (6 serotipos), Echovirus (28 serotipos), EV humanos (4 serotipos) y muchos virus entéricos no humanos (Fields 5ª edición).

Los EV comparten gran número de características clínicas, epidemiológicas y ecológicas, así como



**Figura 2.** Estructura genómica. Monopartita, linear, formado por una sola hebra de ARN de sentido positivo que codifica para una poliproteína. Extraído de Swiss Institute of Bioinformatics.

ciertas propiedades físicas y químicas. Difieren entre sí por su comportamiento en cultivo, antigenicidad y ciclo replicativo (Lerma & Farga, 2000).

Se conocen aproximadamente 70 serotipos que causan infecciones, muchas veces clínicamente inaparentes, pero que, en un pequeño porcentaje de casos, dan lugar a enfermedades graves del sistema nervioso central, como la meningitis aséptica, encefalomiелitis, ataxia cerebral, síndrome de Guillain –Barré, miелitis transversa y poliomiелitis, entre otras. Aunque determinados EV se asocian con

frecuencia a brotes epidémicos, dando lugar a un síndrome específico, los mismos serotipos pueden, en otras ocasiones, ser responsables de infecciones esporádicas, con distintas manifestaciones clínicas, incluso asintomáticas. Por otro lado, diferentes virus pueden producir el mismo síndrome. Por estas razones, en general, las manifestaciones clínicas no son una base satisfactoria para el diagnóstico (Lerma & Farga, 2000).

## 1.4. VARIABILIDAD GÉNÉTICA

### 1.4.1. MECANISMOS GENÉTICOS

Entre los mecanismos genéticos que emplean los EV para generar variabilidad se encuentran:

**i) Mutación puntual:** Los virus ARN, debido a la falta de capacidad correctora de la ARN polimerasa viral, presentan una elevada tasa de mutaciones del orden de  $10^{-4}$  sustituciones por sitio por año (s/s/a), lo que les permite organizarse en poblaciones de muy alta diversidad genética denominadas cuasiespecies, es decir como una nube de mutantes fuertemente relacionadas genéticamente (Domingo, 2002). Esta característica les confiere a los virus de ARN una gran capacidad de adaptación a los cambios.

**ii) Recombinación:** Debido a la circulación simultánea de diferentes estirpes (pertenecientes o no a distintos genotipos) en un mismo hospedero, la recombinación es un importante mecanismo para la generación de diversidad genética, pudiendo ocasionar la aparición de cepas con mayor capacidad de replicación, mayor capacidad de transmisión o más virulentas. Entre los EV los procesos de recombinación tanto intra como intergenotípica, son muy comunes (Lukashev *et al.*, 2003).

## 1.5 EPIDEMIOLOGÍA

### 1.5.1 ASPECTOS DEMOGRAFÍCOS

A pesar de la naturaleza casi ubicua de las infecciones por EV y la gran variedad de manifestaciones clínicas, la demografía de las variadas infecciones y enfermedades poseen algunas características consistentes. En particular, varios factores que incluyen la edad, sexo y nivel socioeconómico tienen grandes efectos predecibles (Modlin, 2005a).

Uno de los determinantes más importantes en la infección por EV es la edad. Diferentes grupos de edades poseen diferente susceptibilidad a las infecciones, severidad de la enfermedad, manifestaciones clínicas, y pronóstico durante una infección por EV (Cisterna *et al.*, 2007).

El virus se elimina en mayor cantidad y por más tiempo durante la infección primaria con un determinado serotipo. Debido a que la infección es muy común, la mayoría de las infecciones primarias ocurren durante la niñez. Por estas razones, los niños pequeños son los transmisores más importantes de EV, particularmente dentro de los hogares. La gran exposición de los niños al virus durante la infección hace más probable la aparición de síntomas clínicos significantes (Gondo *et al.*, 1995; Irvine *et al.*, 1967).

Autores han señalado que las encefalitis y meningitis asépticas causadas por EV aparecen con más frecuencia entre los 5 y los 14 años (Moore, 1982). Las enfermedades por EV, y posiblemente también las infecciones, ocurren más frecuentemente en hombres que en mujeres (Gondo *et al.*, 1995; Moore *et al.* 1984), aunque ciertas excepciones han sido descritas (Dechkum *et al.*, 1998). Las infecciones por EV son más prevalentes entre personas con bajo nivel socioeconómico y que habitan en áreas urbanas (Hall *et al.*, 1970; Jenista *et al.*, 1984).

### 1.5.2 TRANSMISIÓN

Los EV pueden ser aislados del tracto digestivo inferior y superior, y pueden transmitirse tanto por vía fecal oral como por vía respiratoria. La transmisión por vía fecal oral predomina en áreas con malas condiciones sanitarias, mientras que la transmisión por vía respiratoria es más importante en áreas más desarrolladas (Horstmann, 1967). La importancia relativa de los distintos modos de transmisión probablemente varía con el EV en particular y el entorno ambiental. Se cree que la mayoría de los EV, exceptuando los EV tipo 70, pueden ser transmitidos por vía fecal oral; sin embargo, no se sabe si la mayoría puede también transmitirse por vía respiratoria (Kono, 1975). La transmisión ocurre dentro de una comunidad, particularmente donde existe acumulación de personas. A su vez, como muchos otros virus, los EV pueden ser transmitidos rápidamente dentro de instituciones donde existen las condiciones dadas (ej., hacinamiento, mala higiene, o agua contaminada) (Alexander *et al.*, 1993).

Aunque los EV humanos pueden ser aislados de variadas fuentes ambientales, se piensa que el hombre es el único reservorio natural importante (Dowdle & Birmingham, 1997; Feachem *et al.*, 1981). No se conoce si existen reservorios no humanos. La supervivencia más allá de unas pocas semanas generalmente no se produce, aunque los EV pueden sobrevivir por meses en condiciones ambientales

favorable como pueden ser: ambientes con pH neutro, humedad, y bajas temperaturas, especialmente en presencia de materia orgánica, que protege contra la inactivación (Fields 5ª edición).

### 1.5.3 PREVALENCIA E INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD

Los datos de incidencia sobre las enfermedades causadas por determinados EV en particular pueden derivar de planes de vigilancia prospectivos de una población definida, o una muestra de una población, en donde la ocurrencia de la enfermedad y/o de la infección pueda ser realmente determinada (Cooney *et al.*, 1972; Kogon *et al.*, 1969; Strikas *et al.*, 1986).

Información menos útil está basada en la búsqueda pasiva de casos. Ésta recopilación de datos puede ser incompleta debido a que este sistema de vigilancia es adecuado para identificar casos solamente si éstos son fácilmente reconocibles y son diagnosticados por alguien que decida reportarlo. Ya que dichos datos no indican el número de personas enfermas que no fueron reportados ni las personas que obtuvieron pruebas de laboratorio con resultados negativos, la información es sobre todo de valor cualitativo; sin embargo, puede ser útil para indicar tendencias (Bell & McCartney, 1984; Strikas *et al.*, 1986).

La excreción de EV no implica necesariamente una asociación con la enfermedad, dado que muchas de las excreciones se dan de manera asintomática. Esto se aplica particularmente a países en desarrollo donde los EV son ubicuos y las infecciones en niños son comunes y generalmente silenciosas (Fields 5ª edición).

La actividad de los EV en las poblaciones puede ser esporádica o epidémica, y ciertos tipos de EV pueden producir la ocurrencia de enfermedades tanto de forma esporádica como epidémica. Además puede ocurrir que ciertas cepas queden excluidas cuando una cepa en particular es predominante en una comunidad; sin embargo, en grandes comunidades durante el verano, donde se presentan enfermedades producidas por EV, existe típicamente co-circulación de distintos tipos simultáneamente y sin ningún patrón en particular (Fields 5ª edición).

Un concepto importante para entender la epidemiología de los EV es la variación: de serotipo, de tiempo, de localización geográfica y de enfermedades. La variación según la ubicación es una de las grandes características de los EV. Los brotes pueden estar restringidos a pequeños grupos como escuelas y guarderías o a comunidades selectas, o pueden extenderse de forma regional, nacional o incluso de forma internacional. En pequeños grupos se pueden dar brotes que a veces pueden estar

vinculados epidemiológicamente a fallas en la práctica de higiene. Incluso durante brotes nacionales de un serotipo específico, la ubicación de la actividad del virus puede no ser uniforme (Fields 5ª edición). En climas templados, los EV son encontrados característicamente durante el verano y a principios del otoño, algunos brotes pueden incluso continuar hasta el invierno. De hecho, la ocurrencia natural de los EV posee patrones estacionales distintos de circulación que varían geográficamente (Moore, 1982).

## 1.6 PATOGENIA

La patogenia de las infecciones por EV ha sido estudiada a nivel molecular, celular y de órganos blanco. Los EV se distinguen por su estabilidad a pH ácido, característica responsable de su habilidad para pasar la barrera gástrica y alcanzar su sitio de infección primaria, específicamente las placas de Peyer en el intestino, donde ocurre una significativa replicación viral. Seguidamente ocurre una viremia menor que siembra numerosos órganos incluyendo el sistema nervioso central (SNC), hígado, pulmones y corazón. Una replicación mayor en estos sitios resulta en una viremia secundaria asociada con los síntomas y signos de la infección viral. La patogenia y patología de las infecciones por EV depende de la virulencia, tropismo e inóculo de virus así como de factores específicos del huésped (Sandín & Rodríguez, 2006). El período de transmisión se da entre el tercer y el décimo día mientras que el período de incubación tiene una duración de 3-7 días (Heyman, 2005).

## 1.7 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

### 1.7.1 INFECCIONES ASINTOMÁTICAS

La gran mayoría de las infecciones por EV son asintomáticas. Sin embargo, estos virus pueden provocar un gran espectro de diferentes síntomas clínicos cuando dan paso a la enfermedad.

Los serotipos individuales generalmente conducen a una variada sintomatología y procesos que llevan a la enfermedad. De manera similar, los desordenes clínicos individuales generalmente pueden ser causados por diferente número de EV (Fields 5ª edición).

## 1.7.2 SINTOMAS CLINICOS

Los EV no polio son responsables de un gran número de enfermedades, muy frecuentes en niños y recién nacidos, con una gran variabilidad de cuadros clínicos. La forma más frecuente de presentación es la enfermedad febril inespecífica, que en los niños hace pensar generalmente en una sepsis bacteriana.

Otras de las manifestaciones clínicas más frecuentes son:

1. Tracto respiratorio: resfrío común, faringitis, herpangina, estomatitis, neumonía y pleurodinia.
2. Tracto gastrointestinal: vómitos y diarrea, dolor abdominal y hepatitis.
3. Ojo: conjuntivitis aguda hemorrágica.
4. Corazón: miocardio-pericarditis.
5. Piel: exantema.
6. Neurológicas: meningitis aséptica, encefalitis y parálisis.

Si bien cada uno de estos cuadros puede ser causado por diferentes EV no polio se han visto fuertes asociaciones entre determinados serotipos y ciertos cuadros clínicos incluyendo los siguientes: virus Coxsackie A24 y EV 71 en el síndrome mano-pie-boca; virus Coxsackie A24 y EV 70 en la conjuntivitis hemorrágica aguda; EV 71 en la encefalitis y parálisis flácida aguda semejantes a poliomielitis; Echovirus 9 en exantema petequeal y meningitis; Echovirus 30 en meningitis; virus Coxsackie B1-B5 en miocardio-pericarditis y asociados a encefalomiocarditis neonatal fulminante (Sandín & Rodriguez, 2006).

## 1.7.3 MENINGITIS ASEPTICA

Las meningitis y las encefalitis son las patologías neurológicas de origen infeccioso más importantes por su frecuencia de aparición (Anderson *et al.*, 2004; Mateos *et al.*, 2006). Los virus son los agentes etiológicos más frecuentes en estos eventos, siendo en muchos casos casi imposible la identificación del agente responsable (Anderson *et al.*, 2004). En Uruguay, hasta la fecha, no se ha realizado una vigilancia epidemiológica sistemática de las meningitis/encefalitis virales, dada la alta complejidad que reviste la

identificación de los posibles agentes responsables. Son escasos los estudios realizados en torno a este tema en nuestro país, así como en la mayor parte de los países de la región (Cisterna et al., 2007; Soler et al., 2001; Salamano et al., 2009; Salamano et al., 1999; Somma et al., 1970).

Dichos estudios, no permiten conocer con exactitud la magnitud y comportamiento de los agentes implicados y en consecuencia, no ha sido posible realizar una caracterización epidemiológica adecuada de los mismos. Es por esta razón, que desde el Ministerio de Salud Pública surge la necesidad de incorporar las capacidades de laboratorio necesarias a fin de establecer un Protocolo de Vigilancia Nacional de Meningitis/Encefalitis/Meningoencefalitis virales. De este modo, surgirá el conocimiento requerido a fin de implementar las medidas necesarias para el control y manejo de estos eventos. Dentro de la amplia gama de agentes virales involucrados, existe gran variabilidad en lo que refiere a modo de transmisión y reservorio que presentan (Modlin, 2005a). Es por ésta razón que es de vital importancia conocer cuál/cuales de ellos son etiologías prevalentes en nuestro país y de ese modo determinar los mecanismos apropiados de prevención y control. Las características epidemiológicas y la etiopatogenia de las meningitis y encefalitis virales son determinadas por múltiples factores, entre los que se destaca: estado inmune del caso, lugar de residencia, condiciones climáticas, presentando en muchos de los agentes patrones de estacionalidad típicos, con comportamiento endemo-epidémico en muchas partes del mundo (Heyman, 2005; Mateos et al., 2006).

Las meningitis virales se caracterizan por la inflamación de las leptomeninges. Su denominación deja implícita la ausencia de compromiso de parénquima cerebral o médula espinal (correspondientes a encefalitis y mielitis respectivamente). Sin embargo, una proporción no despreciable de casos cursa con elementos de ambos cuadros, constituyendo una meningonencefalitis (Vokshoor, 2009). Las meningitis virales son denominadas por muchos autores como meningitis aséptica (Heyman, 2005; Vokshoor, 2009). Múltiples agentes determinan meningitis viral en el hombre, entre los cuales se encuentran: EV, arbovirus, virus urleano, herpesvirus, entre otros. Sin embargo, se estima que en uno de cada 3 casos ocurrido en los EEUU no es posible identificar el agente responsable (Vokshoor, 2009). Actualmente se considera que aproximadamente el 85% de las meningitis virales son causadas por EV no polio, principalmente Echovirus y Coxsackie, en todo el mundo (Vokshoor, 2009). Esta enfermedad es, en muchas ocasiones, indiferenciable de una meningitis bacteriana aguda y hasta ahora no se cuenta con un examen de laboratorio suficientemente rápido y seguro que permita discriminar entre ambas patologías, lo que favorece la hospitalización e innecesaria indicación de antimicrobianos en pacientes con meningitis viral (Rotbart et al., 1999; Hernandez et al., 1996).

Habitualmente, los pacientes se presentan con: fiebre, cefalea, irritabilidad, náuseas/vómitos, rigidez de nuca, rash o astenia de 18-36 hs de evolución. En más del 50% de los casos es posible encontrar vómitos, diarrea, tos y mialgias (Anderson *et al.*, 2004; Heyman, 2005; Vokshoor, 2009).

La tasa de mortalidad asociada a meningitis viral es menor a un 1% (a excepción de los casos ocurridos durante el período neonatal) (Heyman, 2005; Vokshoor, 2009). Existe controversia en referencia a las secuelas a largo plazo en niños. Estudios realizados atribuyen a las meningitis virales la presencia de trastornos del aprendizaje, neuromusculares y sordera. Los lactantes que cursan una meningitis viral en sus primeros meses de vida, pueden presentar un riesgo mayor de trastornos del lenguaje posterior (Vokshoor, 2009).

