

Universidad de Valparaíso

Carrera de Tecnología Médica

Casa Central

Mención Morfofisiopatología y Citodiagnóstico.

“Caracterización morfológica y molecular de los virus respiratorios de mayor prevalencia e importancia médica en pacientes pediátricos del Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso”

Seminario de Grado presentado en conformidad a los requisitos para obtener el Grado Académico de “Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico”

Autor:

Mauricio Vicencio Aravena

Profesora guía:

Cindy Peña Moreno

Profesor Co-guía:

Ximena Collao Ferrada

Agradecimientos

Quisiera agradecer a las profesoras Cindy Peña, Ximena Collao y Jenny Llanos por recibirme siempre con buena disposición y alegría en su oficina. A Melissa Noguera, Esteban Bravo y Katherine Fuentes, por siempre orientarme y alegrar mis jornadas de trabajo en el laboratorio de Virología.

Al fondo PMI 1402 de la Plataforma Interdisciplinaria en Salud, por financiar y apoyar esta investigación.

A mis amigas Paula, Cindy, Drágica, Camila y Constanza, por apoyarme y sobre todo escucharme en los momentos de angustia.

Y a mi madre, que me apoya y guía sin importar las situaciones de nuestras vidas.

“Es necesario que Él crezca, y que yo disminuya”; Juan 3, 30.

“El éxito es aprender a ir de fracaso en fracaso sin desesperarse”; W. Churchill.

Resumen

Los virus son el principal agente responsable de las infecciones respiratorias en el mundo, estas representan un 17% de las muertes en niños menores de 5 años, y en Chile, es la segunda causa de deceso en el mismo grupo.

El virus respiratorio sincicial es el agente principal de infecciones respiratorias agudas bajas en infantes en el mundo. Existen 2 grupos serológicos, A y B. Estudios realizados en Chile para establecer una relación entre severidad clínica e infección por grupos A y B indican que no se demostró una asociación clara entre grupo de virus respiratorio sincicial y severidad, observándose sólo una leve tendencia del grupo serológico B a requerir oxigenoterapia más prolongada y presentar neumonías, estudios a nivel mundial coinciden con estos hallazgos.

En Chile, el adenovirus es el segundo agente etiológico causante de infecciones respiratorias bajas con altos niveles en periodos invernales, el 50% es por el genotipo 7, un 25% por genotipo 2 y un 20% por genotipo 1. El serotipo 7h del subgénero B, según la literatura, es el que mayor tasa de complicaciones hospitalarias puede generar.

Esta investigación está enfocada en la caracterización morfológica y molecular de ambos virus, utilizando muestras 54 de pacientes menores de 2 años del Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso en el periodo invernal 2017. Se utilizaron las técnicas clásicas de estudios en virología: cultivos celulares, PCR y secuenciación, creando dendrogramas.

Los resultados obtenidos por PCR indicaron que el VRS fue el más prevalente en dicho periodo. Mediante la secuenciación se obtuvo un predominio del ADV subgénero C en la primera parte del periodo invernal, seguido del ADV subgénero B, y que las variantes A y B del VRS se mantienen estables en esta temporada. Además, que las secuencias son muy similares con otras existentes en otras partes del mundo.

Palabras clave

Cultivo celular, línea celular HEP-2, biología molecular, virus, adenovirus, virus sincicial respiratorio.

Listado de Abreviaciones

VRS = Virus respiratorio sincicial.

ADV = Adenovirus.

HCVB= Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso.

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction).

SBF = Suero bovino fetal.

PBS = Tampón fosfato salino (phosphate buffered saline).

ADN = Ácido desoxirribonucleico.

ARN = Ácido ribonucleico.

pb = Pares de bases.

Índice

Capítulo 1: Introducción.....	1
1.1. Infecciones respiratorias	1
1.2. Virus	1
1.2.1. Clasificación viral.....	2
1.2.2. Replicación viral	3
1.2.3. Virus respiratorio sincial.	4
1.2.4. Adenovirus.....	5
1.3. Variabilidad genética y severidad clínica de las infecciones respiratorias	6
1.3.1. Virus respiratorio sincial	6
1.3.2. Adenovirus.....	7
1.4. Estudio y diagnóstico de virus respiratorios	8
1.4.1. Cultivos celulares	8
1.4.1.1. Tipos de cultivo celular	8
1.4.1.2. Utilidad de los cultivos celulares en el diagnóstico virológico.....	10
1.4.1.3. Selección de una línea celular en el diagnóstico virológico.....	10
1.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa.....	11
1.4.2.1. Ciclo de amplificación	12
1.4.3. Secuenciamiento genético	12
Capítulo 2: Objetivos.....	14
2.1. Objetivo General	14
2.2. Objetivos Específicos	14
Capítulo 3: Materiales y métodos	15
3.1. Aspectos éticos.....	15
3.2. Tipo de diseño	15

3.3. Periodo y lugar de desarrollo de la investigación	15
3.4. Descripción del universo	15
3.5. Descripción de la población de estudio	15
3.6. Muestra	15
3.7. Criterios de inclusión y exclusión.....	15
3.8. Variables consideradas.....	16
3.8.1. De exposición (independiente).....	16
3.8.2. De resultado (dependiente)	16
3.9. Procedimientos	16
3.9.1. Inoculación de virus	18
3.9.2. Extracción de ácidos nucleicos	19
3.9.2.1. Lisis Celular.....	19
3.9.2.2. Extracción.....	20
3.9.3. Reacción en cadena de la polimerasa.....	20
3.9.4. Purificación	21
3.9.5. Secuenciación	22
3.9.6. Análisis bioinformático.....	23
3.9.7. Análisis estadístico	23
 Capítulo 4: Resultados	 24
4.1. Observación de cultivo celular	24
4.2. Producto PCR y electroforesis	28
4.3. Secuenciación de muestras positivas	32
4.4. Secuencias consenso	32
4.5. Análisis de similitud de secuencias.....	40
 Capítulo 5: Discusión.....	 44

5.1. Cultivo celular.....	44
5.2. PCR.....	45
5.3. Bioinformática.....	46
Capítulo 6: Conclusión.....	48
Capítulo 7: Bibliografía.....	49
Capítulo 8: Anexos.....	54
8.1. Protocolos para cultivos celulares.....	54
8.1.1. Mantenición y cambio de medio.....	54
8.1.2. Traspaso y tripsinización de las células.....	54
8.1.3. Congelamiento de células.....	55
8.1.4. Descongelamiento de células.....	56
8.1.5. Inoculación de virus.....	57
8.2. Protocolos de kits dados por fabricantes.....	58
8.2.1. Extracción de ácidos nucleicos con kit Thermo Scientific.....	58
8.2.2. Purificación de ADN desde gel (Promega Wizard® Gel and PCR Clean-up System).....	59
8.3. Tabla de preparación de mezcla para PCR.....	60
8.3.1. Para virus respiratorio sincicial.....	60
8.3.2. Para adenovirus.....	61
8.4. Configuración de termociclador.....	61
8.5. Soluciones de trabajo.....	62
8.5.1. Preparación de medios de cultivos.....	62
8.5.1.1. Preparación de medio de cultivo L-15 con antibióticos.....	63
8.5.1.2. Preparación de medio L-15 con SFB y antibióticos.....	63
8.5.2. Preparación de <i>buffer</i> PBS.....	64
8.5.3. Preparación de Buffer TBE.....	64
8.5.4. Preparación de bromuro de etidio.....	65
8.6. Electroforesis.....	65

8.6.1.	Preparación de geles de agarosa	65
8.6.2.	Protocolo de carga de geles	66
8.6.2.1.	Gel al 2 y 3%	66
8.7.	Secuencias de muestras positivas.....	68
8.7.1.	Adenovirus.....	68
8.7.2.	Virus respiratorio sincial	70
8.8.	Código de GenBank de las secuencias usadas para crear los dendrogramas.....	86
8.8.1.	Para adenovirus	86
8.8.2.	Para virus respiratorio sincial.....	86

Capítulo 1: Introducción

1.1. Infecciones respiratorias

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) representan un 17% de las muertes en niños menores de 5 años en el mundo, y en Chile es la segunda causa de deceso en el mismo grupo etario. Su forma estacional de presentación y su alta contagiosidad sitúan a los virus como potenciales responsables de la mayoría de las infecciones respiratorias agudas. La forma de presentación clínica de las virosis respiratorias varía desde asintomáticos hasta infecciones fatales, con muchas situaciones intermedias. Algunos virus tienden a producir predominantemente infecciones del tracto respiratorio alto, mientras otros pueden comprometer el árbol respiratorio inferior (1).

La fuente de contagio es habitualmente otro ser humano excretor del virus con o sin infección clínica evidente. El mecanismo de contagio es a través de las secreciones respiratorias que se eliminan en forma de partículas grandes (mayores a $5\mu\text{m}$) que quedan depositadas tanto en manos como en el ambiente, o pequeñas (menores de $5\mu\text{m}$ o gotitas de Pflüger) que conforman aerosoles y que quedan suspendidas en el ambiente. La puerta de entrada es la mucosa respiratoria alta, incluyendo las conjuntivas oculares, la diseminación en el organismo ocurre por continuidad en la mucosa. El período de incubación es muy corto, de horas a 5 días, hay una gran producción de virus en la puerta de entrada que facilita la excreción viral y la alta contagiosidad (1).

Los niños que al nacer no reciben lactancia materna no estarán protegidos contra las IRA, debido a la inactividad del sistema inmunitario del feto pues no ha estado expuesto a agentes extraños. La desnutrición también influye en un sistema inmune deficiente. Otros factores de riesgo son el nivel socioeconómico, escolaridad de los padres, condiciones de vida en la vivienda y el hacinamiento, la contaminación ambiental y el hábito de fumar de los convivientes (siendo el menor un fumador pasivo) (2).

1.2. Virus

Los virus son microorganismos, potencialmente patógenos, considerados parásitos intracelulares, que de forma obligada usan la maquinaria metabólica de la célula

Capítulo 1: Introducción

huésped para reproducirse (3,4). Como parte de su ciclo de replicación requieren de la fabricación de cada una de las biomoléculas que conforman sus estructuras, y, sólo mediante la infección en una célula esto es posible. Las partículas virales o viriones están compuesta por ácido nucleico (ADN, ácido desoxirribonucleico, o ARN, ácido ribonucleico), rodeada de una cubierta proteica llamada cápside que tiene como función proteger al genoma tanto en el medio extra como intracelular, permitir la absorción y penetración del virus en la célula huésped. y en algunos casos poseer una envoltura de bicapa lipídica proveniente de la célula huésped, la cual contiene proteínas de origen viral (5,6). La envoltura puede determinar la labilidad de una partícula viral, pues una membrana lipídica es químicamente más inestable que una cubierta proteica (4,7,8).

Los virus son altamente específicos con la célula que infectan, debido a que entre el virus y la célula hospedadora debe existir un reconocimiento específico, en el que participan proteínas virales y celulares. Esta característica conocida como tropismo viral, es la afinidad que presenta un virus determinado con uno o más tipos celulares. Encontramos entonces virus hepatotrópicos, neurotrópicos, con tropismo por células del sistema digestivo o sistema respiratorio etc. (4,5,7).

1.2.1. Clasificación viral

Existen diferentes formas de clasificar a los virus. La primera forma el tropismo del virus, diferenciando entre virus dermatótrofos, respiratorios, neurótrofos, etcétera, pero pronto esta forma de clasificar presentó limitaciones, como el caso del virus de la poliomielitis (un neurótropo) que normalmente infecta el aparato digestivo y el sistema nervioso. Muchísimos virus reciben nombre asociado a patologías producidas, especies que infectan, tejidos blanco, e incluso lugares donde fueron aislados o del órgano donde se identificaron, un ejemplo es el adenovirus que fue aislado a partir del tejido adenoideo, o el virus del Nilo Occidental por su ubicación geográfica (4,5,7,9).

El método de Baltimore¹ se basa en la naturaleza del ácido nucleico viral y el mecanismo de obtención del ARN mensajero, en base a esto hay 7 grupos como se muestra en Figura 1.1 (10). Es una de las formas de clasificación más utilizados, pues los virus de un

¹ David Baltimore, biólogo estadounidense y premio Nobel de medicina en 1975.

mismo grupo se comportarán básicamente de la misma manera, facilitando la investigación (4,7,9,11).