El pronóstico de las meningitis virales es habitualmente muy bueno, resolviéndose el cuadro en un plazo de 7-10 días. El diagnóstico de meningitis viral trae implícita la naturaleza auto-limitada del cuadro. Sin embargo, los recién nacidos no siempre presentan este comportamiento, siendo en muchos casos fatal o causa importante de morbilidad. La presencia concomitante de encefalitis incrementa la probabilidad de una mala evolución. Otros factores indicadores de mal pronóstico son la presencia de pericarditis y hepatitis (Heyman, 2005; Mateos *et al.*, 2006; Vokshoor, 2009).

En Argentina, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) del Ministerio de Salud, que recibe notificaciones de meningo-encefalitis desde 1970, recibió más de 500 informes de casos de meningitis virales en el año 2004. En el período 1995-1998, siete brotes de meningitis aséptica fueron notificados en distintas regiones de la Argentina. Por otro lado, existe escasa información sobre la importancia de los EV humanos como agentes productores de encefalitis en este país (Cisterna *et al.*, 2007).

## 1.8 DIAGNOSTICO

Los Picornavirus han sido tradicionalmente clasificados por su tipo antigénico, a través de ensayos basados en la neutralización de los mismos. Sin embargo, éste método demanda gran tiempo y es extremadamente laborioso, como también es sensible a la agregación de los virus y a la variación antigénica, y requiere de un gran número de antisueros para identificar todos los serotipos, incluso cuando se utilizan pools de antisueros (Oberste *et al.*, 2000).

El método tradicional de diagnóstico virológico es el aislamiento en cultivo celular, método altamente específico pero técnicamente complejo, de alto costo (requiere al menos de tres líneas celulares), de baja sensibilidad (35 a 75%) y lento en la obtención de resultados (3,7 a 8,2 días). Debido a esto último,

muchas veces la situación del paciente se resuelve antes de obtener el resultado del laboratorio virológico (Romero, 1999; Ahmed *et al.*, 1997).

Desde las primeras publicaciones sobre el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizando previamente una transcripción reversa (RT) en el estudio de meningitis aséptica en niños, se anticipó que podría ser una buena herramienta para reducir los tiempos de hospitalización y el uso de terapia antimicrobiana (Romero, 1999; Rotbart, 1990; Schlesinger *et al.*, 1994).

Los EV pueden detectarse mediante aislamiento viral o PCR desde hisopado faríngeo y rectal, orina, suero o plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR); considerando que pueden excretarse durante períodos largos por faringe o por heces, los últimos tres tendrían mayor importancia clínica. De éstos, en diversos estudios el LCR ha resultado ser la muestra de mayor rendimiento (Rotbart *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 1997; Rotbart *et al.*, 1997).

### 1.8.1 PCR DE LA REGIÓN 5' UTR

Los test de diagnóstico molecular para la detección de EV en muestras clínicas usualmente tienen como objetivo el sitio altamente conservado en la región 5'UTR, permitiendo la detección de todos los miembros del género (Romero, 1999). Muchos EV no crecen de forma rápida en cultivos celulares; por esto, los test diagnósticos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son frecuentemente más sensibles que los métodos tradicionales. Debido a su mayor sensibilidad y a la obtención de resultados confiables en un período de tiempo clínicamente relevante, la técnica de PCR se está convirtiendo rápidamente en la nueva técnica “gold standard” para la detección de EV (Hamilton *et al.*, 1999; Read *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 2002; Vuorinen *et al.*, 2003). A pesar de todo lo dicho anteriormente estos ensayos son específicos de género y proveen un resultado que nos indica si la muestra es positiva o negativa para EV, pero no puede ser utilizada para la identificación de serotipos (Nix *et al.*, 2006).

### 1.8.2 PCR DEL GEN VP1

Se ha demostrado que la secuencia del gen VP1 se correlaciona con los serotipos de los EV determinados por métodos antigénicos (Oberste *et al.*, 1999), de tal manera que los virus pueden ser identificados mediante la comparación de una secuencia parcial de VP1 con una base de datos que

contenga secuencias. Primers genéricos para RT-PCR han sido desarrollados para amplificar todos los serotipos de EV humanos, como también diversos rinovirus y otros picornavirus. La amplificación por RT-PCR del gen VP1 y su posterior secuenciación han sido usados para discriminar entre las distintas cadenas de todos los serotipos de EV humanos, para identificar EV aislados de muestras clínicas, para identificar EV que eran resistentes a la clasificación antigénica, y para identificar nuevos serotipos potenciales. La adaptación de primers genéricos mejora la sensibilidad de los ensayos y permite el análisis de muestras clínicas como también el aislamiento de los EV (Oberste *et al.*, 1999).

Aunque la detección de virus en muestras clínicas mediante la amplificación de la región 5' UTR ha conseguido una alta sensibilidad y la secuenciación de la región VP1 provee una manera práctica para identificar EV, la identificación de los serotipos directamente de muestras clínicas ha sido considerablemente más problemático. En primer lugar se debe al bajo título viral que usualmente encontramos en las muestras; como resultado se pueden dar amplificaciones no específicas en lugar de la amplificación específica del virus. Han sido desarrollados varios ensayos de PCR que incluyen una transcripción reversa anidada (RT-nested PCR) o semianidada (RT-snPCR) para solucionar este problema (Casas *et al.*, 2001; Nix *et al.*, 2004; Thoelen *et al.*, 2003). Sin embargo estos métodos pueden tener como objetivo solo un subconjunto de serotipos de EV (Thoelen *et al.*, 2003) o basarse en primers altamente degenerados que contengan inosina utilizados en ambos pasos de la PCR para aumentar la sensibilidad y así incluir todos los serotipos (Casas *et al.*, 2001; Nix *et al.*, 2004), lo que puede afectar la especificidad. El uso de primers degenerados que contiene inosina a menudo resulta en amplificaciones no específicas de ácidos nucleicos de la célula huésped que pueden interferir con el producto de amplificación del virus en particular (Rose *et al.*, 1998).

## 2. OBJETIVOS

---

## 2.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar y poner a punto una metodología basada en biología molecular para la rápida detección de EV en LCR de pacientes pediátricos con diagnóstico de meningitis aséptica o encefalitis viral, mediante la amplificación por PCR de la región VP1. Asimismo, otro punto importante dentro del objetivo general del presente trabajo fue establecer un primer abordaje epidemiológico acerca de la incidencia de EV en pacientes Uruguayos.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Adquirir conocimientos y entrenamiento en técnicas de biología molecular aplicadas tanto a la clínica como a la investigación básica.
- Optimizar las variables adecuadas en cuanto a la técnica de PCR en un solo paso para detectar EV desde LCR.
- Evaluar y comparar distintas combinaciones de oligonucleótidos descritos anteriormente en su capacidad de lograr una óptima amplificación de una región parcial del gen VP1 de EV.
- Estudiar el comportamiento epidemiológico de los EV que circulan en el Uruguay, a partir de los datos clínicos de los pacientes, en cuanto a la incidencia del virus durante los meses del año como también en las distintas estaciones climáticas.

# 3. MATERIALES Y METODOS

---

## 3.1. Optimización y puesta a punto de diferentes metodologías

### 3.1.2 Muestra

Para la puesta a punto de las técnicas se utilizó como muestra el sobrenadante obtenido a partir de cultivos de Coxsackie B4 en células Rd(A), el mismo fue conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.3. Extracción de ARN

El ARN de los Coxsackie se extrajo a partir de sobrenadante de cultivo celular, utilizando un kit de extracción de ARN viral de QIAGEN (QIamp Viral RNA Mini Kit), de acuerdo con las especificaciones brindadas por el fabricante.

### 3.1.4. Transcripción reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) utilizando los oligonucleótidos 1S, 1A y 2S

La amplificación de la región del gen VP1 se realizó mediante una PCR semi-anidada (semi-nested PCR) la cual consta de dos rounds de PCR.

La síntesis de ADNc para la posterior amplificación de la región de interés se realizó a partir de  $5\ \mu\text{l}$  de ARN, utilizando en un principio el oligonucleótido 1A (reverse) (ver Tabla 1).

En la primer PCR se utilizaron 2 oligonucleótidos degenerados: 1S (forward) y 1A (reverse) (ver Tabla 1).

Para la amplificación del segundo round de PCR también se utilizaron oligonucleótidos degenerados: se utilizó el oligonucleótido 1A (reverse) usado en el primer round de PCR y el oligonucleótido 2S (forward) (ver Tabla 1), el cual presenta una posición interna con respecto a los oligos del primer round. Este sistema permite aumentar considerablemente la sensibilidad y la especificidad del método.

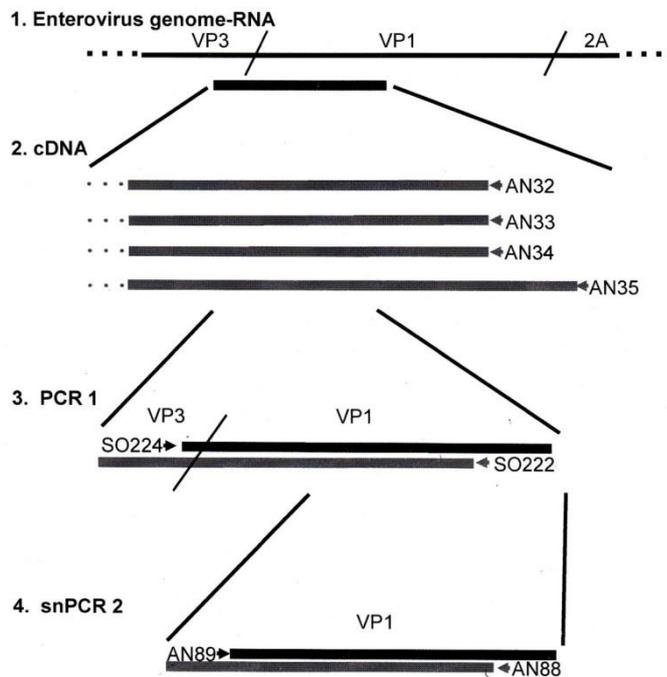
**Tabla 1.** Secuencias de oligonucleótidos utilizados para las dos rondas de amplificación de la región VP1.

Oligonucleótido	SECUENCIA	Sentido	Región
1S	5' GGT TYG AYI TGG ARI TIA CIT TYG T 3'	Forward	VP1
1A	5' TGI GAY TGR TAY CTI KYK GGR TAR TA 3'	Reverse	VP1
2S	5' ARW TWA TGT AYR TIC CIC CIG GIG 3'	Forward	VP1
SO224	5' GCI ATG YTI GGI ACI CAY RT 3'	Forward	VP1
SO222	5' C ICC IGG IGG IAY RWA CAT 3'	Reverse	VP1
AN89	5' CCA GCA CTG ACA GCA GYN GAR AYN GG 3'	Forward	VP1
AN88	5' TAC TGG ACC ACC TGG NGG NAY RWA CAT 3'	Reverse	VP1
AN232	5' CCAGCACTGACAGCA 3'	Forward	VP1
AN233	5' TACTGGACCACCTGG3'	Reverse	VP1

I= Deoxyinosina      Y= C o T      R= A o G      N= G, A, T o C      W= A o T

Oligos 1S, 1A, 2S: Extraídos de Protocolo de trabajo para la detección y genotipificación de enterovirus, flavivirus y virus de las paperas en meningitis y/o encefalitis en líquido claro.

Oligos SO222, SO224, AN89, AN88, AN 232, AN233: Extraídos de Protocolo CDC: RT-snPCR Amplification and Sequencing of the Enterovirus VP1 Gene for Serotype Identification: Protocols for Clinical Specimens



**Figura 3.** Diagrama de oligos utilizados en la optimización y en el procesamiento de muestras clínicas. Extraído de Protocolo CDC: RT-snPCR Amplification and Sequencing of the Enterovirus VP1 Gene for Serotype Identification: Protocols for Clinical Specimens

### 3.1.4.1 Procedimiento de Transcripción reversa (RT)

La RT se realizó en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  conteniendo por cada 5  $\mu\text{L}$  de ARN extraído: 5  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril libre de ARNasas, 1  $\mu\text{L}$  del primer 1A en una concentración de 50 pmol/ $\mu\text{L}$  y 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs en una concentración de 10 mM cada uno. La reacción se inició a 65°C durante 5 minutos y luego se la dejó en hielo durante 1 minuto.

Posteriormente se incorporó a la mezcla de reacción 4  $\mu\text{L}$  de buffer RT 5X (Fermentas), 2  $\mu\text{L}$  DTT (0.1M, Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de ADN polimerasa ARN dependiente (RevertAid™ M-McLV Reverse) (200 U/ $\mu\text{L}$ , Fermentas) y 1  $\mu\text{L}$  inhibidor de ARNasas (Invitrogen). Se sometió esta mezcla de reacción a 42°C durante 60 minutos y a 72°C por 10 minutos en un termociclador (Corbett Research).

### 3.1.4.2 Procedimiento de PCR semi-anidada (sn-PCR)

El primer round de PCR se realizó mediante la conformación de la siguiente mezcla de reacción: 34,5  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada libre de ARNasas, 1  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido 1A (reverse) y 1  $\mu\text{L}$  de 1S (forward) ambos en una concentración de 15 pmol/ $\mu\text{L}$ . También se requirió 2,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50mM (Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10mM, 5,5  $\mu\text{L}$  de buffer PCR 10x (Invitrogen), 0,5  $\mu\text{L}$  de *Taq* polimerasa (Platinum® *Taq* DNA Polymerase, Invitrogen) en una concentración de 5 U/ $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$  de ADNc. En los casos en que se utilizó 20  $\mu\text{L}$  de ADNc se requirió 6,5  $\mu\text{L}$  de buffer PCR 10x y 33,5  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada libre de ARNasas.

Esta preparación se incubó a 95°C durante 5 minutos, luego se sometió a 50 ciclos de 95°C – 1 minuto, 65°C – 10 segundos, 60°C – 10 segundos, 55°C – 10 segundos, 50°C – 10 segundos, 45°C – 10 segundos, 42°C – 30 segundos, 72°C – 1 minuto y por último a 72°C durante 10 minutos en el mismo termociclador citado anteriormente. Luego se mantuvo la preparación a 4°C hasta realizar sobre la misma el segundo round de PCR.

El segundo round de PCR se realizó de la siguiente manera: por reacción se utilizaron 35  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada libre de ARNasas, 1  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido 1A (reverse) y 1  $\mu\text{L}$  de 2S (forward) ambos en una concentración de 15 pmol/ $\mu\text{L}$ . También se requirió 2,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50mM (Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10mM, 5  $\mu\text{L}$  de buffer PCR 10x (Invitrogen), 0,5  $\mu\text{L}$  de *Taq* polimerasa (Platinum® *Taq* DNA Polymerase, Invitrogen) en una concentración de 5 U/ $\mu\text{L}$  y 5  $\mu\text{L}$  de ADN del primer round. Se realizó el mismo ciclo de incubación que en el primer round.

### 3.1.4.3 Modificación de procedimiento de RT y rounds de sn-PCR

Con el fin de lograr la optimización de la técnica de PCR se realizaron cambios en el procedimiento de transcripción reversa y en ambos rounds de PCR.

En primer lugar para la realización de la RT se utilizaron oligonucleótidos hexámeros. La RT se realizó en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  conteniendo por cada 5  $\mu\text{L}$  de ARN extraído: 3  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada libre de ARNasas, 2  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos hexámeros en una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs en una concentración de 10mM cada uno. La reacción se inició a 65°C durante 5 minutos y luego se la dejó en hielo durante 1 minuto.

Posteriormente se incorporó a la mezcla de reacción 4  $\mu\text{L}$  de buffer RT 5X (Fermentas), 2  $\mu\text{L}$  DTT (0.1M Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de ADN polimerasa ARN dependiente (RevertAid™ M-McLV Reverse) (200 U/ $\mu\text{L}$ , Fermentas) y 1  $\mu\text{L}$  inhibidor de ARNasas (Invitrogen). Se sometió esta mezcla de reacción a 25°C durante 10 minutos y a 42°C por 60 minutos en el termociclador citado anteriormente. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta su posterior amplificación por PCR.

El primer round de PCR se realizó mediante la conformación de dos mezclas de reacción conteniendo cada una un juego de oligonucleótidos diferente. Una de las mezclas se conformó de igual manera que la citada anteriormente en el primer round, mientras que la otra se realizó de la siguiente manera: 34,5  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada libre de ARNasas, 1  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido SO224 (forward) (ver Tabla 1) y 1  $\mu\text{L}$  de SO222 (reverse) (ver Tabla 1, Fig. 3) ambos en una concentración de 15 pmol/ $\mu\text{L}$ . También se requirió 2,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50mM (Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10mM, 5,5  $\mu\text{L}$  de buffer PCR 10x (Invitrogen), 0,5  $\mu\text{L}$  de *Taq* polimerasa (Platinum® *Taq* DNA Polymerase, Invitrogen) en una concentración de 5 U/ $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$  de ADNc. Se realizó el mismo ciclo de incubación en escalera citado anteriormente.

A continuación se realizaron una serie de PCR semi-anidadas que consistían en un primer round utilizando los oligonucleótidos SO224 (forward) y SO222 (reverse) y luego con el producto obtenido se llevaron a cabo segundos rounds con los oligonucleótidos AN89 (forward) y AN88 (reverse) (ver Tabla 1, Fig. 3). En uno de éstos se utilizó una *Taq* polimerasa Hot Start (Fermentas) y se cambió el ciclo de incubación, el cual se realizó de la siguiente manera: primero se incubó la preparación a 95°C durante 2 minutos con el fin de activar la *Taq* polimerasa, luego se sometió a 30 ciclos de 95°C – 1 minuto, se dividieron las muestras en tres grupos y cada uno de ellos se incubó a 50°C- 1 minuto, 55°C- 1 minuto, 60°C- 1 minutos, luego todos los grupos se incubaron a 72°C 1 minuto. Por últimos todas las muestras se sometieron a 72°C entre 5 y 15 minutos.

### 3.1.5. Reacción de RT-PCR One Step

Con el fin de lograr la amplificación del gen VP1 se utilizó un kit de Qiagen (OneStep RT-PCR kit) que realiza en una misma reacción la RT y la PCR. La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera siguiendo las indicaciones del fabricante: 21  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas, 1  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido SO224 FORWARD y 1  $\mu\text{L}$  de SO222 REVERSE ambos en una concentración final de 0,6  $\mu\text{M}$ . También se utilizó 2  $\mu\text{L}$  de dNTP's 400  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 10  $\mu\text{L}$  de QIAGEN OneStep RT-PCR buffer 5x con una concentración final de 2,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 2  $\mu\text{L}$  de enzima QIAGEN OneStep RT-PCR y 10  $\mu\text{L}$  de ARN extraído.

La preparación se incubó en primer lugar a 50°C durante 30 minutos. Durante este tiempo se llevó a cabo la transcripción reversa (SO222). Luego se incubó a 95°C durante 15 minutos. En este paso se activa la HotStarTaq ADN polimerasa, se inactiva la transcriptasa reversa (Omniscrypt and Sensiscrypt Reverse Transcriptases) y se desnaturaliza el ADNc. A continuación se sometió a 42 ciclos de 94°C – 1 minuto, se dividió la preparación en tres grupos y se realizó el annealing a tres temperaturas diferentes 50°C, 51,4°C y 60°C cada una durante 1 minuto, 72°C -1 minuto y por último a 72°C durante 10 minutos en el termociclador (Corbett Research). Luego se mantuvo la preparación a 4°C hasta realizar sobre la misma el segundo round de PCR.

### 3.1.6. 2º Round a partir de OneStep

Se realizó un segundo round a partir del primero realizado con el kit OneStep. Este se realizó de la siguiente manera: 34,5  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada libre de ARNasas, 1  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido AN89 (forward) y 1  $\mu\text{L}$  de AN88 (reverse) ambos en una concentración de 10 pmol/ $\mu\text{L}$ . También se requirió 2,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50mM (Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de dNTP's 10mM, 5,5  $\mu\text{L}$  de buffer PCR 10x (Invitrogen), 0,5  $\mu\text{L}$  de *Taq* polimerasa (Platinum® *Taq* DNA Polymerase, Invitrogen) en una concentración de 5 U/ $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$  de ADN. Esta mezcla de reacción se incubó a 94°C durante 3 minutos, luego se sometió a 42 ciclos de 94°C- 1 minuto, 50°C-60°C- 1 minuto, 72°C- 1 minuto y por último a 72°C durante 10 minutos.

### 3.1.7. Optimización del 2º round de PCR a partir de ADN obtenido a través de OneStep

A partir del producto amplificado obtenido del OneStep se realizaron varios PCR variando la temperatura y la cantidad de  $MgCl_2$  con el fin de lograr la optimización del segundo round de PCR. Las distintas temperaturas utilizadas fueron las siguientes: 56°C, 58°C, 60°C y 62°C. En los ensayos en donde se varió la temperatura se utilizó ADN que fue obtenido empleando una temperatura de annealing de 50°C. Mientras que en los ensayos en donde se utilizaron diferentes cantidades de  $MgCl_2$ , las cuales fueron 1,5 y 2,5  $\mu L$ , se usó ADN que fue sometido a una temperatura de annealing de 60°C. En este segundo round la temperatura de annealing utilizada para este ensayo fue de 50°C. Las demás variables se mantuvieron igual que en los segundos rounds realizados previamente.

Se realizó un primer round de OneStep utilizando una temperatura de annealing de 50°C y los oligonucleótidos SO224 (forward) y SO222 (reverse), sin cambios en las demás variables. Este ensayo se realizó según las indicaciones del fabricante tal como fueron citadas anteriormente.

A partir de este OneStep se realizaron varios PCR:

- En una primera instancia de optimización se realizó un segundo round de PCR donde se utilizaron los siguientes juegos de oligonucleótidos: AN89 (forward) y AN88 (reverse) citados anteriormente, y AN232 (forward) y AN233 (reverse) (ver Tabla 1, Fig. 3). Las mezclas que contenían cada juego de oligonucleótidos fueron sometidas a dos temperaturas de annealing: 50°C y 60°C. Las demás variables utilizadas fueron las mismas que en los rounds anteriores como también el ciclo de incubación.
- En otro PCR realizado a partir del ADN obtenido del OneStep, se utilizaron los oligonucleótidos AN89 (forward) y AN88 (reverse) y una temperatura de annealing de 60°C. En este caso se varió el ciclo de incubación el cual se realizó de la siguiente manera: primero se incubó a 95°C durante 2 minutos y luego se realizaron 42 ciclos de 95°C- 30 segundos, 60°C- 20 segundos y 72°C- 15 segundos. Por último a 72°C durante 10 minutos.
- En un siguiente segundo round de PCR se volvieron a utilizar los juegos de oligonucleótidos AN89 (forward) y AN88 (reverse), AN232 (forward) y AN233 (reverse), utilizando una temperatura de annealing de 50°C y estableciendo el siguiente ciclo de incubación: en primer lugar se incubó a 94°C por 1 minuto y luego se llevaron a cabo 42 ciclos de 94°C- 1 minuto, 50°C- 30 segundos, 72°C- 30 segundos y por último las mezclas se sometieron a 72°C por 10 minutos y luego a 23°C durante 1 minuto.

- Asimismo, siguiendo con esta instancia de optimización volvimos a utilizar los oligonucleótidos AN89 (forward) y AN88 (reverse) probando distintas temperaturas de annealing para estos oligonucleótidos las cuales fueron: 50°C, 55°C y 60°C. Las demás variables se aplicaron tal como se indicaron anteriormente. Se procedió con el siguiente ciclo de incubación: en primer lugar se incubó a 94°C durante 1 minuto y luego se realizaron 42 ciclos de: 94°C-1minuto, 50°C-60°C- 1minuto, 72°C-1 minuto y finalmente 72°C por 10 minutos. En los siguientes rounds se aplicó el mismo ciclo de incubación variando en cada caso la temperatura de annealing hasta conseguir la temperatura adecuada.
- Previo a la realización de otro siguiente segundo round se realizó un primer round de OneStep por duplicado. En este caso se utilizaron dos temperaturas de annealing, 50°C y 60°C, y dos concentraciones diferentes de oligonucleótidos: 2 y 4µL. Las demás variables permanecieron incambiadas. A continuación se procedió a realizar un segundo round en el cual se utilizó una temperatura de annealing de 50°C y se utilizaron nuevas combinaciones de oligonucleótidos. En este caso las combinaciones utilizadas fueron: AN89 (forward) y SO222 (reverse), AN232 (forward) y SO222 (reverse). En ambos juegos de oligonucleótidos la concentración utilizada fue de 2µL. El ciclo de incubación utilizado en este caso fue el mismo que en el segundo round de PCR anterior.
- Continuando con la optimización del segundo round se realizaron diferentes mezclas con el siguiente juego de oligonucleótidos AN89 (forward) y SO222 (reverse) y en cada una de ellas se usó una concentración distinta de oligonucleótidos: 2, 3 y 4µL, y tres temperaturas de annealing: 50°C, 53°C y 58°C. El resto de las variables permanecieron iguales. Se realizó el mismo ciclo de incubación que en el caso anterior.
- En el siguiente segundo round se utilizó el mismo juego de oligonucleótidos que en el caso anterior a una concentración de 3µL, una temperatura de annealing de 54°C y una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 1,5µL. Las demás variables permanecieron constantes como también el ciclo de incubación.
- Prosiguiendo con la optimización se llevó a cabo un segundo round con las siguientes variables: 3µL de cada uno de los siguientes oligonucleótidos AN89 (forward) y SO222 (reverse), una temperatura de annealing de 54°C y una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 1,5µL. En este caso la variable que se puso a prueba fue la concentración de muestra utilizada. Se llevaron a cabo distintas mezclas a las que posteriormente se les adicionó a cada una las siguientes concentraciones de ADN: 2, 3, 4, 5 y 6µL. Las variables que no se mencionan permanecen sin cambios al igual que el ciclo de incubación.

### 3.1.8. Combinaciones de juegos de oligonucleótidos en ensayo de OneStep

Con el propósito de lograr los más óptimos resultados en cuanto a la utilización de la técnica OneStep se realizó un ensayo en el cual se usaron distintos juegos de oligonucleótidos. Las diferentes combinaciones fueron las siguientes: SO224 (forward) y SO222 (reverse), AN89 (forward) y SO222 (reverse), SO224 (forward) y AN88 (reverse). Este ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera: 29  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas, 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido en sus respectivas combinaciones, todos en una concentración final de 0,6  $\mu\text{M}$ . También se utilizó 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs 400  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 10  $\mu\text{L}$  de QIAGEN OneStep RT-PCR buffer 5x con una concentración final de 2,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 2  $\mu\text{L}$  de enzima QIAGEN OneStep RT-PCR y 5  $\mu\text{L}$  de ARN extraído. La transcripción reversa se llevó a cabo a partir del oligonucleótido REVERSE de cada combinación.

La preparación se incubó en primer lugar a 50°C durante 30 minutos. Luego se incubó a 95°C durante 15 minutos. A continuación se sometió a 42 ciclos de 94°C – 1 minuto, 50°C - 1 minuto, 72°C -1 minuto y por último a 72°C durante 10 minutos en el termociclador (Techne TC-3000). Luego se mantuvo la preparación a 4°C hasta realizar sobre la misma el segundo round de PCR.

### 3.1.9. 2º round a partir de OneStep con combinaciones de oligonucleótidos

A partir del ADN obtenido por el ensayo de One Step realizado previamente se realizó un segundo round. La mezcla realizada estaba compuesta por: 30,5 $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas, 3 $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido: AN89 (forward) y AN88 (reverse), 5 $\mu\text{L}$  de buffer PCR 10x (Invitrogen), 0,5 $\mu\text{L}$  de enzima *Taq polimerasa*, 2 $\mu\text{L}$  dNTPs, 3 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  y 3 $\mu\text{L}$  de ADN. El programa realizado constaba de los siguientes pasos: una desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, y luego 40 ciclos programados de la siguiente manera: 94°C-1 minuto, 50°C-1 minuto, 72°C-1 minuto. Para finalizar la mezcla fue sometida a 72°C durante 10 minutos y luego a 23°C por 3 minutos.

## 3.2. Procesamiento de muestras clínicas

### 3.2.1 Muestras Clínicas

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron muestras de LCR pertenecientes a pacientes del Hospital Pereira Rossell con Meningitis y/o Encefalitis que resultaron positivas para enterovirus a través de la detección de la región 5'UTR. Estas muestras pertenecían a pacientes que estaban comprendidos en un rango etario que va desde 10 días a 15 años, estaban representados ambos sexos y presentaban una serie de síntomas clínicos tales como fiebre sin foco, cefalea, rigidez de nuca, petequias, convulsiones con fiebre, trastorno de la conciencia, vómitos. Otros ya estaban diagnosticados con meningitis aséptica o síndrome meníngeo.

### 3.2.2 Extracción de ARN a partir de LCR

El ARN de los enterovirus se extrajo a partir de las muestras de LCR, conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , utilizando un kit de extracción de ARN viral de Qiagen (Qlamp Viral ARN Mini Kit 50), de acuerdo con las especificaciones brindadas por el fabricante.

### 3.2.3 Procedimiento para la amplificación de EV en LCR

Se procesaron en total 33 muestras de líquido LCR de pacientes pediátrico pertenecientes al Centro Hospitalario Pereira Rossell. Estas muestras fueron procesadas utilizando el ensayo de OneStep, usando la combinación de oligonucleótidos AN89 (forward) y SO222 (reverse). El protocolo llevado a cabo fue el siguiente: 29  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas, 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido en una concentración final de 0,6  $\mu\text{M}$ . También se utilizó 2  $\mu\text{L}$  de dNTP's 400  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 10  $\mu\text{L}$  de QIAGEN OneStep RT-PCR buffer 5x con una concentración final de 2,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 2  $\mu\text{L}$  de enzima QIAGEN OneStep RT-PCR y 5  $\mu\text{L}$  de ARN extraído. La transcripción reversa se llevó a cabo a partir del oligonucleótido SO222 REVERSE.

La preparación se incubó en primer lugar a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Luego se incubó a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. A continuación se sometió a 42 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  - 1 minuto,  $50^{\circ}\text{C}$  - 1 minuto,  $72^{\circ}\text{C}$  -1 minuto y por último a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos en el termociclador (Techne TC-3000).

Cada ensayo se acompañó de un control negativo (se utilizó agua como molde) y un control positivo que se procesaron de igual manera que las muestras. El control positivo fue el mismo que se utilizó para la puesta a punto de la técnica. Este se obtuvo a partir de sobrenadante de cultivo celular de Cocksackie B4 obtenido a partir de la infección experimental y posterior recolección de sobrenadante de células Rd(A).

### 3.3. Electroforesis en gel de agarosa

Con el fin de observar el producto obtenido en las sucesivas PCR realizadas tanto en la optimización como también en el procesamiento de muestras clínicas se realizaron varias corridas electroforéticas en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X. El gel fue teñido con una solución comercial (GoldView™ Nucleic Acid Stain) y se observó utilizando un transiluminador con luz ultravioleta (UV) (Bio-Rad) quedando los resultados observados documentados mediante el programa correspondiente (Quantity One 4.6.3).