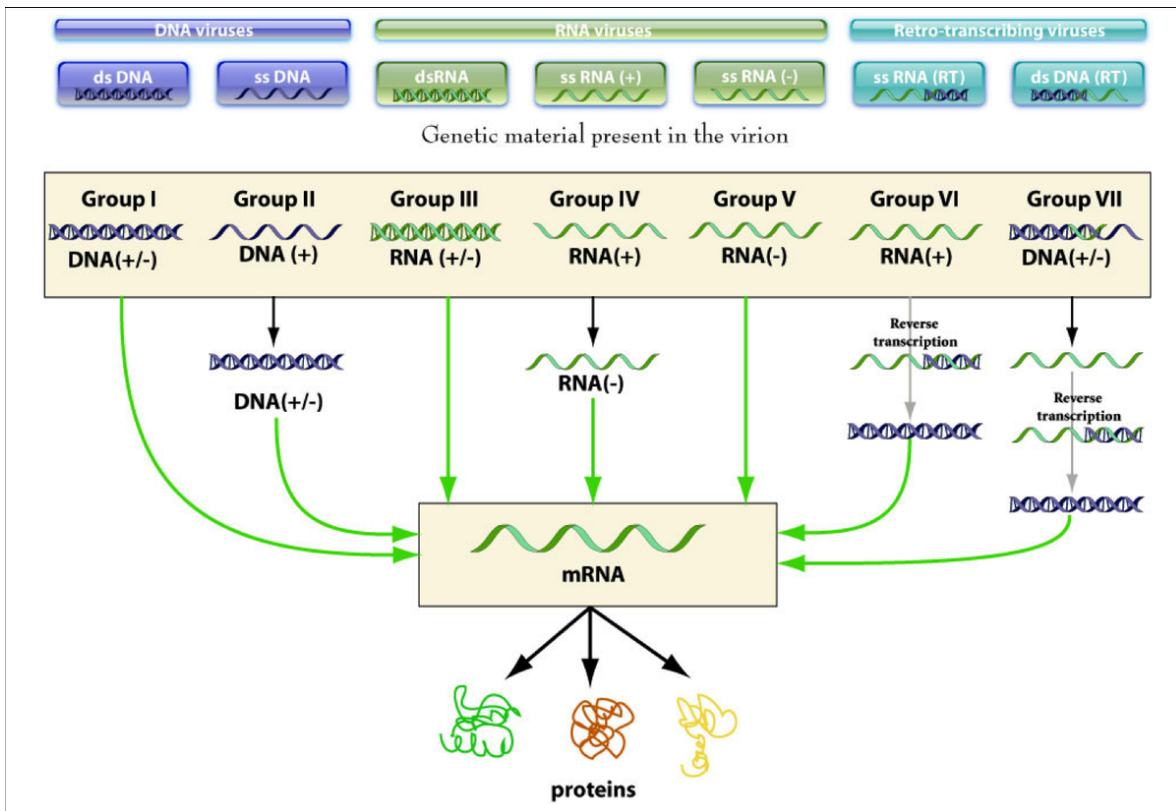


Figura 1.1- Sistema de clasificación de Baltimore (12).

La clasificación taxonómica está determinada por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV, sigla en inglés) y depende directamente de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología. Los virus se dividen por su genoma: ADN y ARN. Los virus de ADN se dividen en 7 familias y los de ARN en 21 familias (13). El orden de importancia clasificatoria es: orden, familia, subfamilia, género, especie y subespecie (5,7,9). La reacción a las pruebas de neutralización con anticuerpos define al serotipo, de manera que un virus puede tener distintos agentes inmunológicos, por ejemplo, el adenovirus tiene cerca de 55 serotipos. El genotipo es la caracterización del ácido nucleico viral, sin relación con la respuesta antigénica (4,7).

1.2.2. Replicación viral

El ciclo replicativo viral consta de 5 etapas principales: absorción, penetración, síntesis de macromoléculas, ensamblaje y liberación. En la etapa de absorción se produce

Capítulo 1: Introducción

una interacción entre el virión y la célula, permitiendo una retención del virión en la superficie de la membrana, dada por la afinidad entre ligando y receptor por medio de glicoproteínas. En la penetración se produce la incorporación del material genético dentro de la célula, una vez ocurrida la absorción. Existen, dos formas de penetración, por fusión y por endocitosis. La penetración por fusión es más común en los virus envueltos, pues se unen las membranas lipídicas formando una sola superficie continua, de modo que la cápside viral ingresa al citosol. En la endocitosis se utilizan mecanismos conocidos de ingreso de macromoléculas a través de endosomas, para posteriormente liberar la cápside en el citoplasma, se puede decir que es el mecanismo contrario al de la fusión de membranas (3–5,14).

En la biosíntesis de macromoléculas, el virus forma el ARN mensajero de acuerdo con la clasificación de Baltimore en un proceso llamado transcripción viral. Dentro de esta etapa está la biosíntesis de proteínas virales, tanto estructurales como no estructurales, que formarán la cápside y glicoproteínas para el reconocimiento celular, y la replicación del genoma viral, ya sea ADN o ARN según el virus (4,5,11).

En la etapa de ensamblaje, se pueden observar las primeras partículas virales y los cambios que ocurren en la célula. En esta etapa se estructura la cápside viral y en su interior se almacena el genoma viral, generando la estructura base del virus. En la liberación se pueden observar dos procesos, la lisis celular, en aquellos virus desnudos en los cuales la membrana citoplasmática celular se rompe ocasionando la muerte celular. Por otra parte, los virus envueltos son liberados por gemación, de manera que parte de la bicapa lipídica, proveniente del huésped forma parte del virus (3,4,14).

1.2.3. Virus respiratorio sincicial.

El virus respiratorio sincicial es el agente principal de infecciones respiratorias agudas bajas en infantes en el mundo y en Chile. El principal grupo de riesgo son bebés prematuros y niños menores de 2 años, además de ser un agente relevante en ancianos y en inmunocomprometidos. Este agente es un virus envuelto, pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Neumoviridae* y género *Pneumovirus*. Está constituido por una sola hebra de ARN con polaridad negativa de 14.222 bases. Contiene 10 genes que codifican

Capítulo 1: Introducción

para 11 proteínas de las cuales 9 son estructurales y 2 no estructurales. Se distinguen 2 grupos serológicos, A y B, en base a las proteínas de superficie (1).

La única fuente de contagio es humana, mediante el contacto directo con secreciones respiratorias eliminadas en forma de aerosoles o depositadas en fómites. La puerta de entrada es la vía respiratoria alta, donde el virus es absorbido, multiplicado en las células epiteliales y se difunde por vecindad con el árbol respiratorio. El cuadro clínico se ve marcado por destrucción del epitelio ciliar, inflamación peribronquial y edema en bronquios finos, llevando a una obstrucción respiratoria, lo que puede producir hipoxemia (15).

En los países de clima templado se presentan brotes epidémicos en otoño tardío, invierno y primavera, que duran de 3 a 5 meses. Los grupos A y B circulan juntos o con alternancia, pero con claro predominio del A. En Chile, el 1% al 2% de las infecciones se hospitalizan, y de ellas el 5% al 7% requieren cuidados intensivos, la letalidad hospitalaria es de alrededor del 0,1% en lactantes anteriormente sanos. Con frecuencia los brotes sobrepasan en periodo invernal la capacidad de atención hospitalaria. Según información del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), la infección por VRS en 2017 sumó 7342 casos (pediátricos y adultos), con un peak en la semana 29, con 31 casos positivos confirmados en Valparaíso y 45 en Viña del Mar (16).

1.2.4. Adenovirus

El adenovirus en Chile es el segundo agente causal de infecciones respiratorias agudas bajas, es un virus perteneciente a la familia *Adenoviridae*, que actualmente comprende cinco géneros, donde el de mayor importancia clínica es el *Mastadenovirus* con 22 especies que afecta a humanos y varios mamíferos. Se han descrito 56 tipos en humanos y distribuidos en 7 especies (o subgéneros) que se detallan en Tabla 1.1. Los adenovirus son icosaédricos desnudos de 70 a 100 nm de diámetro, su genoma es ADN lineal de doble hebra, de 26 a 45 kpb, que codifica a 12 proteínas (1).

Los adenovirus pueden causar infecciones agudas líticas de células epiteliales de mucosas, inflamación latente en tejido linfóide. La puerta de entrada más frecuente es el epitelio nasofaríngeo. El contagio se produce por contacto directo, generalmente por secreciones respiratorias tanto en aerosoles o por manos contaminadas. Por su condición de

Capítulo 1: Introducción

virus desnudo son resistentes a la desecación, a detergentes y a secreciones gastrointestinales. El principal mecanismo de daño es por lisis celular directa, aunque también puede inducir la apoptosis celular. El virus se disemina por continuidad en la mucosa.

Las infecciones por ADV tienen una distribución mundial y se presentan en forma endémica con brotes epidémicos principalmente en periodo invernal. Los serotipos más frecuentes son del 1 al 7, que pueden llegar a tasas de hospitalización del 20% al 40% de los casos. En Chile, la vigilancia epidemiológica entre 1988 a 1998 mostró a 3.825 lactantes menores de dos años hospitalizados por infecciones respiratorias agudas bajas, de los cuales el 11% de los casos eran por ADV, dejándolo como el agente más frecuente luego del VRS (1). El análisis genotípico de 221 cepas identificó al serotipo 7h del subgénero B como el de mayor circulación (55,6%), el cual según la literatura es el que mayor tasa de complicaciones hospitalarias puede generar (17).

La manifestación clínica varía de fiebre faringoconjuntival, neumonías hasta inflamaciones oculares o infecciones del tracto urinario.

Tabla 1.1- Clasificación de adenovirus humanos según especie y serotipos (1).

Especie (subgénero)	Serotipos
A	12, 18, 31
B1	3, 7, 16, 21, 50
B2	11, 14, 34, 35, 55
C	1, 2, 5, 6
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 49, 50, 51, 53, 54
E	4
F	40, 41
G	52

1.3. Variabilidad genética y severidad clínica de las infecciones respiratorias

1.3.1. Virus respiratorio sincicial

En nuestro país el VRS es la principal causa de hospitalización por Infecciones respiratorias agudas bajas, y en el periodo epidémico, que corresponde a los meses fríos, predomina este agente en más del 90% de los casos (1,18,19). Se han definido los riesgos para enfermedad severa en relación con la primoinfección por VRS, estableciéndose como factores de riesgo la prematuridad, displasia broncopulmonar, cardiopatías, inmunosupresión y edad menor de 6 meses (20,21). Sin embargo, niños previamente sanos también pueden tener una evolución grave. Podría deberse a factores dependientes de la cepa prevalente de VRS, es decir los grupos A y B. Algunos estudios atribuyen mayor severidad clínica al VRS A y unos pocos al B, sin que haya definición al respecto (22,23). Se ha observado que los grupos A y B alternan su circulación en el tiempo, VRS B predominó en 1994, A, lo hizo entre 1995 y 1997 y entre 1999 y 2002; en 1998 la proporción de VRS A y B fue similar, apareciendo primero A y luego B.

En 1998, la epidemia de VRS produjo mayor demanda de consultas y hospitalizaciones, lo que generó gran preocupación en las autoridades de salud y en la población, con una percepción de mayor gravedad. La vigilancia de virus respiratorios demostró que circularon grupos A inicial y posteriormente B. Estudios realizados en nuestro país para establecer una relación entre severidad clínica e infección por grupos A y B indican que no se demostró una asociación clara entre grupo de VRS y severidad, observándose sólo una leve tendencia del VRS B a requerir oxigenoterapia más prolongada y a presentar neumonías puras (24).

1.3.2. Adenovirus

En Chile el ADV es la segunda causa de infecciones respiratorias bajas con altos niveles en periodos invernales. Del total de infecciones por este agente el 50% es por el genotipo 7, un 25% por genotipo 2 y un 20% por genotipo 1. Sumado a ello, es un agente importante de infección intrahospitalaria con una tasa del 55%. Algunos casos son severos e incluso fatales o con graves secuelas pulmonares (25). Existe poca información sobre los patrones de comportamiento de las infecciones virales, sin embargo sí se sabe de la mayor frecuencia los genotipos (7, 2 y 1) y de la gravedad de los cuadros asociados, siendo el 7h el que mayores complicaciones genera en la población infantil, lo que reafirma la importancia del conocimiento de este agente y algunos genotipos en particular (1).

1.4. Estudio y diagnóstico de virus respiratorios

1.4.1. Cultivos celulares

Un cultivo celular es el producto de la colección desde diferentes órganos, de células animales, las cuales son dispuestas en condiciones propicias para su supervivencia y multiplicación, de modo tal, que sus funciones metabólicas se mantengan semejantes a las que tenían en el huésped (26,27).

Para preparar un cultivo celular, las células son disociadas o desagregadas desde el tejido original, mediante disrupción mecánica seguida por un tratamiento de enzimas proteolíticas. Las células son suspendidas en un medio de cultivo, que consiste en una solución isotónica de sales, glucosa, vitaminas, coenzimas y aminoácidos, al cual se adicionan antibióticos y antimicóticos para inhibir el crecimiento microbiano (28). El medio es suplementado con suero, el cual es una fuente de factores de crecimiento para las células. En un medio de este tipo, las líneas celulares comúnmente usadas se duplican en 24 a 48 horas. A medida que las células se dividen van cubriendo la superficie. Si las células poseen la capacidad de adherirse a la superficie, crecerán formando una monocapa, por el contrario, si no se adhieren crecerán en suspensión. La capacidad de adherirse o no a una superficie está asociada con el tipo de célula de la cual deriva el cultivo celular (5,29,30).

1.4.1.1. *Tipos de cultivo celular*

Según el grado de preservación del tejido u órgano de origen y de la duración del cultivo, se pueden establecer tres tipos principales: cultivo celular primario, línea celular y cepa celular (26) como se muestra en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2- Tipos de cultivos celulares y sus principales características.

	Cultivo celular primario	Línea celular continua	Cepa celular
Origen	Proviene de la disgregación de un tejido	Se origina de un tejido tumoral o por tratamiento de un cultivo celular primario o cepa celular con un agente mutagénico	Linaje celular seleccionada por alguna característica particular.
Características	<ul style="list-style-type: none"> • Formado por varios tipos de células. • Tiene un tiempo de vida (crecimiento) limitado). • Las células muestran una morfología y fisiología similar a las células originarias. • Sus cromosomas se presentan en número diploide. 	<ul style="list-style-type: none"> • Formada por un solo tipo de células. • Son inmortales. • No se parecen a las células originales y no conservan las propiedades bioquímicas que tenían <i>in vivo</i>. • Número y morfología de los cromosomas es anormal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Constituidas por un solo tipo de células. • Son finitas (número limitado de subcultivos). • Número de cromosomas igual al tejido de origen (diploide).
Ejemplos	<ul style="list-style-type: none"> • Riñón de mono. • Amnios, riñón y prepucio de embriones humanos. • Embriones de pollo y ratón. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hep-2 y HeLa derivadas de carcinomas humanos. • Células Vero originadas desde riñón de mono africano. • 3T3 derivadas de ratón. • BHK-21 derivadas de riñón de hámster. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa WI-38 proveniente de pulmones de embriones humanos.

1.4.1.2. ***Utilidad de los cultivos celulares en el diagnóstico virológico***

El aislamiento y cultivo de los virus es considerado el patrón de referencia (*gold standar*) para demostrar la etiología viral de una enfermedad. Este puede lograrse mediante cultivo en animales de experimentación, cultivo de huevos embrionados y cultivos celulares. Si bien los animales de experimentación fueron los primeros en usarse en aislamiento viral, actualmente su uso ha disminuido debido a las dificultades inherentes al trabajo con animales de laboratorio, el cuestionamiento ético y a la posibilidad de usar otros sistemas más adecuados. En ciertos laboratorios de diagnóstico virológico, se emplean aún en la propagación de virus rábicos para producción de vacunas antirrábicas en humanos y animal, para el diagnóstico de enterovirus en estudios epidemiológicos, diagnóstico de arbovirus, como también para la obtención de anticuerpos policlonales o monoclonales, sueros hiperinmunes, complemento y glóbulos rojos empleados en técnicas serológicas. En la actualidad, el uso de huevos embrionados está restringido a la propagación de virus de influenza, ya sea para diagnóstico, para obtención de antígeno viral o producción de vacunas. Los cultivos celulares constituyen el sistema más empleado para el aislamiento y propagación de la gran mayoría de los virus patógenos para el hombre y animales (5,29,30).

Para optimizar el aislamiento viral, es fundamental la elección de la muestra adecuada y obtener éstas prontamente. También es importante procesar las muestras lo antes posible después de obtenidas, para disminuir la pérdida de la viabilidad viral.

1.4.1.3. ***Selección de una línea celular en el diagnóstico virológico***

No existe un tipo de célula susceptible a todos los virus que nos interesa propagar, de modo que un laboratorio de diagnóstico viral debe contar con distintos tipos de cultivos celulares. Algunos virus inducen un efecto citopático muy característico en cultivo, lo que permite un diagnóstico relativamente simple (con el personal calificado) como es el caso del virus Herpes simple (31). Sin embargo, generalmente se deben usar técnicas diagnósticas complementarias para identificar el agente viral. Una de las principales ventajas de los cultivos celulares es el aumento del número de virus presentes, por tanto, aumenta la sensibilidad de detección de la técnica molecular. Es importante revisar la literatura para poder seleccionar la línea celular más idónea para la investigación y diagnóstico, en la Tabla 1.3 se nombran algunas de las líneas celulares más utilizadas y los virus que las infectan (29–

31), se destaca la línea Hep-2 utilizada en este estudio para el aislamiento y amplificación de ADV y VRS.

Tabla 1.3- Sensibilidad de algunas líneas celulares (29)

Virus/células ²	PMK	Hep-2	A549	Vero	BMG	ML	MRC-5	HeLa
Adenovirus	+	+	+	+			+	+
CMV							+	
Polio	+	+	+	+	+		+	
VHS		+	+	+	+	+	+	
Influenza	+		+/-					
Sarampión	+	+	+	+				
VRS	+	+	+					+
Paperas	+		+	+			+	
Parainfluenza	+	+	+/-					
Rotavirus	+		+/-	+				
VZV							+	

1.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa es un método de amplificación de material genético que revolucionó el diagnóstico y el estudio de la ciencia. Desarrollada en 1983 por Kary Mullis³ (32). Es una de las técnicas moleculares más usadas.

Un aspecto importante de mencionar es que los espacios y equipos de laboratorio deben ser adecuados para las diferentes etapas de la técnica. Con salas diferenciadas de: preparación de reactivos, extracción de ácidos nucleicos, carga de muestras extraídas, amplificado y sala de detección de amplificados.

² VZV=Virus Varicela-Zoster, CMV= Citomegalovirus, VHS= Herpes simplex, VRS= Virus respiratorio sincial, PMK= riñón de mono, Hep-2= carcinoma laríngeo humano, A549= adenocarcinoma de pulmón, Vero= riñón de mono africano, BGM= riñón de mono verde, ML= pulmón de armiño, MRC-5= pulmón fetal humano, HeLa= adenocarcinoma de cérvix.

³ Kary Mullis: bioquímico estadounidense, nació en 1944 y obtuvo el premio Nobel de Química y el premio de Japón en 1993.

1.4.2.1. *Ciclo de amplificación*

El termociclador es un equipo que realiza ciclos de variación de temperatura que permiten la amplificación del ácido nucleico. Básicamente consiste en 3 fases: desnaturalización, alineamiento y elongación (32–34).

1. Desnaturalización: se separan las hebras de ADN a una temperatura mayor a 90°C.
2. Alineamiento: los partidores se unen a la hebra de ADN a una temperatura de 50°-75°C.
3. Elongación: síntesis de nuevas hebras de ADN por la Taq polimerasa en dirección 5' a 3'. Ocurre a los 72°-78°C. Después de terminados todos los ciclos, existe una fase de elongación final, que dura entre 5 a 10 minutos, para asegurar que cualquier cadena se haya amplificado.

Posteriormente se observan los fragmentos amplificados a través de una electroforesis en gel de agarosa, marcados con un agente que se intercala en el ADN de doble cadena, el cual emite luminescencia al ser expuesto a luz ultravioleta. En caso de los virus de ARN, se debe hacer una retrotranscripción del genoma, para ello se usa una enzima transcriptasa reversa, como paso previo.

La sección de Virología de la Escuela de Medicina utiliza para la detección de virus respiratorios una variación de la PCR, llamada anidada o *nested*. Esta variación permite aumentar la sensibilidad y la especificidad de la PCR. Se utilizan dos ciclos de amplificación con dos partidores distintos cada uno. El producto de la primera amplificación es sometido a una segunda amplificación, estos partidores se acoplan a una secuencia distinta a la secuencia amplificada con los primeros cebadores (32–34).

El aumento de la sensibilidad está relacionado con el alto número de ciclos totales, y la especificidad con partidores internos (del segundo ciclo) más específicos para los segmentos de interés. La principal desventaja está en el riesgo de contaminación que pueda ocurrir en la transferencia del primer producto. Por eso, es fundamental la separación de los espacios de carga de muestras y productos amplificados, y, sobre todo, el buen manejo del profesional que realiza la técnica.

1.4.3. Secuenciamiento genético

Capítulo 1: Introducción

La secuenciación es un proceso que determina el orden o la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN. Estos se comparan con bases de datos de secuencias disponibles en la red, como GenBank del NIH (*National Institutes of Health*, Estados Unidos), y permite la identificación específica de microorganismos, entre ellos los virus. La especificidad permite diferenciar dos serotipos de un mismo virus, caracterización única y definitiva, información importante para el conocimiento de la epidemiología de un virus con aplicaciones como determinar, por ejemplo, la elaboración y aplicación de vacunas (35).

Capítulo 2: Objetivos

2.1. Objetivo General

Caracterizar morfológica y molecularmente los virus respiratorios detectados con mayor frecuencia y de mayor importancia médica en pacientes pediátricos con bronquiolitis del Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso en el periodo invernal 2017.

2.2. Objetivos Específicos

- Amplificar los virus respiratorios en estudio mediante la técnica de cultivo celular.
- Analizar las muestras estudiadas a través de PCR.
- Secuenciar los genomas virales de las muestras analizadas con resultado positivo por PCR.

Capítulo 3: Materiales y métodos

3.1. Aspectos éticos

En esta investigación se utilizaron muestras obtenidas para un estudio realizado previamente en el laboratorio de virología de la Escuela de Medicina, aprobado en su oportunidad por el comité ético-científico del Servicio de Salud Valparaíso - San Antonio.

3.2. Tipo de diseño

Esta investigación es del tipo no experimental, pues no se manipulan deliberadamente las variables, y se basa en la observación. Es a su vez transversal o transeccional, observando y registrando los datos para su posterior análisis.

3.3. Periodo y lugar de desarrollo de la investigación

Esta investigación se desarrolló en dependencias del Laboratorio de Virología, Departamento de Preclínicas de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso, entre los meses de marzo de 2018 a marzo de 2019.

3.4. Descripción del universo

Niños menores de dos años que fueron hospitalizados en el Servicio de Pediatría del Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso entre junio y septiembre de 2017 con cuadros de bronquiolitis y dificultad respiratoria. El total corresponde a 90 niños.

3.5. Descripción de la población de estudio

La población en estudio corresponde a 64 niños, con resultado positivo a la detección por PCR, de adenovirus y virus respiratorio sincicial.

3.6. Muestra

El Tamaño de la muestra corresponde a 54 muestras, correspondientes a las que cumplen criterio de inclusión establecidos, que dieron positivas a la presencia de virus respiratorio sincicial y/o adenovirus. Se utilizó un muestro no probabilístico.

3.7. Criterios de inclusión y exclusión

Se incluirán:

- Todas las muestras que fueron identificadas como positivas para adenovirus y/o virus respiratorio sincicial por PCR realizada en este estudio, confirmando la presencia e integridad del material genético de los virus de interés de la investigación.

Serán excluidas las muestras que:

- Tengan un agente viral distinto a los mencionados anteriormente incluyendo a los que posean una coinfección viral con adenovirus y/o virus respiratorio sincicial.
- Las muestras donde el volumen de aspirado nasofaríngeo sea insuficiente para la ejecución de la PCR y posterior cultivo del virus en células.
- Las muestras que sean identificadas como negativas por PCR realizada en este estudio.

3.8. Variables consideradas.

3.8.1. De exposición (independiente)

- Variante genética para adenovirus: variación del genoma de adenovirus en genes para proteína del exón que determina la existencia de diferentes genotipos virales.
- Variante genética para virus respiratorio sincicial: variación del genoma de virus respiratorio en genes para proteína de fusión que determina la existencia de diferentes genotipos virales.

3.8.2. De resultado (dependiente)

- Características morfológicas de adenovirus y virus respiratorio sincicial a través de cultivo celular: lisis celular o formación de sincicio dependiendo del caso.
- Características morfológicas de adenovirus y virus respiratorio sincicial observables a través de microscopía óptica y electrónica.
- Características moleculares de adenovirus y virus respiratorio sincicial a través de estudio de secuencias genéticas: con reacción en cadena de la polimerasa, electroforesis y secuenciación molecular.

3.9. Procedimientos

Capítulo 3: Materiales y métodos

Para esta investigación se seleccionó la línea celular Hep-2 por ser una línea susceptible y común de infección para ambos virus estudiados. Se obtienen líneas celulares desde el Instituto de Salud Pública de Chile las cuales son almacenadas durante 24 horas en la estufa termorregulada (marca Revco, modelo Elite II, Figura 3.1) a 37° Celsius. Los frascos contaban con medio de cultivo L-15 al 2% de SBF (suero bovino fetal).



Figura 3.1 - Estufa incubadora Revco, modelo Elite II.

Se congela parte de las células, se utilizó el protocolo de Congelamiento de células (anexo página 55), una de las botellas se traspasó a 1 botella de T-75, la que posteriormente al momento de llegar a confluencia fue traspasada a 4 botellas de T-25.

Se observaron las botellas T-25 con el microscopio invertido (marca Zeiss, modelo Axiovert 40 C) y se mantuvieron hasta llegar a una confluencia del 90%, para ello se debió realizar cambio de medio de acuerdo con el procedimiento de Mantenimiento y cambio

de medio (anexo en página 54). El medio de cultivo L-15 utilizado a concentraciones entre el 5% al 10% generó tasas de crecimiento elevadas llegando a la confluencia en un par días.

3.9.1. Inoculación de virus

La inoculación con virus en una placa de cultivo se realiza cuando esta última se encuentra con una elevada confluencia, superior al 90% de células que cubren la superficie de la placa.