#### 3.3.1. Procedimiento

Se preparó una solución de 3g de agarosa en 150ml de buffer TAE 1X y se calentó durante 5 minutos hasta que se tornó transparente, luego se dejó enfriar unos minutos, se agregaron 10µL de la solución comercial GoldView y se vertió la misma dentro de las cubetas niveladas de forma correcta. Se dejó gelificar por aproximadamente 1 hora para poder retirar los peines. Luego se sembró en cada pocillo 10µL del producto de PCR provenientes de una mezcla realizada anteriormente la cual contenía, además de dicho producto, 2µL de buffer de carga 5X (Bioline), además en un pocillo se sembró como referente de corrida un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). La corrida fue realizada por 45 minutos a 1 hora (hasta que el frente de corrida alcance las  $\frac{3}{4}$  partes del gel) a 100 voltios (V). El gel se observó en un transiluminador con luz ultravioleta (UV) (Bio-Rad) quedando la imagen del gel documentada y analizada mediante el empleo del programa Quantity One 4.6.3.

### 3.4. Controles

Para evitar los resultados falsos positivos causados por la contaminación se establecieron dos áreas de trabajo:

- 1) Área de pre-amplificación donde se realizó la extracción de ARN y la preparación de las mezclas de reacción de PCR.
- 2) Área de post-amplificación equipada con dos termocicladores (Techne TC-3000, Corbett Research), cuba de electroforesis, fuentes de poder, transiluminador con equipo de fotografía, microcentrífuga, etc; donde se realizaron las reacciones de PCR, las electroforesis en geles de agarosa y la purificación de los productos amplificados para secuenciación.

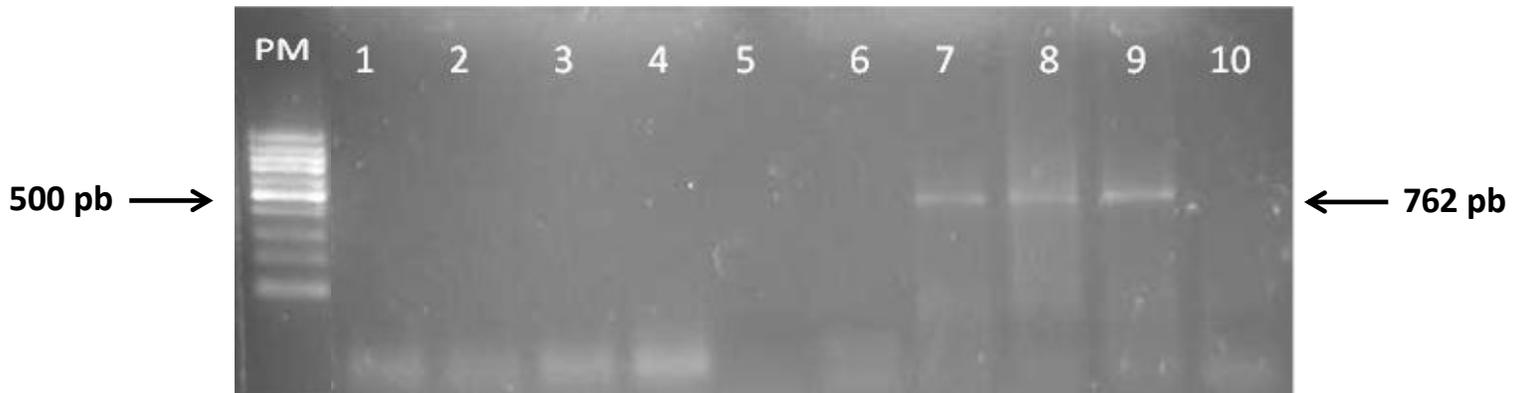
Cada área de trabajo descrita anteriormente está delimitada y separada físicamente. La indumentaria, el equipamiento, los reactivos y los materiales de trabajo son estrictamente pertenecientes a cada área.

# 4. RESULTADOS

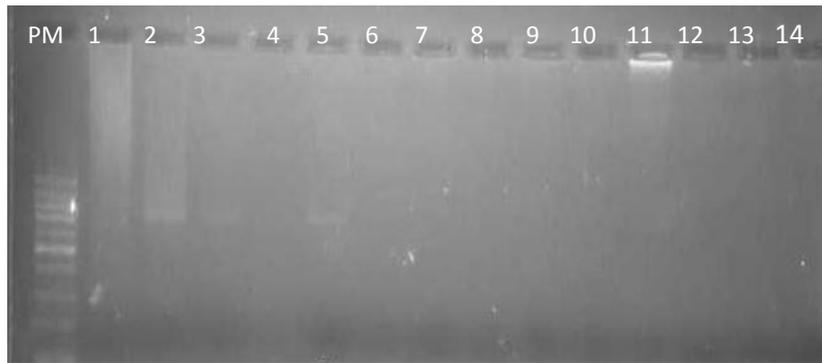
---

## 4.1. Optimización y puesta a punto

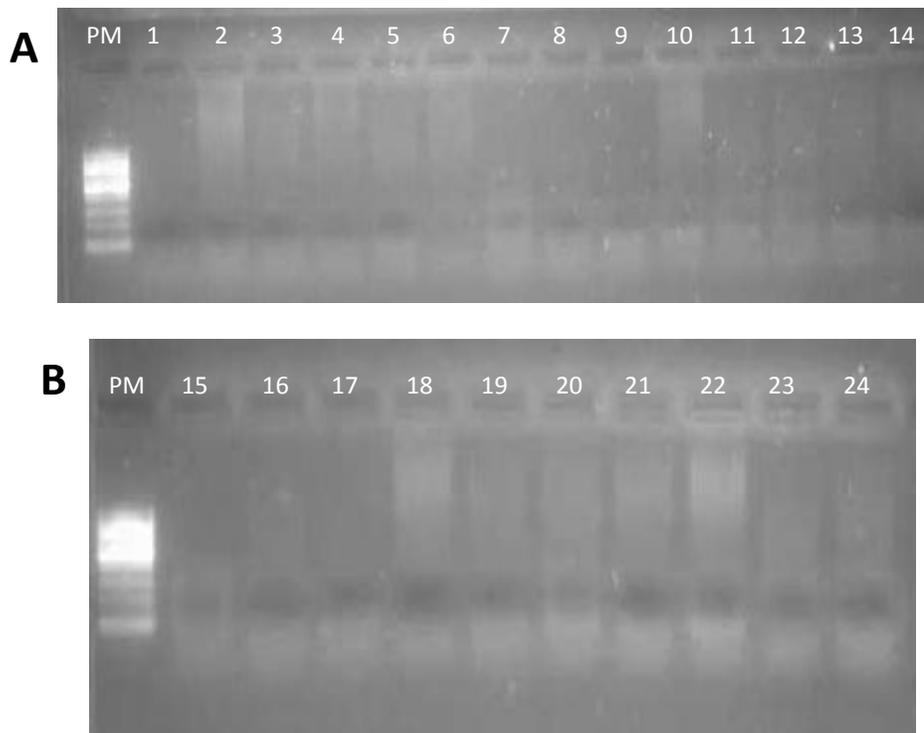
Con respecto a la PCR semi-anidada que se planteó al principio de este trabajo, se obtuvieron bandas utilizando la combinación de oligonucleótidos SO222 y SO224, mientras que con el juego de oligonucleótidos 1S y 1A no se obtuvieron resultados positivos (Fig. 4). A partir de estos resultados se realizaron sucesivas PCR con los oligonucleótidos SO222 y SO224 (Fig. 5) y segundos rounds de PCR con los oligonucleótidos AN88 y AN89, en los cuales se probaron diferentes temperaturas de annealing (Fig. 6). Con ésta metodología no se obtuvieron resultados positivos tanto en el primer round como en el segundo.



**Figura 4.** Primer round de PCR semi-anidada con control positivo en donde se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos distintos. 1: 1S, 1A. 2: SO222, SO224. Carril 1: Dilución 1 en 1 con juego de oligonucleótidos 1. Carril 2: dilución  $10^{-2}$  con juego de oligonucleótidos 1. Carril 3: Dilución  $10^{-3}$  con juego de oligonucleótidos 1. Carril 4: Dilución  $10^{-4}$  con juego de oligonucleótidos 1. Carril 5: Control negativo con juego de oligonucleótidos 1. Carril 6: Dilución 1 en 1 con juego de oligonucleótidos 2. Carril 7: Dilución  $10^{-2}$  con juego de oligonucleótidos 2. Carril 8: Dilución  $10^{-3}$  con juego de oligonucleótidos 2. Carril 9: Dilución  $10^{-4}$  con juego de oligonucleótidos 2. Carril 10: Control negativo con juego de oligonucleótidos 2.

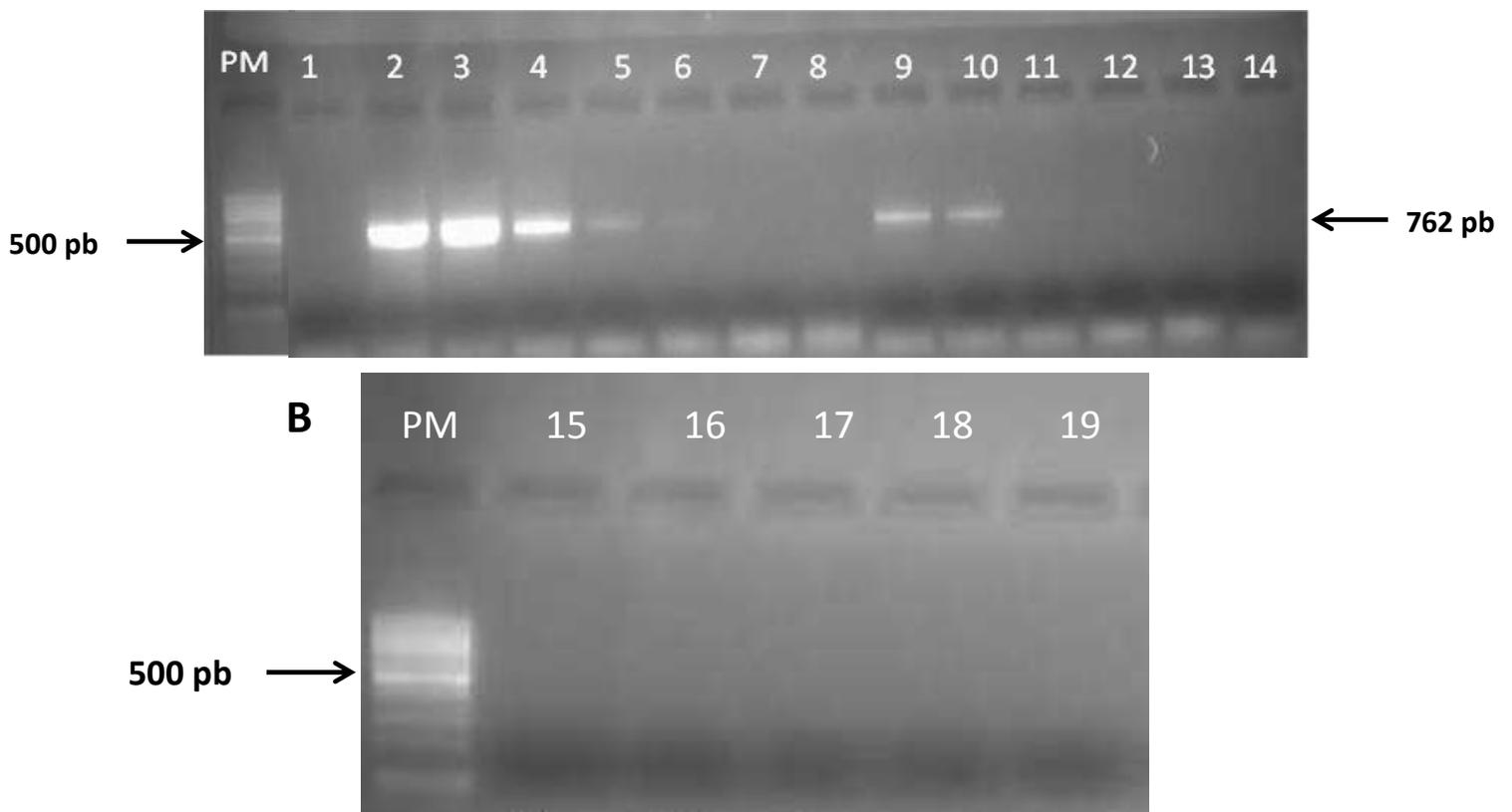


**Figura 5.** Primer round de PCR semi-anidada, utilizando oligonucleótidos SO222 y SO224. Carril 1: Dilución 1 en 1 control positivo. Carril 2: Dilución  $10^{-2}$  control positivo. Carril 3: Dilución  $10^{-3}$  control positivo. Carril 4: Dilución  $10^{-4}$  control positivo. Carril 5: Dilución  $10^{-5}$  control positivo. Carril 6: Dilución  $10^{-6}$  control positivo. Carril 7: Muestra clínica n° 244. Carril 8: Muestra clínica n° 293. Carril 9: Muestra clínica n° 258. Carril 10: Muestra clínica n° 272. Carril 11: Muestra clínica n° 249. Carril 12: Muestra clínica n° 289. Carril 13: Muestra clínica n° 296. Carril 14: Muestra clínica n° 252.