Se temperan en el baño termorregulado a 37°C las soluciones que se utilizarán (L-15, SBF y PBS), se mantienen 15 minutos en el baño desde que se alcanza la temperatura. Todos los insumos por utilizar se irradian con luz UV dentro de la cabina de bioseguridad por al menos 5 minutos.-Se elimina el medio de cultivo de cada placa T-25 en un recipiente estéril y se lava la monocapa con aproximadamente 3 ml de PBS a 37°C moviendo las placas horizontalmente eliminando el líquido en el mismo recipiente estéril de desecho, se completaron 3 lavados para asegurar la completa eliminación de medio de cultivo. Inmediatamente se agregó 500 µl del inóculo de aspirado nasofaríngeo homogenizando durante 1 minuto, luego se introducen en la incubadora a 37°C durante un tiempo de 3 minutos para facilitar la infección viral. Luego, se agrega 10 ml de medio de cultivo L-15 al 10% rotulando correctamente las placas, y se incuban a 37° C en la estufa de cultivo. Se deja al menos 1 placa de control por cada inóculo. Las células se observan cada 24 horas.

Las placas de control consisten en un cultivo celular al cual se le realizan todo el procedimiento anterior, salvo la inoculación con una muestra viral, sino que se agrega medio de cultivo. Tiene por objetivo ser una referencia frente a un cultivo inoculado y permite determinar si los procedimientos se realizaron correctamente, pues si una placa control resulta contaminada con otro agente microbiológico, es muy probable que las placas inoculadas también lo estén.



Figura 3.2- Cabina de seguridad tipo IIA (marca Nuair, modelo NU-425-400E) utilizada en el laboratorio de virología. Todos los insumos que se utilizan se irradian con luz UV para reducir al mínimo el riesgo de contaminación de los cultivos.

3.9.2. Extracción de ácidos nucleicos

Se utiliza el kit de extracción “GeneJet Viral DNA/RNA Purification Kit” de Thermo Fisher Scientific™ y se siguen las recomendaciones del fabricante. Para iniciar el proceso se calienta el termoblock a 56° C, y se incuba el eluyente. A cada columna de extracción se le agrega 50 µl de líquido de preparación de columnas en el centro de la membrana.

3.9.2.1. *Lisis Celular*

Se agregó 200 µl de solución de lisis al tubo de 1,5 ml que contiene 5,5 µl de ARN Carrier y se mezcló resuspendiendo con la micropipeta. Luego se añadió 200 µl de muestra y 50 µl de proteinasa K, mezclando en el vórtex y luego se hizo un *spin down* para que las gotitas que pudieran estar en los bordes precipitaran. Se incubaron los tubos por 15

minutos en el termoblock (marca Benchmark, modelo Digital block) a 56° C mezclando en vórtex cada 1 minuto. Inmediatamente se centrifugó a máxima velocidad por 4 segundos. A continuación, se agregó 300 µl de etanol al 96% y se mezcló en el vórtex, incubando la muestra a temperatura ambiente durante 3 minutos y luego se centrifugó a máxima velocidad por 4 segundos, precipitando las gotas que se encuentran en las paredes del tubo.

3.9.2.2. *Extracción*

Se transfirió el lisado a la columna ya preparada, aproximadamente el contenido era de 800 µl. se centrifugó por 1 minuto a 8000 RPM, posteriormente se descartó el tubo recolector y el filtrado poniendo la columna en un tubo de recolección limpio. Se hicieron 3 lavados a la columna con distintas soluciones y a 8000 RPM y eliminando el tubo recolector: el primer lavado con 700 µl de solución de lavado 1, y las dos siguientes con 500 µl de solución de lavado 2. Posteriormente se realizó un paso de secado de columna, centrifugándola sin adicionar reactivo durante 3 minutos a máxima velocidad.

Luego la columna se introdujo en un tubo de 1,5 ml rotulado y se agregó 50 µl del eluyente a 56° C en el centro de la columna, se dejó incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 RPM por 1 minuto. Posterior a ello, se descartó la columna y el eluido del tubo se almacenó a -20° C.

3.9.3. **Reacción en cadena de la polimerasa**

Se utilizaron partidores específicos de regiones altamente conservadas de los virus VRS (glicoproteína F, que actúa como ligandos y se unen a receptores celulares con glicosamino-glicanos) y ADV (polipéptido IV, proteína trimérica que emerge al exterior), indicados en la tabla Tabla 3.1 y usó el mix de preparación estandarizado del laboratorio añadido en el anexo Tabla de preparación de mezcla para PCR (anexo en página 60). En la primera reacción a cada tubo se le añadió 5 µl de eluido y en la segunda reacción se añadió 2 µl del primer amplificado, como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas. La configuración de tiempo y temperatura se encuentra anexa en el capítulo 8.4 Configuración de termociclador (en página 61).

Tabla 3.1- Partidores utilizados para la detección de VRS y ADV.

Virus	Reacción	Nombre interno	Partidor	Secuencia
VRS	1° reacción	C	RSFAB1F	5'ATG GAG YTG CYR ATC CWC ARR RCA A
		E	RSF AB 51-	5'-AGG TGT WGT TAC ACC TGC ATT RAC AC
	2° reacción	H	RSF A 8+	5'-TTA TAC ACT CAA CAA TRC CAA AAA WA
		I	RSF B 112+	5'-ATCTTCCTA ACT CTT GCT RTT AAT GCA TTG
		L	RSA2F	5'-AAG GTT TAT GAA TTA TAC ACT CAA CAA
		M	RSFB133-	5'-GAT GCG ACA GCT CTG TTG ATT TAC TA
ADV	1° reacción	ADV1+	ADV 1F	5'-CAA CAC CTA YGA STA CAT GAA-3'
		ADV1-	ADV 1R	5'-KAT GGG GTA RAG CAT GTT-3'
	2° reacción	ADV2+	ADV 2F	5'-CCC ITT YAA CCA CCA CCG-3'
		ADV2-	ADV 2R	5'-ACA TCC TTB CKG AAG TTC CA-3'

Los productos finales de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 3% siguiendo el procedimiento de Preparación de geles de agarosa del laboratorio (anexo en página 65), a 75 mV durante 50 minutos como lo indica el protocolo de Protocolo de carga de geles (anexo en página 66) y se observaron con un transiluminador UV y de luz LED en el caso de ADV. Las imágenes fueron obtenidas con el equipo Xiaomi Redmi Note 4® y tratadas con el programa Paint 3D® de Microsoft ® para Windows 10®, se destaca que la edición sólo correspondió a recortar las zonas destacadas y a introducir texto dentro de ellas para mantener un orden.

3.9.4. Purificación

Para la purificación de productos de amplificación se utilizó el kit *Promega Wizard® Gel and PCR Clean-up System* y todos los reactivos utilizados en este proceso son parte del kit. Se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante.

Para esto se hizo un nuevo gel de agarosa al 3%, se adiciona el producto de amplificación, se dejó correr en la cámara de electroforesis a 75 mV durante 50 minutos. Se preparó un tubo eppendorf de 1,5 ml rotulado con el peso de este, y luego de cortar la banda de ADN se introduce dentro de este tubo para volver a ser pesado, de esta manera se obtiene el peso en mg de cada gel.

A cada tubo se le añadió 10 µl de *Membrane Binding Solution* por cada 10 mg de gel. Se hizo un vortex e incubó a 60°C hasta que el gel estuvo disuelto completamente. Se transfirió el contenido del gel disuelto en una minicolumna del kit con su respectivo tubo de recolección dejando incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Luego se centrifugó a 16.000 g por 1 minuto. Finalmente, la columna se introdujo en un tubo de recolección nuevo.

Se realizaron 2 lavados con *Membrane Wash Solution*, el primero con 700 µl y un centrifugado de 16.000 g por 1 minuto, y el segundo con 500 µl y un centrifugado de 16.000 g por 5 minutos, cuidando utilizar tubos de recolección limpios en cada paso. Posteriormente, se centrifugó la columna por 1 minuto a máxima velocidad y sin tapa de seguridad plástica para evaporar el etanol residual.

Posteriormente, la minicolumna se transfirió a un tubo de 1,5 ml debidamente rotulado. Se agregó 50 µl de *Nuclase-free Water* y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto para ser centrifugada a 16.000 g por 1 minuto. Se descartó la minicolumna y se almacenó el contenido a -20° C.

3.9.5. Secuenciación

Para la secuenciación, se seleccionaron al azar los productos purificados de PCR de las muestras positivas de VRS y de ADV (27 de VRS y 5 de ADV), estas fueron enviadas a la Unidad de Secuenciación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile.

Las secuencias resultantes fueron entregados de manera digital en formato ABI (Anexo 8.7, página 68), se utilizó el programa Chromas® versión 2.6.6 de la empresa Technelysium Pty Ltd©.

3.9.6. Análisis bioinformático

Se realizaron alineamientos de secuencias usando el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis © (MEGA) en su versión 10.0.5 (X) para Microsoft Windows® con los parámetros de referencia del programa. Las secuencias de referencia para los alineamientos fueron encontradas en la base de datos del GenBank© y fueron comparadas nucleotídicamente con la herramienta BLAST©. Se utilizaron los códigos de secuencias anexadas en el capítulo 8.8 (página 86).

Adicionalmente, se realizaron análisis genéticos para determinar las relaciones entre las secuencias encontradas en esta investigación, en comparación con las secuencias disponibles en GenBank©. Los dendrogramas fueron realizados por “*neighbor joining*” con análisis de “*Bootstrap*” de 1000 réplicas con el programa MEGA X© para determinar qué tan robustas son las relaciones.

3.9.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó estadística descriptiva, con creación de tablas y gráficos en hojas de cálculo del programa Microsoft Excel® (2019) del paquete de ofimática Office 365 usando un equipo bajo el sistema operativo Microsoft Windows 10®.

Capítulo 4: Resultados

4.1. Observación de cultivo celular

Se observó la confluencia de los cultivos celulares de línea HEP-2 en placas T-25. El margen de confluencia varió entre un 90% a 100% de superficie ocupada como se muestra en la Figura 4.2. Una vez inoculadas con virus se observaron cada 24 horas para ver efectos citopáticos, pasadas 48 horas se observaron cambios en la morfología celular, espacios vacíos en la placa, lo que evidencia muerte celular y adoptando una disposición redondeada a diferencia de la forma fusada de células normales.

ATCC Number: **CCL-23**
Designation: **HEp-2**

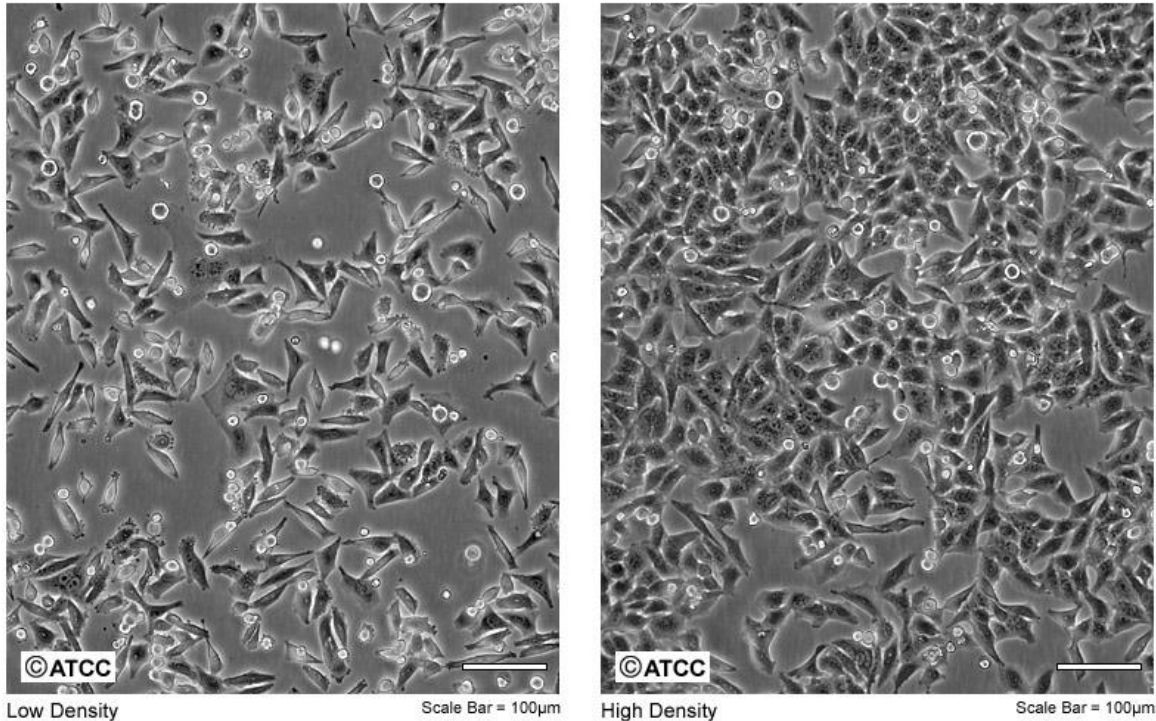


Figura 4.1- Células HEP-2 normales, a la izquierda de baja densidad, a la derecha de baja densidad (36). Fuente: ATCC, proveedora de células e insumos de biología molecular.

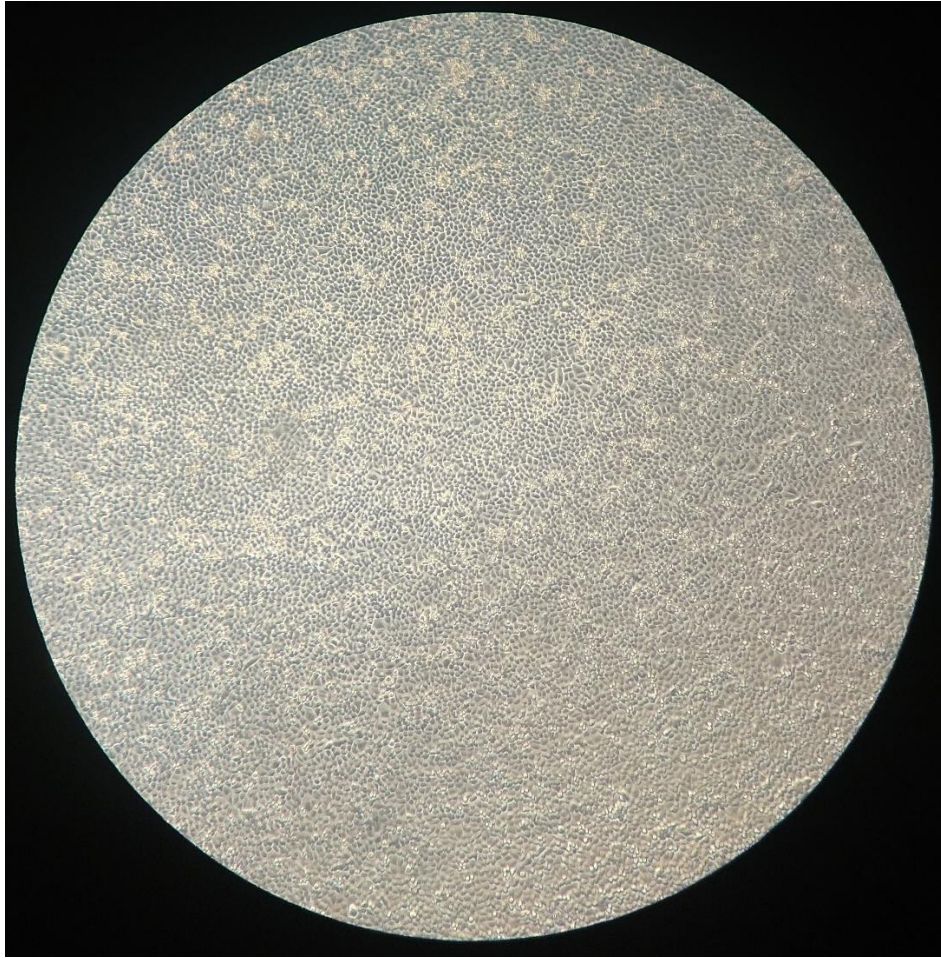


Figura 4.2- Confluencia cercana al 100% de línea celular HEP-2 con medio de cultivo L-15, con aumento de 2.5X.

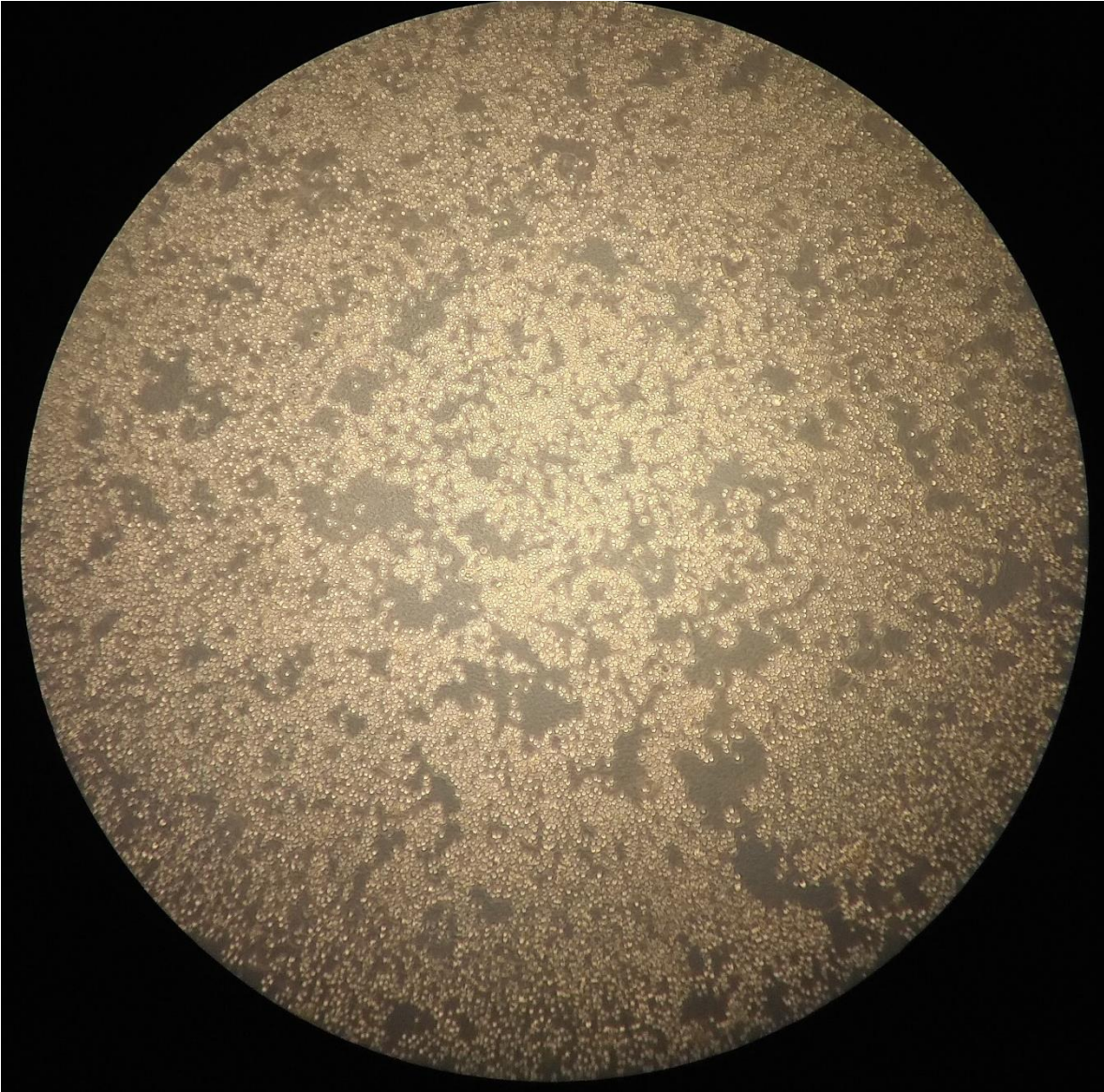


Figura 4.3- Células HEP-2 después de 48 horas de inoculadas con adenovirus, con aumento de 2.5X.

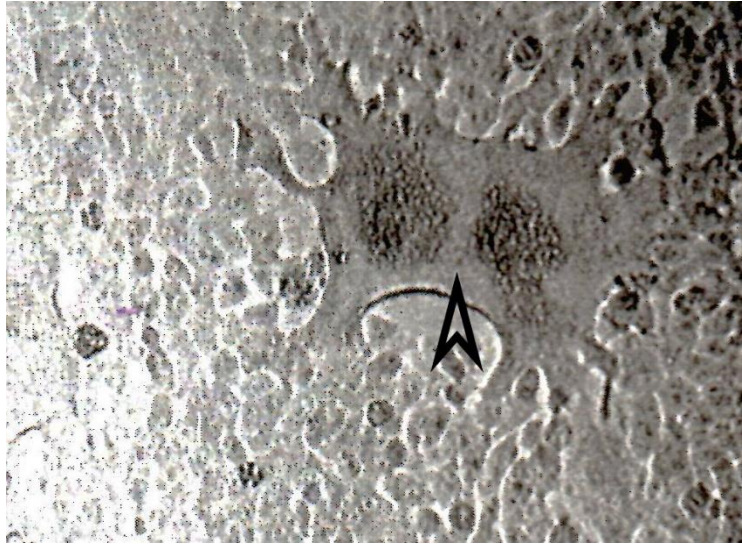


Figura 4.4- Formación del sincicio (punta de flecha) en cultivo inoculado con virus respiratorio sincicial luego de 72 horas con máximo aumento del equipo, con aumento de 10X.

A los 7 días de la inoculación del virus, se observa una cantidad importante de células inviables (Figura 4.5) y las células sobrevivientes son minoritarias.

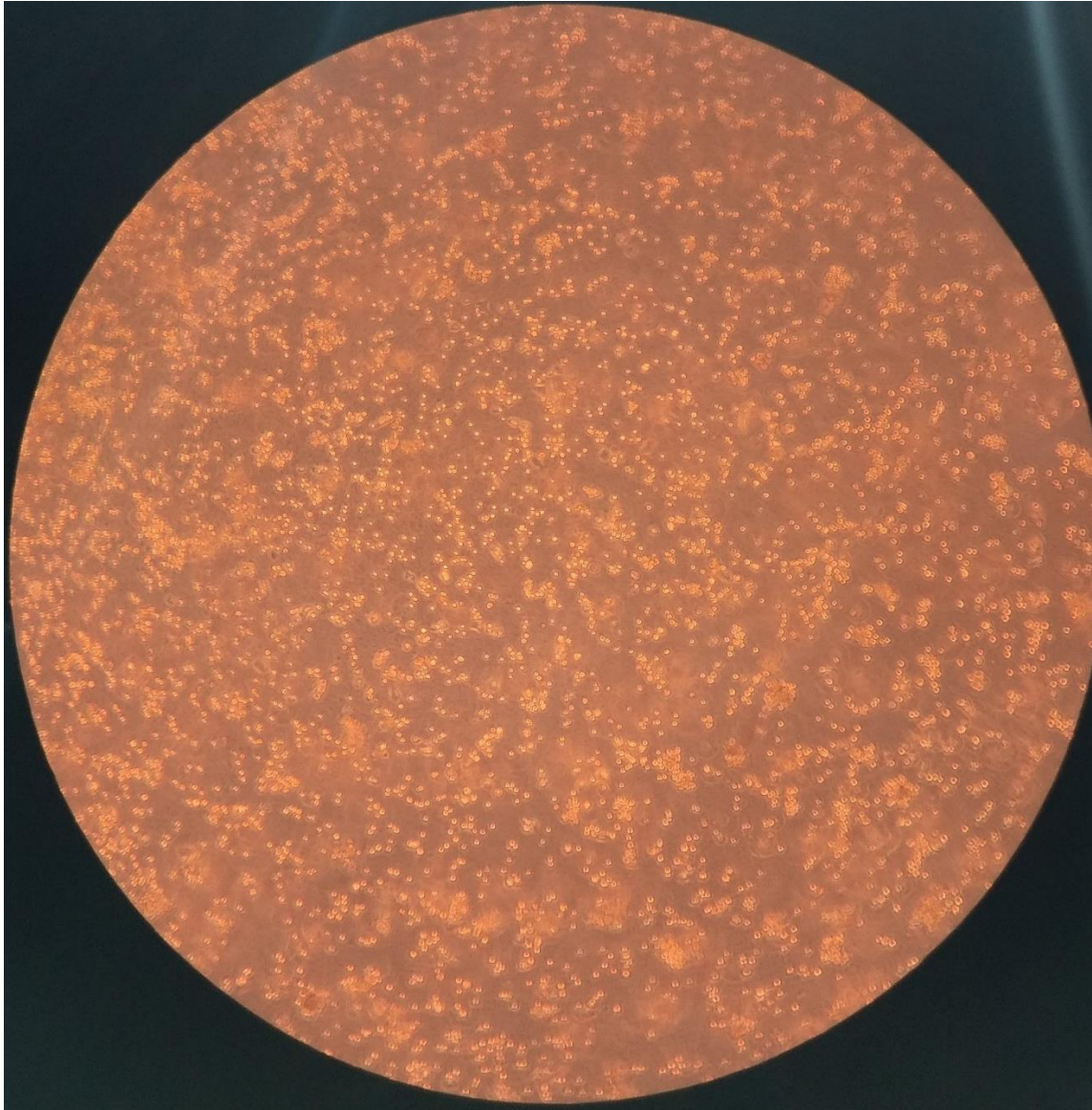


Figura 4.5- Células HEP-2 luego de 7 días de inoculación con adenovirus. Las células de cultivo pierden adherencia a la placa con facilidad, con aumento de 2.5X.

4.2. Producto PCR y electroforesis

Se procesaron en total 54 casos almacenados y diagnosticadas en el año 2017 con presencia viral, en las que se detecta presencia de ácido nucleico las cuales 4 contenían ADV, 6 una coinfección de ADV y VRS A, 1 con una coinfección de ADV y VRS B, 24 con VRS A, 14 con VRS B y 5 con una coinfección de VRS A y VRS B, como se resume en Tabla 4.1.