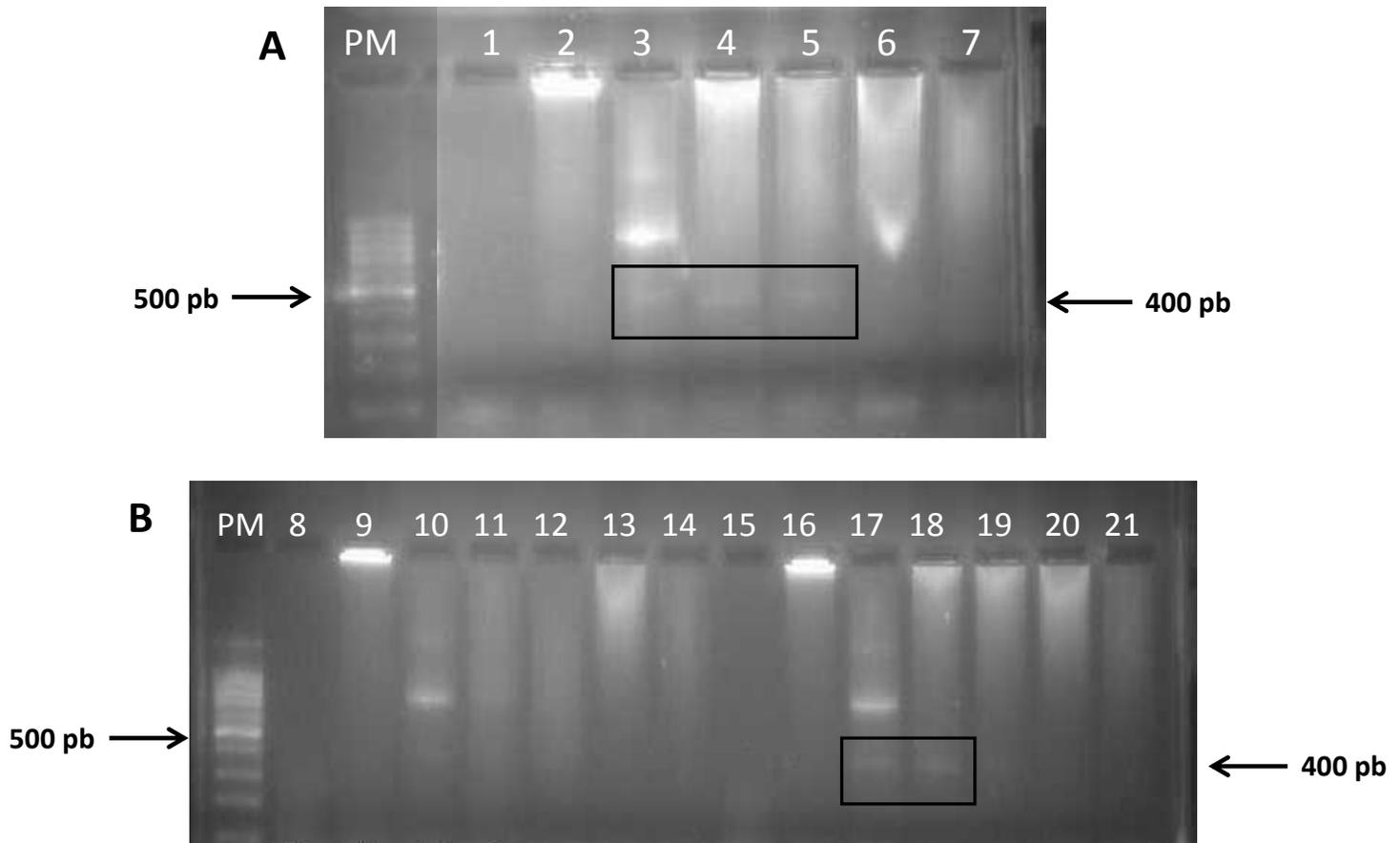
**Figura 6.** 2º round de PCR semi-anidada, utilizando los oligonucleótidos AN88 y AN89. En este ensayo se probaron, además, distintas temperaturas de annealing (50°C, 55°C y 60°C). **A:** Carril 1: Control negativo (50°C). Carril 2: Dilución  $10^{-3}$  control positivo (50°C). Carril 3: Dilución  $10^{-4}$  control positivo (50°C). Carril 4: Dilución  $10^{-5}$  control positivo (50°C). Carril 5: Dilución  $10^{-6}$  control positivo (50°C). Carril 6: Muestra clínica n° 249 (50°C). Carril 7: Muestra clínica n° 258 (50°C). Carril 8: Muestra clínica n° 296 (50°C). Carril 9: Control negativo (55°C). Carril 10: Dilución  $10^{-3}$  control positivo (55°C). Carril 11: Dilución  $10^{-4}$  control positivo (55°C). Carril 12: Dilución  $10^{-5}$  control positivo (55°C). Carril 13: Dilución  $10^{-6}$  control positivo (55°C). Carril 14: Muestra clínica n° 249. **B:** Carril 15: Muestra clínica n° 258 (55°C). Carril 16: Muestra clínica n° 296 (55°C). Carril 17: Control negativo (60°C). Carril 18: Dilución  $10^{-3}$  control positivo (60°C). Carril 19: Dilución  $10^{-4}$  control positivo (60°C). Carril 20: Dilución  $10^{-5}$  control positivo (60°C). Carril 21: Dilución  $10^{-6}$  control positivo (60°C). Carril 22: Muestra clínica n° 249 (60°C). Carril 23: Muestra clínica n° 258 (60°C). Carril 24: Muestra clínica n° 296 (60°C).

Continuando con la puesta a punto, se optó por una técnica de OneStep la cual se lleva a cabo en un solo paso la transcripción reversa y el ensayo de PCR. En este caso se utilizaron los oligonucleótidos SO222 y SO224. Se ensayaron tres temperaturas de annealing diferentes (50°C, 55°C y 60°C) en diluciones seriadas del control positivo. Se obtuvieron resultados positivos para las temperaturas 50°C y 55°C. Se pueden observar bandas hasta la dilución  $10^{-5}$  en los ensayos que fueron sometidos a una temperatura de annealing de 50°C, mientras que para las mezclas que se vieron expuestas a una temperatura de annealing de 55°C, se observan bandas sólo hasta la dilución  $10^{-4}$ . No se observan bandas para la temperatura de annealing de 60°C (Fig. 7).



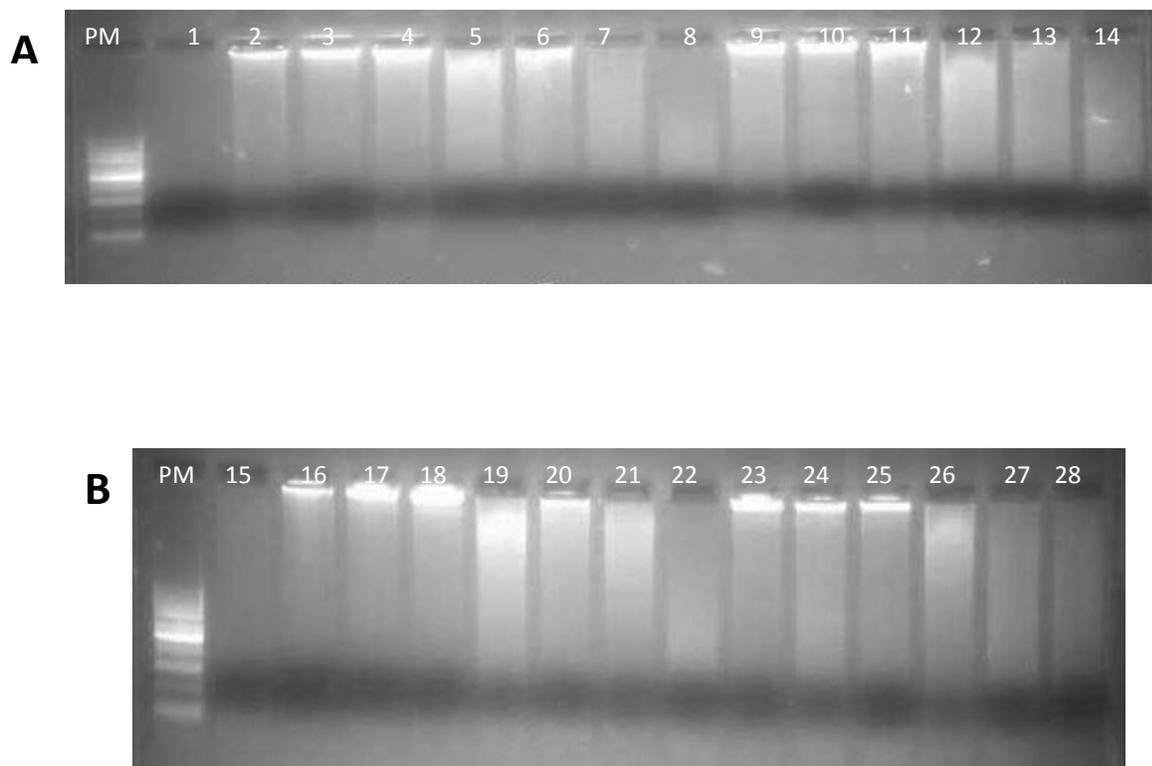
**Figura 7.** Técnica de OneStep en donde se utilizaron los oligonucleótidos SO222 y SO224, y se ensayaron tres temperaturas de annealing diferentes (50°C, 55°C y 60°C). **A:** Carril 1: Control negativo (50°C). Carril 2: Dilución 1 en 1 control positivo (50°C). Carril 3: Dilución  $10^{-2}$  control positivo (50°C). Carril 4: Dilución  $10^{-3}$  control positivo (50°C). Carril 5: Dilución  $10^{-4}$  control positivo (50°C). Carril 6: Dilución  $10^{-5}$  control positivo (50°C). Carril 7: Dilución  $10^{-6}$  control positivo (50°C). Carril 8: Control negativo (55°C). Carril 9: Dilución  $10^{-2}$  control positivo (55°C). Carril 10: Dilución  $10^{-3}$  control positivo (55°C). Carril 11: Dilución  $10^{-4}$  control positivo (55°C). Carril 12: Dilución  $10^{-5}$  control positivo (55°C). Carril 13: Dilución  $10^{-6}$  control positivo (55°C). Carril 14: Control negativo (60°C). **B:** Carril 15: Dilución  $10^{-2}$  control positivo (60°C). Carril 16: Dilución  $10^{-3}$  control positivo (60°C). Carril 17: Dilución  $10^{-4}$  control positivo (60°C). Carril 18: Dilución  $10^{-5}$  control positivo (60°C). Carril 19: Dilución  $10^{-6}$  control positivo (60°C).

A partir del ADN obtenido del primer round de PCR, realizado con la técnica de OneStep, se ensayaron varios rounds con distintas temperaturas de annealing (Fig. 8). Para la temperatura de 50°C se observan bandas hasta la dilución  $10^{-4}$ , mientras que para la temperatura de 55°C no se observan bandas con el tamaño esperado de aproximadamente 400 pb, y para 60°C sólo se observan hasta las diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . En todos los casos las bandas no se diferencian con claridad.

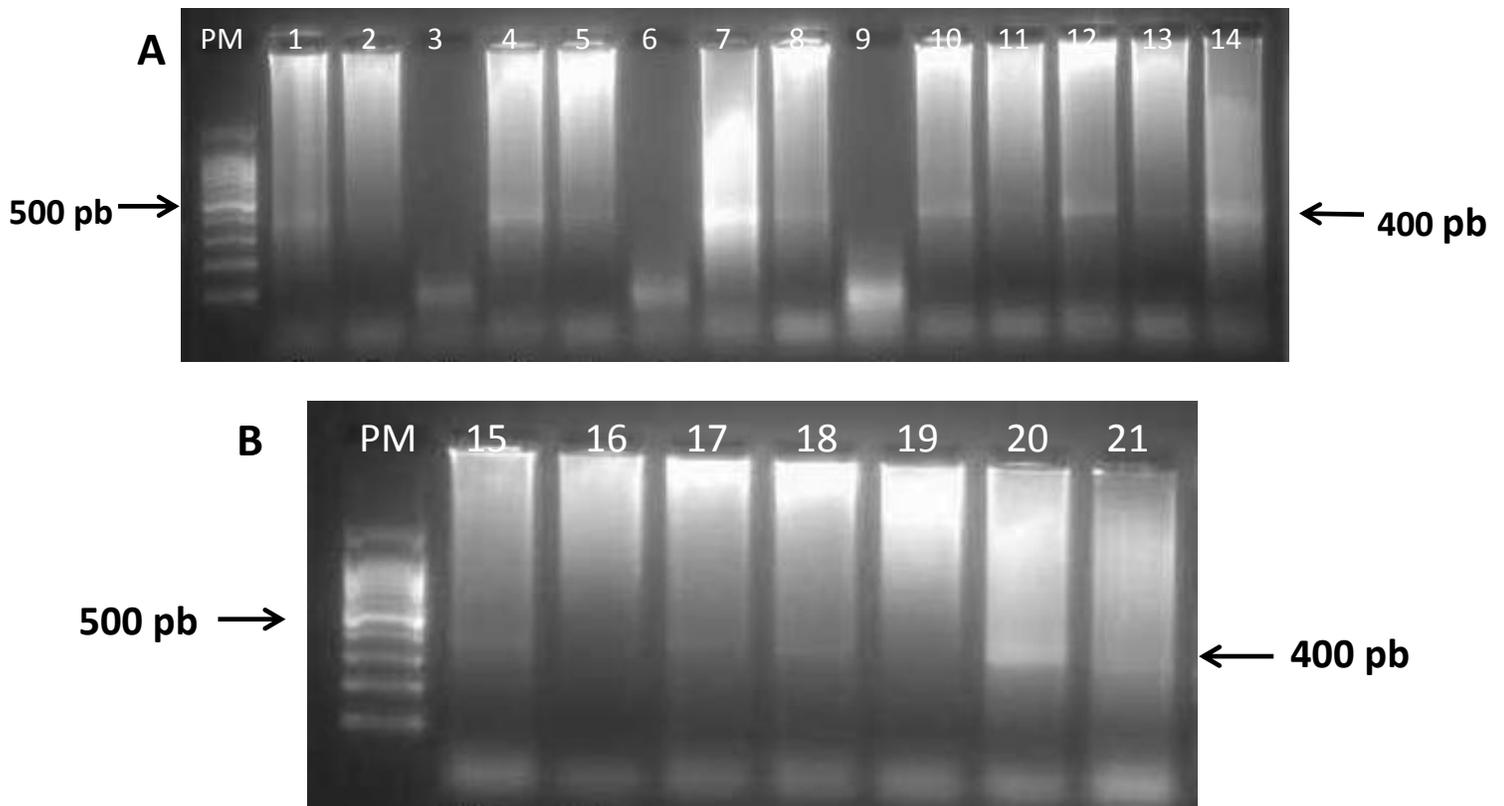


**Figura 8.** 2º round de PCR a partir del ADN obtenido por la técnica de OneStep utilizando los oligonucleótidos AN88 y AN89, a distintas temperaturas de annealing (50°C, 55°C y 60°C). **A:** Carril 1: Control negativo (50°C). Carril 2: Dilución 1 en 1 control positivo (50°C). Carril 3: Dilución  $10^{-2}$  control positivo (50°C). Carril 4: Dilución  $10^{-3}$  control positivo (50°C). Carril 5: Dilución  $10^{-4}$  control positivo (50°C). Carril 6: Dilución  $10^{-5}$  control positivo (50°C). Carril 7: Dilución  $10^{-6}$  control positivo (50°C). **B:** Carril 8: Control negativo (55°C). Carril 9: Dilución 1 en 1 control positivo (55°C). Carril 10: Dilución  $10^{-2}$  control positivo (55°C). Carril 11: Dilución  $10^{-3}$  control positivo (55°C). Carril 12: Dilución  $10^{-4}$  control positivo (55°C). Carril 13: Dilución  $10^{-5}$  control positivo (55°C). Carril 14: Dilución  $10^{-6}$  control positivo (55°C). Carril 15: Control negativo (60°C). Carril 16: Dilución 1 en 1 control positivo (60°C). Carril 17: Dilución  $10^{-2}$  control positivo (60°C). Carril 18: Dilución  $10^{-3}$  control positivo (60°C). Carril 19: Dilución  $10^{-4}$  control positivo (60°C). Carril 20: Dilución  $10^{-5}$  control positivo (60°C). Carril 21: Dilución  $10^{-6}$  control positivo (60°C).

Siguiendo con la optimización del 2º round de PCR, además del juego de oligonucleótidos AN88 y AN89 ya utilizado en PCR anteriores, se ensayó un nuevo juego de oligonucleótidos AN232 y AN233. Ambos juegos se probaron a dos temperaturas de annealing, 50°C y 60°C (Fig. 9). No se observan resultados positivos para ninguno de ellos. Se realizaron varias PCR con estos dos juegos, no obteniéndose en ninguno de los casos resultados positivos. Es por esto, que en los siguientes PCR ensayados se utilizaron los mismos oligonucleótidos usados hasta ahora pero en distintas combinaciones. Las combinaciones usadas fueron: AN232 y SO222, AN89 y SO222, presentado resultados positivos solo la última combinación mencionada. Para esta combinación de oligonucleótidos se realizó un ensayo a tres temperaturas de annealing distintas (50°C, 53°C y 58°C) y se agregaron a la mezcla tres concentraciones diferentes de muestra (2µL, 3µL y 4µL). Se obtuvieron bandas difusas para los tres casos, visualizándose mejor en los casos en que se utilizaron temperaturas de annealing de 50°C y 53°C. Las bandas se pueden ver en las dos diluciones realizadas del control positivo,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  (Fig. 10).