Tabla 4.1- Resumen de casos procesados.

Virus	Casos procesados
ADV	4
ADV / VRS A	6
ADV / VRS B	1
VRS A	24
VRS B	14
VRS A / VRS B	5
TOTAL	54

Ordenando los datos con detección individual de los virus ADV, VRS A y VRS B independiente de la coinfección se realizaron 66 análisis obteniendo: 11 muestras con ADV, 35 con VRS A y 20 de VRS B, como se grafica en Figura 4.6. Las cuales al procesar por PCR y separadas por electroforesis se confirmó que 47 eran positivas y 19 negativas como se observa en Figura 4.7 y de estas: 9 eran positivas a ADV y 2 negativas, 23 positivas a VRS A y 12 negativas y 15 eran positivas a VRS B y 5 negativas como se resume en el Figura 4.8.

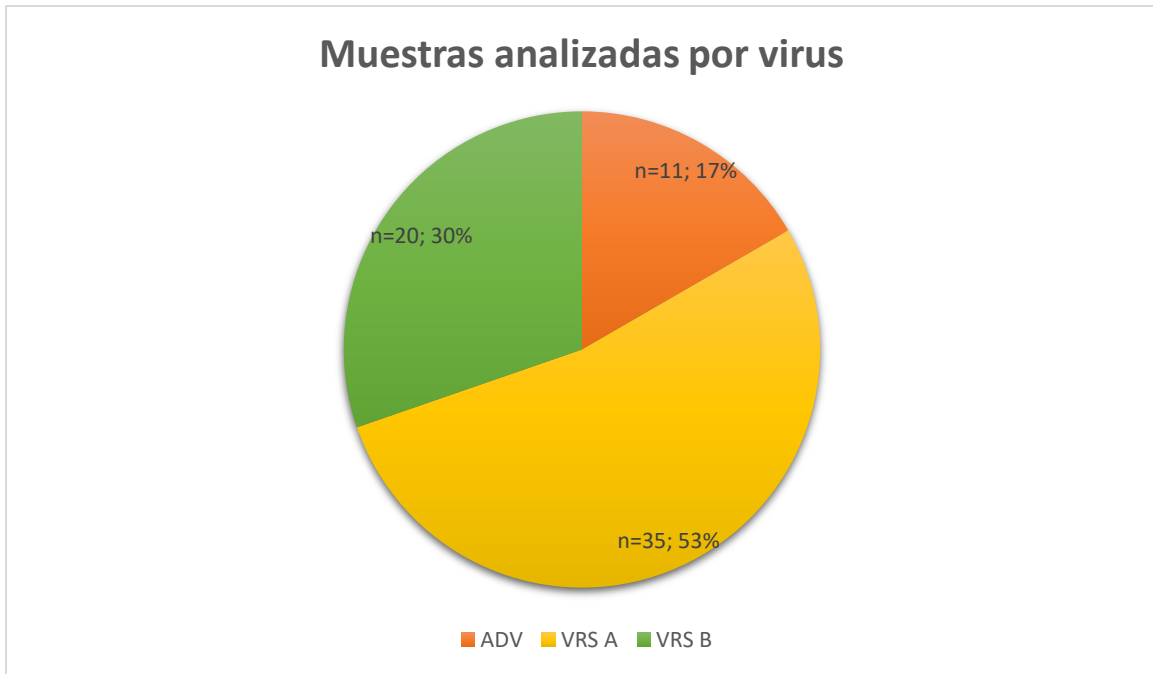


Figura 4.6 Gráfico circular de muestras analizadas por tipo de virus.

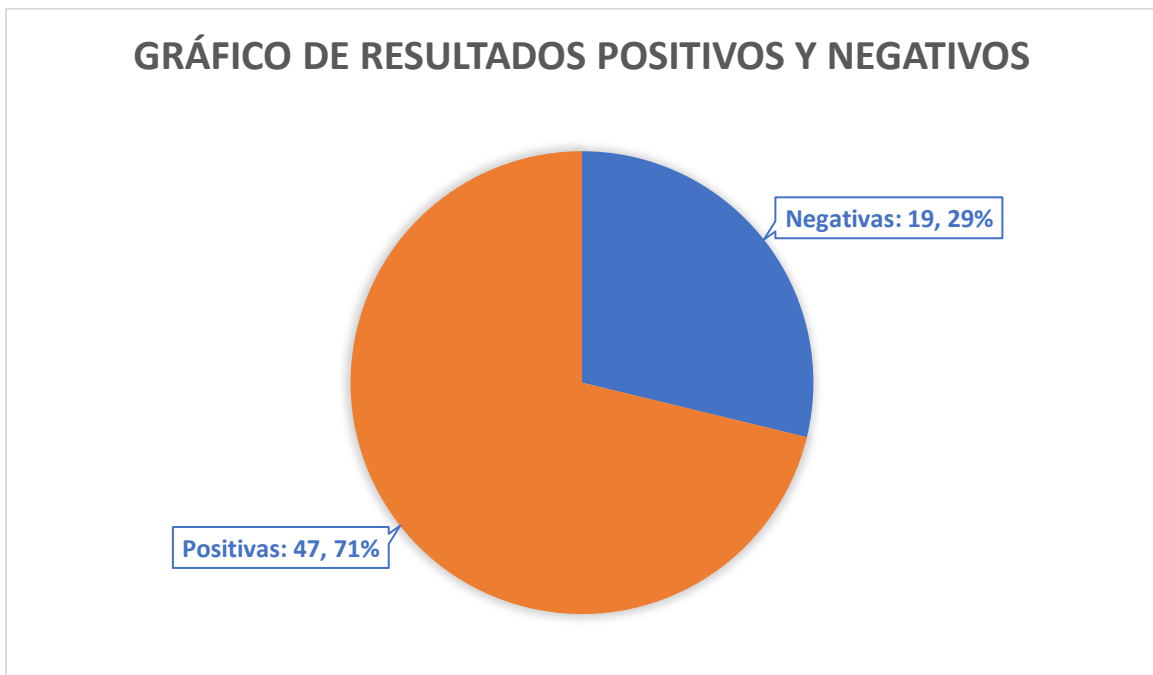


Figura 4.7 Gráfico circular de resultados con desglose de los resultados positivos.

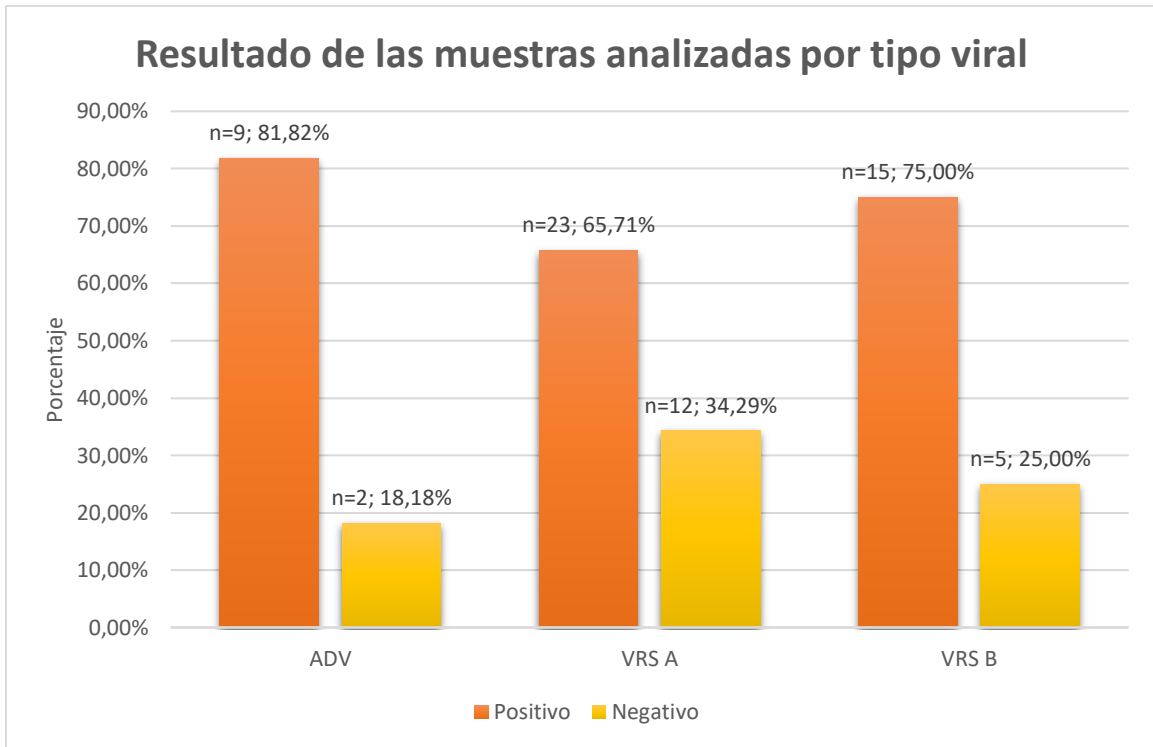


Figura 4.8 Gráfico de barras de los resultados por tipo viral.

Las figuras Figura 4.9 y Figura 4.10 muestran geles de agarosa en donde se observan las bandas correspondientes a productos de PCR para VRS y ADV respectivamente.

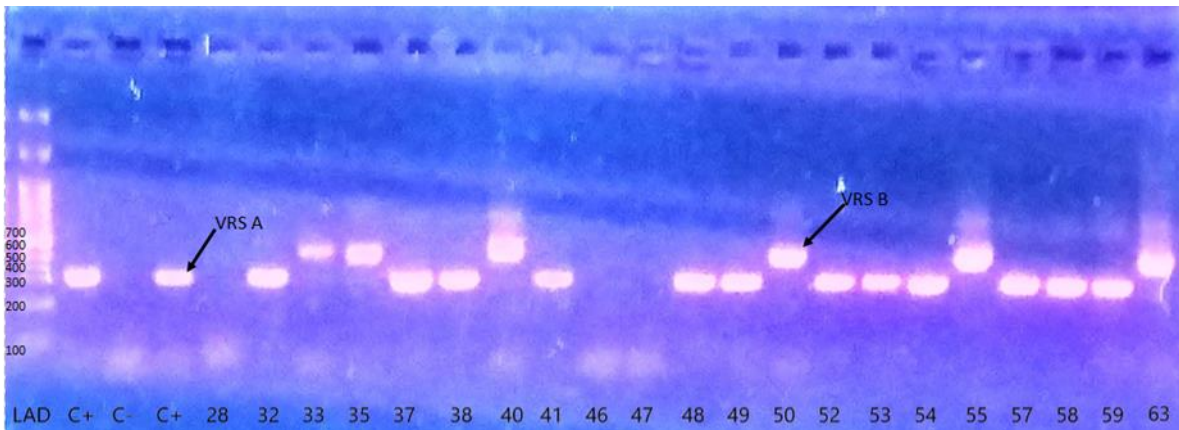


Figura 4.9- Productos de amplificación de VRS. En el carril identificado como LAD, se usó un marcador molecular de 100 pb; se observan bandas positivas para VRS A de 363 pb en carriles 1, 3, 5, 8, 9, 11, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22 y 23; VRS B de 661 pb en carriles 6, 7, 10, 16, 20 y 24; y negativo a presencia de ácido nucleico viral en 2, 4, 12 y 13.

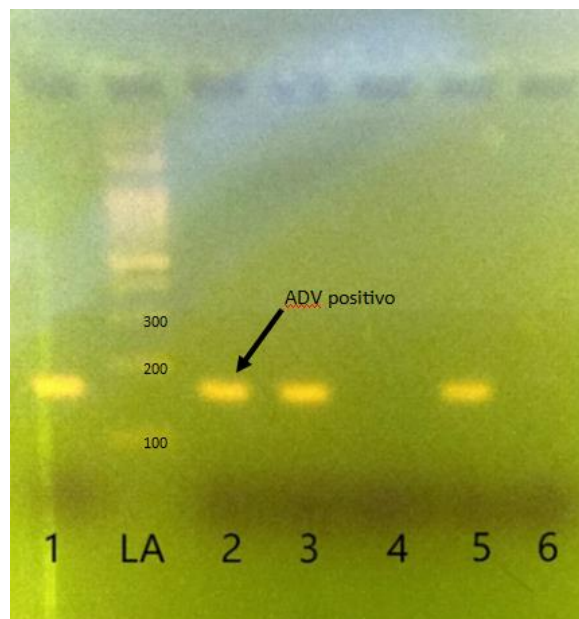


Figura 4.10- Productos de amplificación de ADV de 168 pb., en el carril identificado como LA se usó un marcador molecular de 100pb; se observan bandas positivas en carriles n° 1, 2, 3 y 5; negativo en 4 y 6.

4.3. Secuenciación de muestras positivas

La información obtenida de la secuenciación se almacenó en archivos binarios en formato abi, de propiedad de Applied Biosystems®. Las secuencias obtenidas se encuentran en el anexo 8.7 Secuencias de muestras positivas en la página 68.