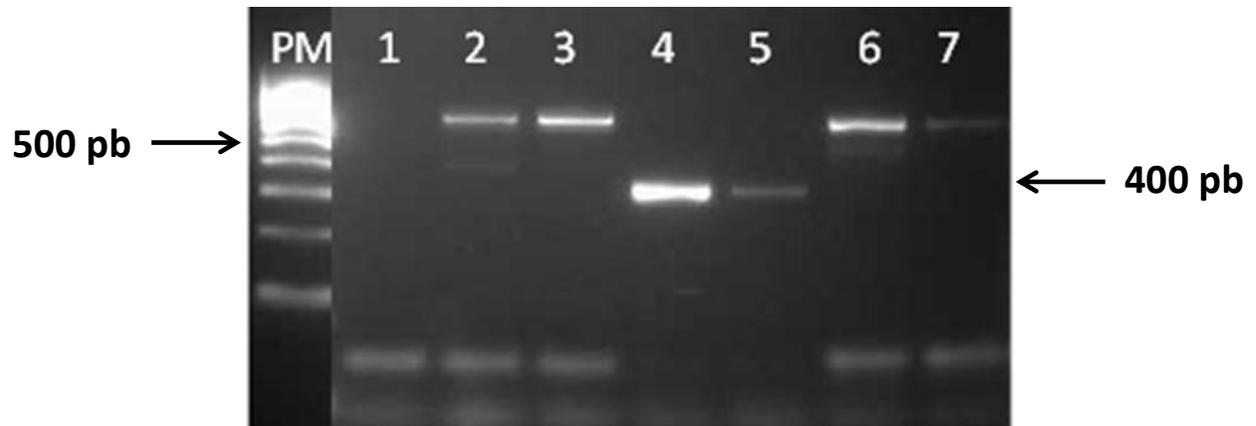
**Figura 9.** 2º round de PCR utilizando los primer 1: AN88 AN89, 2: S232 S233. Se utilizaron temperaturas de annealing de 50°C y 60°C. **A:** Carril 1: Control negativo [AN88, AN89] (50°C). Carril 2: Dilución 1 en 1 control positivo [AN88, AN89] (50°C). Carril 3: Dilución 10<sup>-2</sup> control positivo [AN88, AN89] (50°C). Carril 4: Dilución 10<sup>-3</sup> control positivo [AN88, AN89] (50°C). Carril 5: Dilución 10<sup>-4</sup> control positivo [AN88, AN89] (50°C). Carril 6: Dilución 10<sup>-5</sup> control positivo [AN88, AN89] (50°C). Carril 7: Dilución 10<sup>-6</sup> control positivo [AN88, AN89] (50°C). Carril 8: Control negativo [S232, S233] (50°C). Carril 9: Dilución 1 en 1 control positivo [S232, S233] (50°C). Carril 10: Dilución 10<sup>-2</sup> control positivo [S232, S233] (50°C). Carril 11: Dilución 10<sup>-3</sup> control positivo [S232, S233] (50°C). Carril 12: Dilución 10<sup>-4</sup> control positivo [S232, S233] (50°C). Carril 13: Dilución 10<sup>-5</sup> control positivo [S232, S233] (50°C). Carril 14: Dilución 10<sup>-6</sup> control positivo [S232, S233] (50°C). **B:** Carril 15: Control negativo [AN88, AN89] (60°C). Carril 16: Dilución 1 en 1 control positivo [AN88, AN89] (60°C). Carril 17: Dilución 10<sup>-2</sup> control positivo [AN88, AN89] (60°C). Carril 18: Dilución 10<sup>-3</sup> control positivo [AN88, AN89] (60°C). Carril 19: Dilución 10<sup>-4</sup> control positivo [AN88, AN89] (60°C). Carril 20: Dilución 10<sup>-5</sup> control positivo [AN88, AN89] (60°C). Carril 21: Dilución 10<sup>-6</sup> control positivo [AN88, AN89] (60°C). Carril 22: Control negativo [S232, S233] (60°C). Carril 23: Dilución 1 en 1 control positivo [S232, S233] (60°C). Carril 24: Dilución 10<sup>-2</sup> control positivo [S232, S233] (60°C). Carril 25: Dilución 10<sup>-3</sup> control positivo [S232, S233] (60°C). Carril 26: Dilución 10<sup>-4</sup> control positivo [S232, S233] (60°C). Carril 27: Dilución 10<sup>-5</sup> control positivo [S232, S233] (60°C). Carril 28: Dilución 10<sup>-6</sup> control positivo [S232, S233] (60°C).



**Figura 10.** 2º round de PCR usando los oligonucleótidos AN89 y SO222, utilizando tres temperaturas de annealing (50°C, 53°C y 58°C) y diferentes concentración de muestra (2µl, 3µl y 4µl). **A:** Carril 1: Dilución  $10^{-3}$  control positivo [2µl] (50°C). Carril 2: Dilución  $10^{-4}$  control positivo [2µl] (50°C). Carril 3: Control negativo [2µl]. Carril 4: Dilución  $10^{-3}$  control positivo [3µl] (50°C). Carril 5: Dilución  $10^{-4}$  control positivo [3µl] (50°C). Carril 6: Control negativo [3µl]. Carril 7: Dilución  $10^{-3}$  control positivo [4µl] (50°C). Carril 8: Dilución  $10^{-4}$  control positivo [4µl] (50°C). Carril 9: Control negativo [4µl]. Carril 10: Dilución  $10^{-3}$  control positivo [2µl] (53°C). Carril 11: Dilución  $10^{-4}$  control positivo [2µl] (53°C). Carril 12: Dilución  $10^{-3}$  control positivo [3µl] (53°C). Carril 13: Dilución  $10^{-4}$  control positivo [3µl] (53°C). Carril 14: Dilución  $10^{-3}$  control positivo [4µl] (53°C). **B:** Carril 15: Dilución  $10^{-4}$  control positivo [4µl] (53°C). Carril 16: Dilución  $10^{-4}$  control positivo [2µl] (58°C). Carril 17: Dilución  $10^{-3}$  control positivo [2µl] (58°C). Carril 18: Dilución  $10^{-3}$  control positivo [3µl] (58°C). Carril 19: Dilución  $10^{-4}$  control positivo [3µl] (58°C). Carril 20: Dilución  $10^{-3}$  control positivo [4µl] (58°C). Carril 21: Dilución  $10^{-4}$  control positivo [4µl] (58°C).

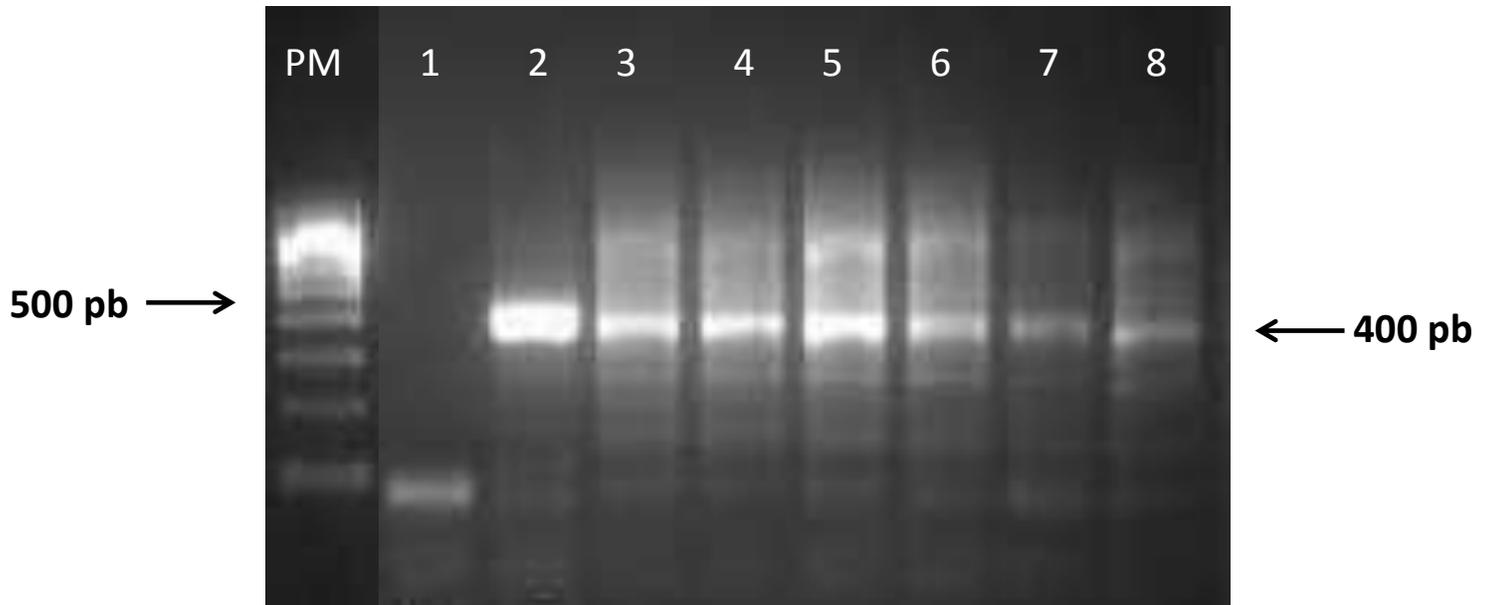
Sin embargo, a pesar de haber obtenido resultados con el juego de oligonucleótidos AN89 y SO222, se realizaron dos ensayos más utilizando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos: SO222 y SO224, SO224 y AN89. Se obtuvieron bandas bien diferenciadas para las tres combinaciones. Para la combinación SO222 y SO224 se observan bandas para las dos diluciones del control positivo,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ . Mientras que para las demás se observa con más claridad la banda de la dilución  $10^{-3}$ , la dilución  $10^{-4}$  presenta una banda más difusa. Con

respecto a las bandas obtenidas con las nuevas combinaciones, éstas parecen ser de mayor tamaño que la banda buscada en comparación con el marcador de peso molecular. Sin embargo la banda obtenida para la combinación usada en ensayos previos, SO222 y AN 89, posee un tamaño más acorde, aproximadamente 400pb (Fig. 11).

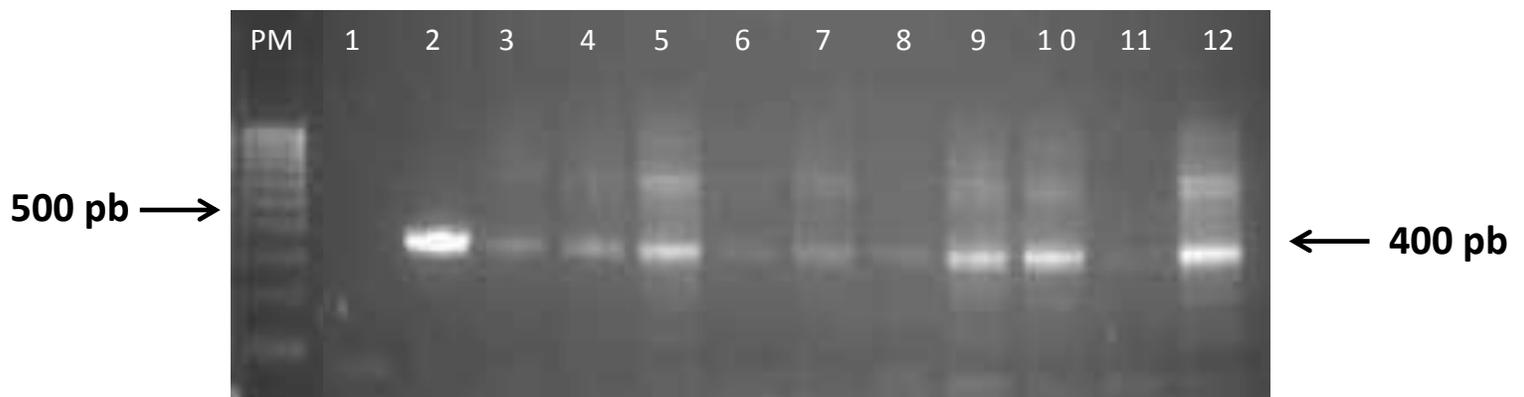


**Figura 11.** OneStep con tres combinaciones de oligonucleótidos. Carril 1: Control negativo. Carril 2: Dilución  $10^{-3}$  control positivo [SO222, SO224]. Carril 3: Dilución  $10^{-4}$  control positivo [SO222, SO224]. Carril 4: Dilución  $10^{-3}$  control positivo [SO222, AN89]. Carril 5: Dilución  $10^{-4}$  control positivo [SO222, AN89]. Carril 6: Dilución  $10^{-3}$  control positivo [SO224, AN88]. Carril 7: Dilución  $10^{-4}$  control positivo [SO224, AN88].

Una vez que se establecieron las variables adecuadas para la óptima amplificación de enterovirus (descritas en el punto 3.2.3 de materiales y métodos), se procedió al procesamiento de muestras clínicas. Se obtuvo la amplificación de la banda esperada en la mayoría de los casos positivos ensayados (Fig. 12 y Fig. 13).



**Figura 12.** OneStep con muestras clínicas. Carril 1: Control negativo. Carril 2: Control positivo. Carril 3: Muestra clínica n° 9. Carril 4: Muestra clínica n° 11. Carril 5: Muestra clínica n° 14. Carril 6: Muestra clínica n° 19. Carril 7: Muestra clínica n° 31. Carril 8: Muestra clínica n° 34.

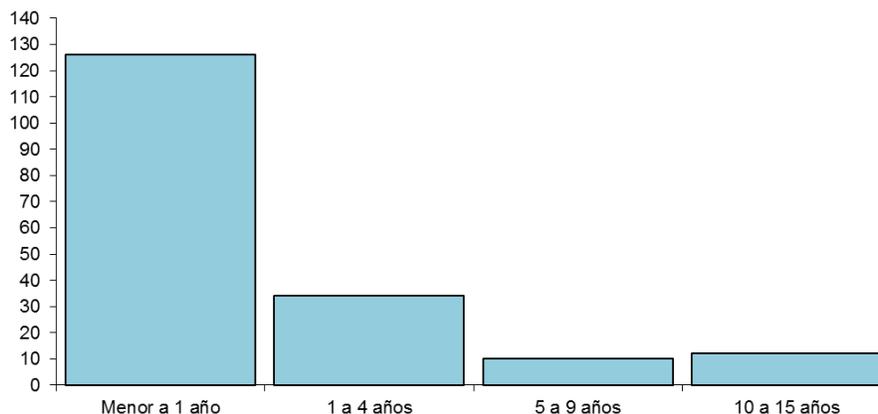


**Figura 13.** OneStep con muestra clínicas. Carril 1: Control negativo. Carril 2: Dilución  $10^3$  control positivo. Carril 3: Muestra clínica n° 9. Carril 4: Muestra clínica n° 11. Carril 5: Muestra clínica n° 14. Carril 6: Muestra clínica n° 15. Carril 7: Muestra clínica n° 19. Carril 8: Muestra clínica n° 31. Carril 9: Muestra clínica n° 34. Carril 10: Muestra clínica n° 220. Carril 11: Muestra clínica n° 233. Carril 12: Muestra clínica n° 244.

## 4.2 Epidemiología

A partir de datos obtenidos de los pacientes cuyas muestras de LCR fueron utilizadas para llevar a cabo este estudio, se realizaron distintos abordajes comparativos con el fin de estudiar el comportamiento epidemiológico de los EV durante el año 2011.

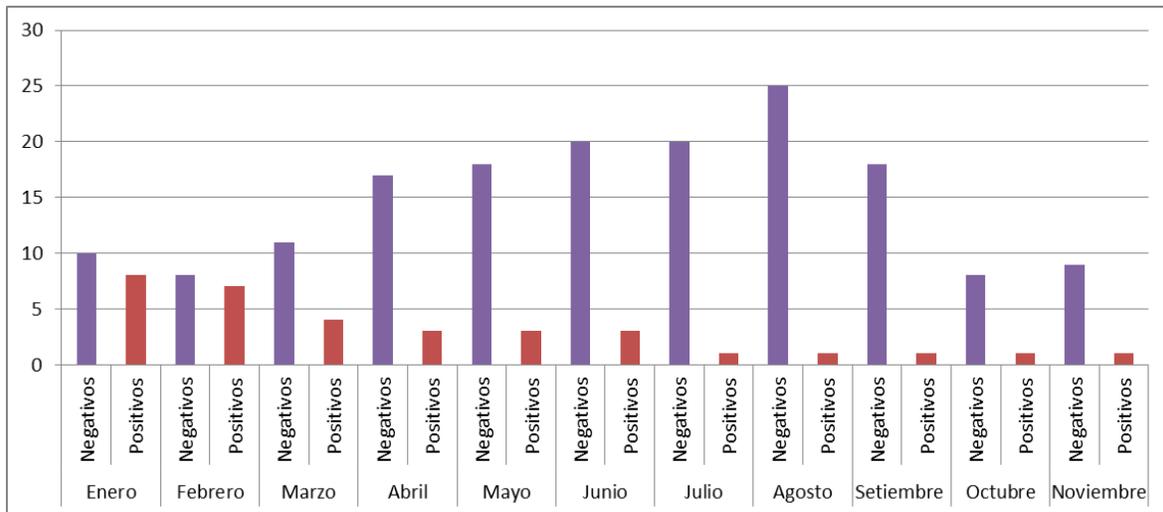
Durante el año 2011 se analizaron 209 muestras de LCR por la técnica de PCR que amplifica la región 5'UTR, dando como resultado 33 de ellas positivas para EV. Con respecto a las muestras positivas, el 46% eran de sexo masculino y el 42% de sexo femenino. No se tienen datos para el 12% restante. Del total de las muestras analizadas el rango etario que predominó fue el de menor a 1 año (67,4 %) seguido por el rango que abarca pacientes de 1 a 4 años de edad (18,2 %). El 5,3 % de los pacientes tenía entre 5 y 9 años, el 6,4 % entre 10 y 15 años y para el 2,7 % restante no se tienen datos (Fig. 14). Con respecto a las muestras que resultaron positivas para EV se pudo observar una importante tasa de infección en pacientes menores de 1 año (63,6 %), seguido de los pacientes que se encontraban en el rango de etario de 1 a 4 años (21,2 %). Los pacientes comprendidos entre los 5-9 años y los que se situaron dentro del rango de 10 a 15 años, supusieron el 3% y el 12,2 % respectivamente. Entre los pacientes afectados los síndromes clínicos más relevantes fueron fiebre sin foco y convulsión con fiebre seguidos de meningitis aséptica y encefalitis en menor medida.



**Figura 14.** Distribución de los rangos etarios de los pacientes cuyas muestras de LCR fueron procesadas para determinar la presencia de EV durante el año 2011 a través de la amplificación por PCR de la región 5'UTR. En el gráfico se observa el número de pacientes total analizados en función de la edad de los mismos

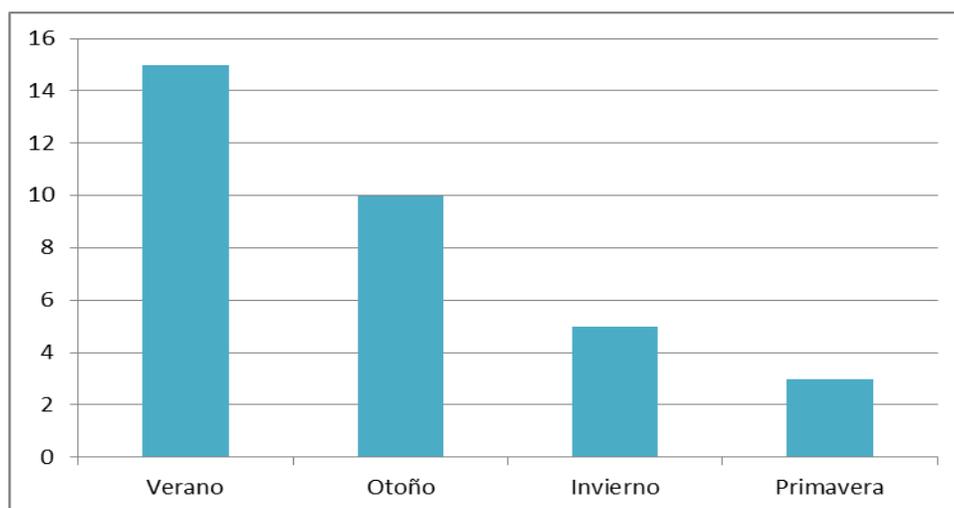
Se analizó el número de aislamientos positivos en correlación al tiempo del año en que fueron procesadas las muestras, dicho estudio se realizó de forma mensual durante el año 2011,

observando una mayor tasa de los mismos en los meses de enero y febrero y decayendo en los meses siguientes (Fig. 15). De esta forma se pudo investigar la frecuencia temporal de los EV detectados en este trabajo.



**Figura 15.** Número de muestras positivas y negativas para EV durante el año 2011. Período comprendido entre los meses de enero y noviembre. En el gráfico se puede observar el número total de muestras analizadas en función de los distintos meses del año en los cuales fueron procesadas.

Así mismo, se analizó la estacionalidad de EV en el Uruguay. Se pudo observar que en nuestro país los EV presentan una estacionalidad creciente durante el verano y el otoño (Fig. 16).



**Figura 16.** Distribución de muestras positivas para EV según las estaciones del año.

# 5. DISCUSSION

---

Se logro la optimización de una técnica basada en biología molecular para la amplificación mediante PCR de una región parcial del gen VP1 del genoma de EV, que permite en poco tiempo detectar todos los subtipos partiendo de LCR como muestra clínica.

Dicha optimización fue realizada mediante el uso de la enzima QIAGEN OneStep RT-PCR y luego de variar diversas condiciones experimentales como se detalló anteriormente, obteniendo finalmente el protocolo descrito en el punto 3.2.3 de la sección materiales y métodos. El mismo permitirá una rápida detección de EV a partir de LCR y su posterior genotipificación por secuenciación.

Se estudiaron muestras positivas para enterovirus. Éste diagnóstico se hizo previamente mediante la amplificación por PCR de la región 5'UTR. De las 33 muestra estudiadas, se obtuvieron bandas del tamaño esperado (aproximadamente 400 pb) en 15 de ellas. La causa por la cual no se pudo obtener una amplificación en el total de las muestras estudiadas podría deberse a la baja carga viral presente en el LCR consecuencia de la barrera hematoencefálica, como también por las posibles condiciones de preservación de las muestras y los sucesivos descongelamientos a los cuales estuvieron expuestas durante el procesamiento. Una alternativa para resolver el problema de la baja carga viral podría ser cultivar las mismas previamente a su procesamiento. Para ello, los cultivos celulares más sensibles a la infección de EV son las líneas WI-38 (pulmón embrionario humano), HEK (riñón embrionario humano) y RD (rabdomyosarcoma humano) (Lerma & Farga., 2000). Sin embargo, no hay ningún tipo celular que soporte el crecimiento de todos los EV. Por ésta razón se deben utilizar varias líneas celulares en el diagnóstico cuando se pretende cultivar los mismos (Chonmaitree *et al.*, 1988). Tal es el caso de RD y Hep-2, dos líneas celulares eficientes para la detección de la mayoría de los EV, pero éstas no tienen la capacidad de hacer crecer todos estos (Leland & Ginocchio., 2007; Johnston & Siegel., 1990; Siegel *et al.*, 1976). Más aún, el mantenimiento de las células y algunos de los materiales necesarios para llevar a cabo el cultivo celular son costosos y requieren de operarios capacitados, así como también de gran dedicación (Lee *et al.*, 2004; Chapron *et al.*, 2000). La detección de efecto citopático mediante el cultivo tradicional oscila entre 3,7 y 8,2 días cuando la carga viral es baja, como suele suceder en muestras de LCR (Klespies *et al.*, 1996; Pérez-Ruiz *et al.*, 2003).

Una de las ventajas principales que derivan de la optimización de ésta técnica es la futura posibilidad de poder genotipificar las muestras y así observar cual o cuales variantes son las que circulan actualmente en nuestro país. Diferentes genotipos pueden relacionarse con determinadas patologías: los casos de Enfermedad Boca-Mano-Pie están relacionados con los EV 71, éstos asocian a enfermedad severa (Jiang *et al.*, 2012), Coxsackie A es el agente etiológico de la herpangina, que causa un enantema vesicular en el paladar blando, afectando a niños de 3 a 10 años (Cherry & Jahn., 1965), las meningitis virales están mayormente causadas por Coxsackie B y Echoviruses (Berlin *et al.*, 1993), las encefalitis se relacionan con los Coxsackies tipo A9, B2 y B5 y Echovirus tipos 6 y 9 (Fowlkes *et al.*, 2008), el EV 71 es el virus no-polio causante de la mayoría de las parálisis aguda (Hayward *et al.*, 1989), el EV 70 y Coxsackie A24 han sido los causantes de brotes de conjuntivitis aguda hemorrágica (Sklar *et al.*, 1983), los neonatos son particularmente susceptibles a infección por enterovirus y algunos serotipos pueden causar la muerte (Coxsackies B2 a B5 y Echovirus 11) (Kinney *et al.*, 1986) y los Coxsackies del grupo B se han asociado

frecuentemente con miopericarditis (Freund *et al.*, 2010). La tipificación de los enterovirus circulantes será de gran interés para el estudio de estos virus en cuanto a la interacción huésped-virus, la unión a receptores de entrada a la célula, tropismo, diferencias antigénicas, etc. Hoy en día en el laboratorio se utiliza como método de detección de EV en LCR la amplificación de la región 5'UTR. Sin embargo, debido a que dicha técnica se basa en la amplificación de una región con secuencias muy conservadas entre los distintos serotipos, sólo nos indica si una muestra es positiva o negativa para EV pero no nos permite identificar de qué subtipo se trata. Mediante el empleo de este protocolo, optimizado durante este trabajo, se podrá identificar cada uno de los diferentes EV detectados a través de la secuenciación de los productos de PCR correspondientes a una región parcial del gen VP1. Dicho objetivo será abordado posteriormente durante una etapa de posgrado que involucre el análisis bioinformático y estudio de las diferentes variantes ya detectadas mediante el uso de esta técnica.

Es de importancia resaltar que las infecciones por EV tienen una elevada prevalencia, con una estimación superior al billón de infecciones cada año a nivel mundial (Oberste *et al.*, 2000). Sin embargo, suelen producir mayoritariamente infecciones asintomáticas o leves y su estudio diagnóstico suele producirse únicamente en las infecciones más graves, como es el caso de la meningitis o encefalitis, lo que dificulta conocer los datos reales de su incidencia (Romero & Rotbart, 2003). Por otro lado, la edad es uno de los factores más importantes en la infección enteroviral (Cisterna *et al.*, 2007). Éste es un cuadro principalmente infantil, como se puede deducir de los grupos de edad que representaban los pacientes infectados. La edad de éstos se concentraba en los primeros años de vida, con casi un 64 % de ellos menores de 1 año y aproximadamente el 20 % por debajo de los 5 años. Éste es un hecho comentado repetidamente por algunos autores que han observado esta mayor frecuencia de infección por enterovirus por debajo de los 5 años (Moore *et al.*, 1984; Druyts-Voets, 1997; Meqdam *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2005), llegando a comunicar cifras en torno al 40 % en menores de 1 año (CDC, 2002) y 91 % en menores de 14 años (Druyts-Voets, 1997). Cuando se producen brotes por EV en la población general, los neonatos se encuentran especialmente en riesgo. Los datos epidemiológicos por ello, pueden ser importantes para tratar de minimizar el riesgo de infecciones neonatales.

Según la Organización Mundial de la Salud, tres cuartas partes del total de las enfermedades causadas por EV se producen en niños menores de 15 años, probablemente por la ausencia de contacto anterior con los diferentes serotipos del virus. Las tasas de infección sintomática decrecen a partir del segundo mes de vida, aunque continúan siendo superiores en niños de corta edad que en niños mayores o adultos. Los niveles socioeconómicos más bajos también presentan aumentadas estas tasas, por el hacinamiento, la falta de higiene y la mayor facilidad de contaminación fecal (Modlin, 2005a).

En este estudio no se observó correlación significativa entre el sexo y la infección por EV, obteniéndose porcentajes muy similares entre varones y niñas. Esto puede estar dado por la edad de los pacientes infectados, siendo la mayoría menores a 1 año y en donde el comportamiento social y el manejo de los niños por parte de los padres es similar para niños y niñas.

Las enfermedades por este tipo de microorganismos son muy prevalentes y tienen una distribución mundial, variable según la estación climática, región, edad y situación socioeconómica. Las infecciones se dan a lo largo de todo el año, pero en zonas de climas templados, las mayores tasas se producen en la época más calurosa, fundamentalmente en los meses de verano y otoño (Morens & Pallansch., 1995). Este carácter estacional nunca se ha explicado satisfactoriamente, pero las altas temperaturas podrían favorecer la presencia en las aguas de una mayor cantidad de enterovirus en el medio ambiente. Además resalta la importancia que pueden tener las ropas más cortas y ligeras durante el verano, que podrían favorecer la contaminación fecal. Es importante recordar, la gran cantidad de portadores asintomáticos, que transmiten la infección con la misma eficacia que los enfermos. La distribución de los casos encontrados a lo largo del año nos indica que los meses de enero y febrero son cuando se producen un mayor número de infecciones, corroborando el dato aportado por otros autores que han indicado los meses de verano como la época más proclive para sufrir una infección de esta etiología (Moore *et al.*, 1984; Yamashita *et al.*, 1992; Druyts-Voets *et al.*, 1993; Gharbi *et al.*, 2006). El conocimiento del patrón estacional de la actividad enteroviral es extremadamente importante para intentar su diagnóstico.

# 6. CONCLUSIONES

---

- 1. Los EV se encuentran en bajas concentraciones en las muestras clínicas de LCR por lo que la amplificación de los mismos debe realizarse con una metodología en la cual se incluya en un solo paso la RT y la PCR, a fin de utilizar todos los moldes disponibles.**
- 2. La amplificación de la región VP1 para la tipificación es de una complejidad mayor que la amplificación de la región 5` UTR de la misma cepa.**
- 3. Se ha logrado una aproximación a la optimización y puesto a punto de las condiciones para la amplificación de una región parcial del gen VP1 de EV directamente desde la extracción de ARN de LCR de pacientes pediátricos infectados, para cumplir con la tipificación propuesta por el Programa de Vigilancia de Encefalitis y Meningitis del Ministerio de Salud Pública.**
- 4. Las infecciones por EV que afectan al SNC se producen en nuestro país a lo largo de todo el año, con predominancia en los meses de verano y otoño.**
- 5. La infección afecta principalmente a pacientes neonatos, por lo que deberían revisarse las medidas preventivas frente a la infección enteroviral en el parto y en el manejo del recién nacido. Estas medidas inciden en la importancia de conocer un posible estado infeccioso de la madre, así como la aplicación de medidas higiénicas básicas por parte del personal médico y sanitario, así como de los familiares que cuidarán del niño.**

# 7. AGRADECIMIENTOS

---

A toda mi familia especialmente a mis padres y mis hermanos y a mi primo Emi por el apoyo incondicional durante todos estos años de estudio, por haberme dado la fuerza para seguir adelante.

A mi familia del alma: Rodriguez, Mancuello, Birriel, Brunoldi. Gracias a todos por estar siempre ahí.

A Laura por haberme dado esta oportunidad y toda su confianza durante la misma.

A Laura U. por haberme bancado mientras hacia la pasantía en el laboratorio del Pereira y le terminaba los materiales o le usaba el termociclador cuando lo necesitaba.

Al tribunal: Dra. Pilar Moreno y Msc. Lorena Tomé por su tiempo y dedicación brindados al corregir ésta tesis.

A mis amigas de la facultad Nato, Juli y Vico, por todo el camino recorrido juntas. Gracias a ellas fue más divertido. También a Ale y Mariela.

A mis amigas de Minas: Pocha, Stefa, Mauge, Flor, Lu, Cochi.