4.4. Secuencias consenso

Luego del alineamiento de las secuencias se obtuvieron las secuencias consenso como se muestran en la Tabla 4.2 y Tabla 4.3.

Tabla 4.2- Secuencias consenso de VRS.

Muestra	Secuencia	Tamaño de secuencias
VRS 01	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 05	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 10	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 11	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACAGCAGAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 13	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC	233 pb

Muestra	Secuencia	Tamaño de secuencias
	AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCCAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	
VRS 14	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCCAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 16	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCCAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 24	ATTTCTTGGATTTTTGTTAGGTGTTGGATCTGCAATCGCCAGTGGCATTGCCGTATCCAA GGTCCTGCACCTAGAAGGTTTGGGAAGTGAACAATAAATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGCCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCCAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAAAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 31	ATTTCTTGGATTTTTGTTAGGTGTTGGATCTGCAATCGCCAGTGGCATTGCCGTATCCAA GGTCCTGCACCTAGAAGGTTTGGGAAGTGAACAATAAATCAAAAAGTGCTCTACTATCCAC AAACAAAGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCAGTGTCTTAACCAGCAAGGTGCTAG ACCTCAAAAATATATAGATAAACAGTTGTTACCTATTGTTAACAAGCAAAGCTG	233 pb
VRS 32	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC	233 pb

Muestra	Secuencia	Tamaño de secuencias
	AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCAGCAGAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	
VRS 33	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTGGAAAGTGAACAATAAATCAAAAGTGCTCTACTATCCAC AAACAAGGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCAGTGTCTTAACCAGCAAGGTGCTAG ACCTCAAAAACCTATATAGATAAACAGTTGTTACCTATTGTTAACAAGCAAAGCTG	233 pb
VRS 35	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATTGCCGTATCCAA GGTCCTGCACCTAGAAGGTTTGGAAAGTGAACAATAAATCAAAAGTGCTCTACTATCCAC AAACAAGGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCAGTGTCTTAACCAGCAAGGTGCTAG ACCTCAAAAACCTATATAGATAAACAGTTGTTACCTATTGTTAACAAGCAAAGCTG	233 pb
VRS 37	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCAGCAGAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 41	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAAATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACA AACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCAGCAGAGTTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 53	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC	233 pb

Muestra	Secuencia	Tamaño de secuencias
	AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	
VRS 54	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGCATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 55	ATTTCTGGGCTCTCTACTAGTCTGTTGTTCTTTTGTGGAACTCGTATCACAGTATTCAAT GTTTGATATGCTGCAGCTTTGCTTGTTAACAATAGGTAACAACCTGTTTATCTATATAGTT TTTGAGGTCTAGCCAACCTTGCTGGTTAAGACACTGACTCCATTATATAAGCTGACTACA GCTTTGTTTGTGGATAGTAGAGCACTTTTGATTTTGTTCCTTCCCCTTCTA	233 pb
VRS 57	ATTTCTAGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTGCACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 58	ATTTCTAGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTGCACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCAAGTAAATCAACAGAGCTGT	233 pb
VRS 59	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC	233 pb

Muestra	Secuencia	Tamaño de secuencias
	AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACAGCAGAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	
VRS 60	ATTTCTAGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTGCACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 63	TCTCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGTTGTTCTTTTGTGGAACTCGTATCACAGTATTCAAT GTTTGATATGCTGCAGCTTTGCTTGTTAACAATAGGTAACAACCTGTTTATCTATATAGTT TTTGAGGTCTAACCAACCTTGCTGGTTAAGACACTGACTCCATTAAATAAGCTGACTACA GCCTTGTTTGTGGATAGTAGAGCACTTTTGATTTTGTTCACTTCCCCTTCTA	233 pb
VRS 72	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCCGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACAGCAAAGTTTAGA TCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTGT	233 pb
VRS 84	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 85	ATTTCTTGGATTTTGTAGGTGTTGGATCTGCAATCGCCAGTGGCATTGCCGTATCCAA GGTCCTGCACCTAGAAGGTTTGGAAAGTGAACAATAAATCAAAGTGCTCTACTATCCAC	233 pb

Muestra	Secuencia	Tamaño de secuencias
	AAACAAAGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCAGTGTCTTAACCAGCAAGGTGCTAG ACCTCAAAAACCTATATAGATAAACAGTTGTTACCTATGTTAACAAGCAAAGCTGC	
VRS 87	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCAGCAGAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb
VRS 88	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAA AGTTCTACACCTTGAAGGTTTAGAAGTGAACAATAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTAC AAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCAGCAAAGTGTTAG ATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG	233 pb

Tabla 4.3- Secuencias consenso de ADV.

Muestra	Secuencia	Tamaño de secuencias
ADV 13	CGCTACCGCTCCATGTTGCTGGGCAACGGTCGCTACGTGCCCTTTCACATCCAGGTT CCTCAGAAGTTTTTTGGCATTAAAGAACCTCCTATCTCTTGCC	99 pb
ADV 17	CGTTACCGCTCCATGTTGTTGGGAAACGGCCGCTACGTGCCTTTCACATTCAGGTG CCCCAAAAGTTTTTTGGCATTAAAAACCTCCTCTCTCCGCCA	99 pb
ADV 27	CGCCCCGGCTTAATGTTGCTGGGCAATGGTCGCTATGTGCCCTTCCACATCCAGGTG CCTCAGAAGTTCCTTTGGCATTAAAAACCTCCTTTCTCCTGCC	99 pb
ADV 52	CGCTACCGCTCCATGTTGCTGGGCAACGGTCGCTACGTGCCCTTTCACATCCAGGTT CCTCAGAAGTTTTTTGGCATTAAAGAACCTCCTATCTCTTGCC	99 pb
ADV 83	CGCTACAGGTCCATGCTTCTGGGAAATGGTCGTTATGTGCCTTTCACATAACAAGTG CCTCAAAAATTCTTTGCTGTCAAAAACCTACTCTCTACTGTC	99 pb

4.5. Análisis de similitud de secuencias

Una vez realizado en análisis bioinformático se obtuvieron los dendogramas como se muestra en la Figura 4.11, Figura 4.12 y Figura 4.13.

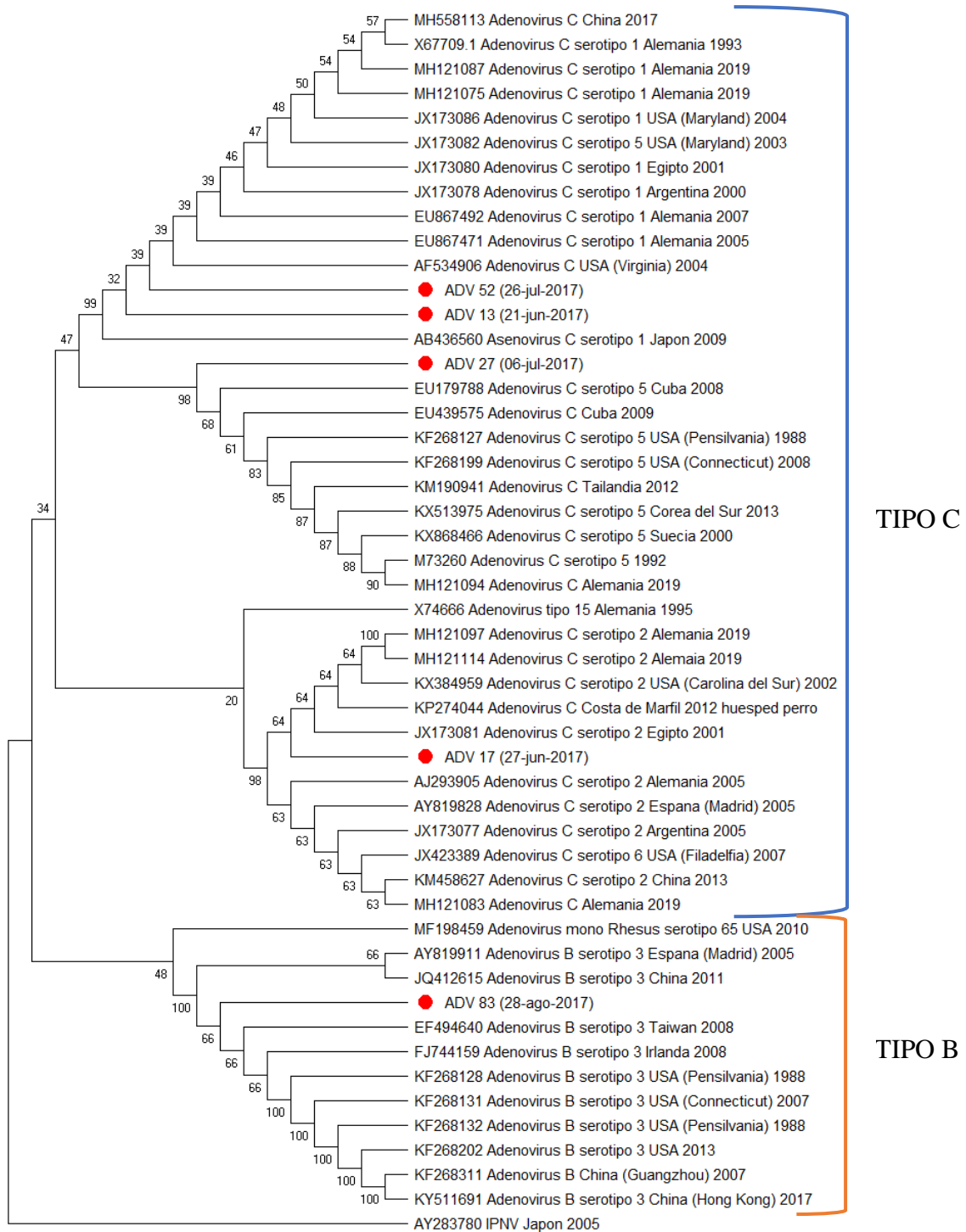


Figura 4.11- Dendrograma obtenido del análisis de las muestras secuenciadas de ADV con el programa Mega X© usando el algoritmo “neighbor-joining” y un bootstap de 1000 réplicas.

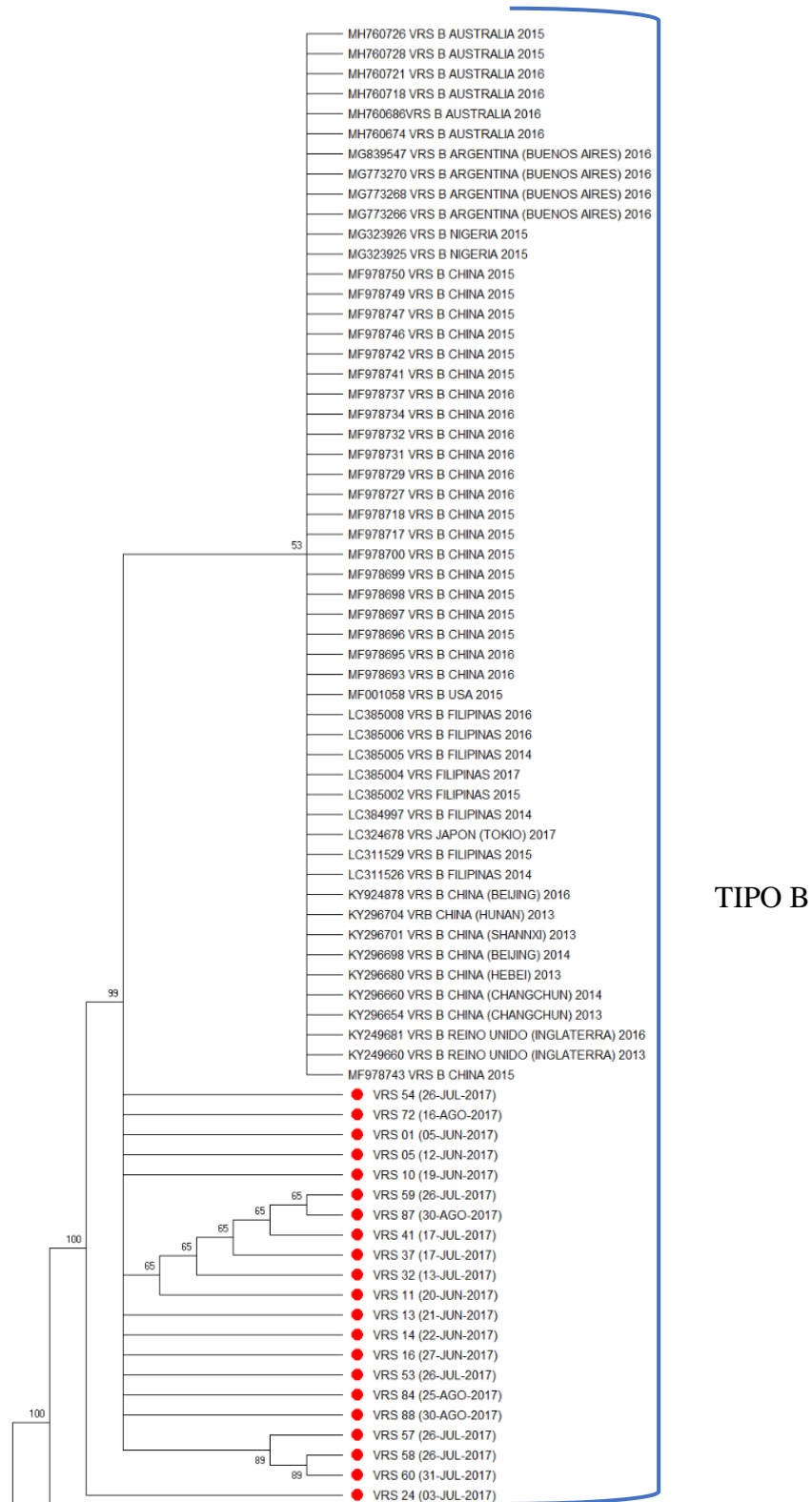


Figura 4.12- Dendrograma obtenido del análisis de las muestras secuenciadas de VRS con el programa Mega X© usando el algoritmo “neighbor-joining” y un bootstap de 1000 réplicas. Primera parte (continúa en imagen siguiente).