A mis compañeras y amigas del CIE: Ana, Maria Isabel, Marce, Lu, Ale, Grisel, que día a día bancan mis locuras.

A todas las personas que estuvieron conmigo y me acompañaron en este largo camino recorrido.

# 8. BIBLIOGRAFÍA

---

- **Ahmed A, Brito F, Goto C et al. (1997).** Clinical utility of the polymerase chain reaction for diagnosis of the enteroviral meningitis in infancy. *J. Pediatr.*; **131**: 393-397.
- **Alexander JP Jr, Chapman LE, Pallansch MA, et al. (1993).** Coxsackievirus B2 infection and aseptic meningitis: A focal outbreak among members of a high school football team. *J. Infect. Dis.*; **167**:1201–1205.
- **Anderson MS, Glodé MP, Smith AL. (2004).** Textbook of Pediatrics Infectious Diseases. Feigin RD, et al. 5th edition. Elsevier Inc., Philadelphia, Pennsylvania: 1265-1279.
- **Bell EJ, McCartney RA. (1984).** A study of Coxsackie B virus infections, 1972–1983. *J. Hyg.*; **93**: 197–203.
- **Berlin LE, Rorabaugh ML, Heldrich F. (1993).** Aseptic Meningitis in infants less than 2 years of age: diagnosis and etiology. *J Infect Dis*; **92**:206.
- **Casas I, Palacios GF, Trallero G, Cisterna D, Freire MC, Tenorio A. (2001).** Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J. Med. Virol.* **65**: 138–148.
- **Chapron, CD, Ballester NA, Fontaine JH, Frades CN, Margolin AB. (2000).** Detection of Astroviruses, Enteroviruses and Adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection Rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol*; **66**: 2520-2525.
- **Cherry JD, Jahn CL. (1965).** Herpangina: the etiologic spectrum. *Pediatrics*; **36**:632.
- **Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL. (1988).** Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol*; **26**: 2576-2580.
- **Cisterna DM, Palacios G, Rivero K, Girard D, Lema C, Freire MC. (2007).** Epidemiología de los enterovirus asociados a enfermedades neurológicas. *Medicina (Buenos Aires)*; **67**: 113-119.
- **Cooney MK, Hall CE, Fox JP. (1972).** The Seattle virus watch. 3. Evaluation of isolation methods and summary of infections detected by virus isolations. *Am. J. Epidemiol.*; **96**: 286–305.
- **Dechkum N, Pangsawan Y, Jayavasud C, Saguanwongse S. (1998).** Coxsackie B virus infection and myopericarditis in Thailand, 1987–1989. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health*; **29**: 273–276.
- **Domingo, E. (2002).** Quasispecies theory in virology. *J. Virol.* **76**: 463-465.
- **Dowdle WR, Birmingham ME. (1997).** The biologic principles of poliovirus eradication. *J. Infect. Dis.*; **175**: 286–292.
- **Druyts-Voets E, Van Renterghem L, Gerniers S. (1993).** Coxsackie B virus epidemiology and neonatal infection in Belgium. *J Infect*; **27**: 311-316.
- **Druyts-Voets E. (1997).** Epidemiological features of entero non-poliovirus isolations in Belgium 1980-94. *Epidemiol Infect*; **119**: 71-77.

- **Duke GM, Osorio JE, Palmenberg AC. (1990).** Attenuation of Mengovirus through genetic engineering of the 5' noncoding poly(C) tract. *Nature*; **343**: 474–476.
- **Feachem R, Garelick H, Slade J. (1981).** Enteroviruses in the environment. *Trop. Dis. Bull.*; **78**: 185–230.
- **Fields BN, Knipe DM, Howley P. (2007).** Virology. Volume one. 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. Estados Unidos.
- **Flanegan JB, Petterson RF, Ambros V, et al. (1977).** Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; **74**: 961–965.
- **Freund MW, Kleinveld G, Krediet TG. (2010).** Prognosis for neonates with enterovirus myocarditis. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.*; **95**: 206.
- **Forss S, Schaller H. (1982).** A tandem repeat gene in a picornavirus. *Nucleic Acids Res.*; **10**: 6441–6450.
- **Fowlkes AL, Honarmand S, Glaser C. (2008).** Enterovirus-associated encephalitis in the California encephalitis Project, 1998-2005. *J Infect Dis*; **198**: 1685.
- **Gharbi J, Jaidane H, Ben M'hadheb M, El Hiar R, Chouchene C, Gueddiche MN, Aouni M. (2006).** Epidemiological study of non-polio enterovirus neurological infections in children in the region of Monastir, Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis*; **54**: 31-36.
- **Gondo K, Kusuhara K, Take H, Ueda K. (1995).** Echovirus type 9 epidemic in Kagoshima, southern Japan: Seroepidemiology and clinical observation of aseptic meningitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*; **14**: 787–791.
- **Hahn H, Palmenberg AC. (1995).** Encephalomyocarditis viruses with short poly(C) tracts are more virulent than their mengovirus counterparts. *J. Virol.*; **69**: 2697–2699.
- **Hall CE, Cooney MK, Fox JP. (1970).** The Seattle virus watch program. I. Infection and illness experience of virus watch families during a communitywide epidemic of echovirus type 30 aseptic meningitis. *Am. J. Public Health Nations Health*; **60**: 1456–1465.
- **Hamilton MS, Jackson MA, Abel D. (1999).** Clinical utility of polymerase chain reaction testing for enteroviral meningitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*; **18**: 533–537.
- **Hayward JC, Gillespie SM, Kaplan KM. (1989).** Outbreak of poliomyelitis-like paralysis associated with enterovirus 71. *Pediatr. Infect. Dis. J.*; **8**: 611.
- **Hernandez M, Barraza P, Palacios O et al. (1996).** Meningitis aséptica y por enterovirus en el niño mayor. *Rev. Chil. Infect.*; **13**: 41-45.
- **Heyman DL. (2005).** Organización Panamericana de la Salud. El control de las enfermedades transmisibles. 18° Edición.
- **Horstmann DM. (1967).** Enterovirus infections of the central nervous system. The present and future of poliomyelitis. *Med. Clin. North Am.*; **51**: 681–692.
- **Irvine DH, Irvine AB, Gardner PS. (1967).** Outbreak of E.C.H.O. virus type 30 in a general practice. *Br. Med. J.*; **4**: 774–776.
- **Jacobson SJ, Konings DA, Sarnow P. (1993).** Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J. Virol.*; **67**: 2961–2971.

- **Jenista JA, Powell KR, Menegus MA. (1984).** Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J Pediatr.*; **104**: 685–690.
- **Jenkins GM, Holmes EC. (2003).** The extent of codon usage bias in human RNA viruses and its evolutionary origin. *Virus. Res.*; **92**: 1-7.
- **Jiang M, Wei D, Ou WL. (2012).** Autopsy findings in children with hand, foot and mouth disease. *N Engl J Med*; 367-91.
- **Johnston SL, Siegel CS. (1990).** Presumptive identification of Enteroviruses with RD, HEp-2, and RMK cell lines. *J Clin Microbiol*; **28**: 1049-1050.
- **Kinney JS, McCray E, Kaplan JE. (1986).** Risk factors associated with echovirus 11° infection in a hospital nursery. *Pediatr. Infect. Dis.*; **5**: 192.
- **Klespies SL, Cebula DE, Kelley CL, Galehouse D, Maurer CC. (1996).** Detection of enteroviruses from clinical specimens by spin amplification shell vial culture and monoclonal antibody assay. *J Clin Microbiol*; **34**: 1465-1467.
- **Kogon A, Spigland I, Frothingham TE, et al. (1969).** The virus watch program: A continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families. VII. Observations on viral excretion, seroimmunity, intrafamilial spread and illness association in coxsackie and echovirus infections. *Am. J. Epidemiol.*; **89**: 51–61.
- **Kono R. (1975).** Apollo 11 disease or acute hemorrhagic conjunctivitis: A pandemic of a new enterovirus infection of the eyes. *Am. J. Epidemiol.*; **101**: 383–390.
- **Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, Wimmer E. (1997).** A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sc. U S A*; **74**: 59–63.
- **Lee C, Lee S, Han E, Kim S. (2004).** Use of cell culture-PCR assay based on combination of A549 and BGMK cell lines and molecular identification as a tool to monitor infectious adenoviruses and Enteroviruses in river water. *Appl Environ Microbiol*; **70**: 6695-6705.
- **Leland DS, Ginocchio CC. (2007).** Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clin Microb*; **20**: 49-78.
- **Lerma M, Farga A. (2000).** Enterovirus: Características y diagnóstico. Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valencia.
- **Lukashev AN, Lashkevich VA, Ivanova OE, Koroleva GA, Hinkkanen AE, Ilonen J. (2003).** Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.*; **77**: 10423–10431.
- **Mateos S, Pérez C, Robino L. (2006).** Infecciones del Sistema Nervioso Central. Temas de Bacteriología y Virología Médica 2ª Edición. Departamento de Bacteriología y Virología Médica. Instituto de Higiene. *Oficina del Libro FEFMUR*.
- **Meqdam MM, Khalousi MM, Al-Shurman A. (2002).** Enteroviral meningitis in Northern Jordan: prevalence and association with clinical findings. *J Med Virol*; **66**: 224-228.
- **Modlin JF. (2005a).** Introduction to the Enteroviruses. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Churchill Livingstone. **2**: 2133-2140.
- **Moore M. (1982).** Centers for Disease Control. Enteroviral disease in the United States, 1970–1979. *J. Infect. Dis.*; **146**: 103–108.

- **Moore M, Kaplan MH, McPhee J, et al. (1984).** Epidemiologic, clinical, and laboratory features of Coxsackie B1–B5 infections in the United States, 1970–79. *Public. Health. Rep.*; **99**: 515–522.
- **Morens DM, Pallansch MA. (1995).** Epidemiology. In: Rotbart H, ed. Human Enterovirus Infections. *Washington: American Society of Microbiology*: 3-23.
- **Nix WA, Berger M, Oberste MS, Brooks BR, McKenna-Yasek D, Brown RH, Roos RP, Pallansch MA. (2004).** Failure to detect enterovirus genome in the spinal cord of ALS patients using a sensitive, semi-nested RT-PCR method. *Neurology*; **62**: 1372–1377.
- **Nix WA, Oberste M S, Pallansch MA. (2006).** Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.*; **44**: 2698-2704.
- **Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. (1999).** Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.*; **73**: 1941–1948.
- **Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. (2000).** Comparison of molecular and classic approaches for the identification of “untypeable” human enterovirus isolates. *J. Clin. Microbiol.*; **38**: 1170-1174.
- **Pérez-Ruiz M, Navarro-Mari JM, Palacios de la Valle E, Rosa-Fraile M. (2003).** Human rhabdomyosarcoma cells for rapid detection of enteroviruses by Shell-vial assay. *J Med Microbiol*; **52**: 789-791.
- **Read SJ, Jeffery KJM, Bangham CRM. (1997).** Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in the laboratory. *J. Clin. Microbiol.*; **35**: 691–696.
- **Robinson CC, Willis M, Meagher A, Giesecker KE, Rotbart H, Glode MP. (2002).** Impact of rapid polymerase chain reaction results on management of pediatric patients with enteroviral meningitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*; **21**: 283–286.
- **Romero JR. (1999).** Reverse transcription polymerase chain reaction of the enterovirus. *Arch. Pathol. Lab. Med.*; **123**: 1161-1169.
- **Romero JR, Rotbart HA. (2003).** Enteroviruses. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC, ASM Press. **2**: 1427-1438.
- **Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrokovski S, McCallum CM, Henikoff S. (1998).** Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.*; **26**: 1628–1635.
- **Rotbart HA. (1990).** Diagnosis of enteroviral meningitis with the polymerase chain reaction. *J. Pediatr.*; **117**: 85-9.
- **Rotbart HA, Ahmed A, Hickey S et al. (1997).** Diagnosis of enterovirus infection by polymerase chain reaction of multiple specimen types. *Pediatr. Infect. Dis. J.*; **16**: 409-10.
- **Rotbart HA, McCracken JR, Whitley RJ et al. (1999).** Clinical significance of enterovirus in serious summer febrile illness of children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*; **18**: 869-74.
- **Salamano R, Ormaechea R, Perna A, Lorenzo J, Dansilio S, Ketzoian C et al. (1999).** Encefalitis herpética: a propósito de un caso clínico (importancia del diagnóstico y tratamiento precoz). *Rev. Med. Uruguay*; **15**: 66-70.

- **Salamano R, Scavone C, Baz M, Rey M, González G, Perna A, Cardinal P, et al. (2009).** Meningitis y Encefalitis víricas en Uruguay. Relevamiento mediante técnicas de reacción en cadena de polimerasa aplicadas al líquido cefalorraquídeo de los grupos herpes, enterovirus y arbovirus como principales agentes etiológicos. A propósito de 59 casos. *Rev. Med. Uruguay*; **25**: 181-197.
- **Sandín D, Rodríguez G. (2006).** Enterovirus. Temas de Bacteriología y Virología Médica 2ª Edición. Departamento de Bacteriología y Virología Médica. Instituto de Higiene. *Oficina del Libro FEFMUR*.
- **Schlesinger Y, Sawyer MH, Storch GA. (1994).** Enteroviral meningitis in infancy: potential role for polymerase chain reaction in patient management. *Pediatrics*; **94**: 157-62.
- **Sigel MM, Rippe DF, Beasley AR, Dorsey M (1976).** Systems for detecting viruses and viral activity. In: Viruses in water. *American Public Health Association, Washington, D.C.*: 139-164.
- **Sklar VE, Patriarca PA, Onorato IM. (1983).** Clinical findings and results of treatment in an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in southern Florida. *Am. J. Ophthalmol.*; **95**:45.
- **Somma R, Campione P, Russi JC, Hortal de Giordano M, Bauzá CA, Peluffo G et al. (1970).** Arbovirus en el Uruguay. *Arch Pediatr. Urug.*; **41**: 359-63.
- **Soler M, Vergara R, Silva M, Collao X, Navarrete E. (2001).** Detección de enterovirus mediante transcripción reversa y reacción de polimerasa en cadena en líquido cefalorraquídeo de niños con meningitis séptica. *Rev. Chil. Infectol.*; **18**: 175-181
- **Strikas RA, Anderson LJ, Parker RA. (1986).** Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enterovirus in the United States, 1970–1983. *J. Infect. Dis.*; **153**: 346–351.
- **Thoelen I, Lemey P, Van der Donck I, Beuselink K, Lindberg AM, Van Ranst M. (2003).** Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J. Med. Virol.*; **70**: 420–429.
- **Thoelen I, Moës E, Lemey P, Mostmans S, Wollants E, Lindberg M, Vandamme A, Van Ranst M. (2004).** Analysis of the Serotype and Genotype Correlation of VP1 and the 5' Noncoding Region in an Epidemiological Survey of the Human Enterovirus B Species. *J. Clin. Microb.*; **Mar**: 963–971.
- **Vokshoor A, Wan C. Viral Meningitis. (2009).** Disponible: [www.emedicine.medscape.com](http://www.emedicine.medscape.com)
- **Vuorinen, T, Vainionpa R, Hyypia T. (2003).** Five years' experience of reverse-transcriptase polymerase chain reaction in daily diagnosis of enterovirus and rhinovirus infections. *Clin. Infect. Dis.*; **37**: 452–455.
- **Yamashita K, Miyamura K, Yamadera S, Kato N, Akatsuka M, Inouye S, Yamazaki S. (1992).** Enteroviral aseptic meningitis in Japan, 1981-1991. A report of the National Epidemiological Surveillance of Infectious Agents in Japan. *Jpn J Med Sci Biol*; **45**: 151-161.
- **Zhao YN, Jiang QW, Jiang RJ, Chen L, Perlin DS. (2005).** Echovirus 30, Jiangsu Province, China. *Emerg Infect Dis*; **11**: 562-567.