Capítulo 4: Resultados

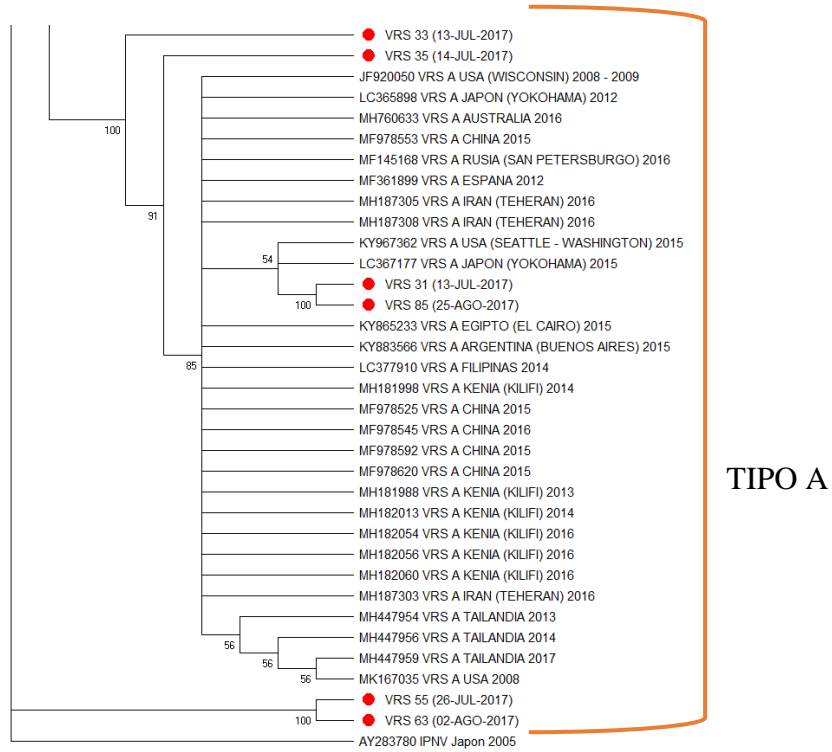


Figura 4.13- Dendrograma obtenido del análisis de las muestras secuenciadas de VRS con el programa Mega X© usando el algoritmo “neighbor-joining” y un bootstap de 1000 réplicas. Segunda parte (continúa de imagen anterior).

Capítulo 5: Discusión

5.1. Cultivo celular

Las células HEp-2 mostraron su morfología característica en los cultivos celulares realizados, que corresponde a una forma fusada, pero al ser inoculadas con las muestras respiratorias estudiadas se observó muerte celular y la aparición de algunas formas que facilitan el diagnóstico diferencial por efecto citopático viral como indica Koneman (31). En el caso del adenovirus, se observaron células aumentadas de volumen y agrupadas, formando un entramado o “racimos de uvas”.

En cultivos infectados con virus respiratorio sincicial se observaron células con aumento de tamaño, generación de sincicios gigantes o células multinucleadas y células redondas y granulosas. Estas descripciones concuerdan con lo descrito en manuales de diagnóstico viral (29). A pesar de aportar información importante para el diagnóstico viral, el diagnóstico diferencial por efecto citopático por sí solo no es absolutamente certero, pues existen múltiples causas que podrían aumentar la tasa de mortalidad celular, desde errores en la manipulación de los cultivos, contaminación de insumos o la posibilidad de una coinfección viral o por hongos.

El uso de cultivos celulares permite aumentar el número de partículas de virus presentes en una muestra aumentando la probabilidad de tener “virus vivos”. Los laboratorios de diagnóstico han reemplazado las técnicas tradicionales por técnicas moleculares que son altamente específicas y sensibles (6). Desde el año 2000 se debatía si abandonar o no el aislamiento viral a través de cultivos celulares por completo, que si bien es lento puede proporcionar datos epidemiológicos importantes, diagnóstico por virus atípicos y una provisión de aislados para estudios y ensayos (37). Una opinión similar tiene la viróloga de la Universidad de Edimburgo Dra. Marie Ogilvie, con la que concuerdo, que apela a que un laboratorio con técnicas de cultivo celular proporciona mayor calidad al servicio permitiendo mantener los controles para estandarizar nuevas metodologías, por ejemplo (38).

Existen varias líneas celulares que podrían haberse usado, la elección de una no es algo que deba tomarse a la ligera. Deben considerarse factores como afinidad por una línea celular del virus, la tasa de reproducción, los días necesarios para el aislamiento, el medio de

cultivo más adecuado y el costo de mantención. El análisis realizado determinó que la línea celular más adecuada era HEp-2, por otras como PMK o A549, principalmente por su alta afinidad al adenovirus y virus respiratorio sincicial (29,30,32).

5.2. PCR

La PCR es una técnica que ha demostrado una alta sensibilidad para el diagnóstico de infecciones respiratorias causadas por virus. Rabagliati *et al.* en 2007 evaluaron el uso de PCR (en tiempo real) en infecciones por VRS, demostrando que se duplicó la detección en comparación el uso de inmunofluorescencia indirecta (IFI), recomendando esta técnica en periodos de alta circulación viral (39). Casiano *et al.* en 2003 determinó que junto con la serología, la PCR es más sensible que la detección de antígenos y cultivos celulares (40). En un estudio de Larrañaga *et al.* realizado en Chile, la PCR tuvo una sensibilidad más alta (98,7%) en comparación con el aislamiento viral (90%) y la inmunofluorescencia (50%) y facilitó la identificación de forma más fácil y precisa que el polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), con un 91,6% contra un 55,8% (41). La inmunofluorescencia es altamente utilizada, pero a pesar de ser más rápida es menos sensible.

La utilización de PCR anidada o *nested* incrementa la sensibilidad de manera considerable, pues comprende dos rondas de amplificación de distintos pares iniciadores (42). Primero, una reacción con iniciadores externos para amplificar una región más extensa de ADN, que contiene el segmento diana. Luego, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR, con iniciadores internos que amplifican una región específica. Un aumento de la sensibilidad conlleva a un aumento de los costos que los laboratorios deben considerar.

En los resultados se obtuvo un porcentaje de muestras negativas en referencia al primer estudio (18,18% para ADV, 34,29% para VRS A y 25% para VRS B) que pueden explicarse al daño que puede provocar los ciclos de congelación y descongelación en el material genético viral, ya que las muestras no se almacenaron con ningún tipo conservantes.

Los resultados positivos correspondieron a un 81,82% para ADV, 65,71% para VRS A y 75% para VRS B. Estos resultados concuerdan con los obtenidos de estas mismas

muestras en estudios de 2017. Esto demuestra que no existieron contaminaciones de por medio y confirma la reproducibilidad de esta técnica.

Durante el año 2017, se registraron 7342 casos de VRS y 932 de ADV confirmados por el ISP. Con un aumento de 182 casos de VRS y 98 casos menos de ADV en comparación con el año 2016. El Instituto de Salud Pública no determina el grupo de estas infecciones (43).

Desde el punto de vista de eficiencia de recursos, la técnica es eficaz para obtener diagnósticos inclusive en el mismo día de ser recepcionada la muestra desde el centro de salud, impactando positivamente en un diagnóstico precoz y definitivo que oriente al clínico. Es importante considerar el costo, pues los epítomos a identificar deben ser altamente conservados para que los cebadores específicos los reconozcan, de otro modo, los falsos positivos podrían guiar erróneamente al equipo de salud.

5.3. Bioinformática

Un dendrograma es una representación gráfica en forma de árbol que permite apreciar las relaciones de agrupación entre los datos, en este caso las secuencias a comparar.

En nuestras representaciones el porcentaje de coincidencia no bajó del 95%, un porcentaje de coincidencia alto, evidenciando que las proteínas de fusión del adenovirus y del virus respiratorio sincicial son altamente conservadas.

De los dendrogramas obtenidos, el de adenovirus resultó ser el de porcentaje de confianza de mayor. Llama la atención que el orden cronológico de las muestras está relacionado con un tipo de adenovirus, lo que indicaría que en los primeros meses de la temporada invernal predominaría el tipo C, y al final del periodo prevalece el tipo B. La distribución mundial de este virus se confirma al tener virus de referencia similares mediante BLAST de los cinco continentes. Sin duda, el flujo de personas que viaja a distintas partes del mundo es una forma de distribuir virus, por tanto, la vigilancia epidemiológica debe ser una prioridad de las autoridades sanitarias. La literatura nacional, indica que existe un predominio de los serotipos 7, 2 y 1 en pacientes que han requerido hospitalización, siendo el que más complicaciones produciría el serotipo b7h con cerca del 50% de los casos (44), relación ratificada en un estudio de infecciones nosocomiales en el Hospital de Niños Dr.

Roberto del Río, donde la letalidad del serotipo 7h fue de un 16,6% (41), aunque faltan estudios más actualizados, ya que estos datan de artículos publicados hace más de 10 años.

En el caso del árbol de VRS, la distribución de las variantes A y B analizadas se mantienen a lo largo de la temporada, con un predominio del tipo B. Del total de muestras analizadas, 21 son VRS B y 6 VRS A. Los estudios previos confirman que el grupo más prevalente en Chile es el VRS B (45). Es importante destacar que dos secuencias del tipo A (VRS 55 y VRS 63), se alejan de la asociación con el resto y tienen un porcentaje de similitud entre ellas del 100%, lo que podría indicar mutaciones virales o variantes propias de la zona, para determinar eso se requieren mayores estudios.

La distribución mundial del virus respiratorio sincicial es coincidente con el dendrograma que obtuvimos con nuestros resultados. Ninguna de las secuencias obtenida mediante BLAST fue anterior al año 2008, este dato podría indicar que el virus no varía demasiado con el paso del tiempo, siendo estable para estudiar.

Al comparar nuestras secuencias con la base de datos de BLAST no se encontró información de secuencias chilenas para ADV como para VRS, el conocimiento de la epidemiología molecular aporta información valiosa para toma de decisiones clínicas y medidas de salud pública. Por tanto, es importante que existan más estudios en esta línea que entreguen información de circulación locales y nacionales de virus que tienen un importante impacto en la salud pediátrica de nuestro país.

Capítulo 6: Conclusión

- A través de la técnica de cultivo celular se logró una amplificación exitosa de los virus respiratorios estudiados.
- A través de la técnica de PCR se logró identificar al VRS con un mayor predominio en el periodo estudiado.
- Por medio de la secuenciación podemos decir que existe un predominio de ADV subgénero C en la primera parte de la temporada invernal del año 2017. Al final del periodo invernal 2017 prevalece el ADV subgénero B.
- Las variantes A y B de VRS permanecen a lo largo de la temporada, no evidenciando un predominio particular.
- De acuerdo con el análisis de secuencias a través de los dendrograma se observó una elevada similitud con secuencias existentes en otras partes del mundo.

Capítulo 7: Bibliografía

1. Avendaño L. Infecciones virales respiratorias. En: Avendaño Carvajal LF, Ferrés Garrido M, Luchsinger Farías V, Spencer Ossa E, editores. *Virología clínica*. Segunda ed. Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo; 2018. p. 127–50.
2. Prieto Herrera ME, Russ Durán G, Reitor Landrian L. Factores de riesgo de infecciones respiratorias agudas en menores de 5 años. *Rev Cuba Med Gen Integr*. 2000;16(2):160–4.
3. Chnaiderman J. Replicación viral. En: Avendaño Carvajal LF, Ferrés Garrido M, Luchsinger Farías V, Spencer Ossa E, editores. *Virología clínica*. Segunda ed. Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo; 2018. p. 33–41.
4. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología Médica*. Octava ed. Barcelona España: Elsevier España; 2016. 836 p.
5. Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Shalka AM. *Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control*. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 2000. 804 p.
6. Shors T. *Virus: estudio molecular con orientación clínica*. Primera ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2009. 668 p.
7. Spencer Ossa E. Estructura y clasificación viral. En: Avendaño Carvajal LF, Ferrés Garrido M, Luchsinger Farías V, Spencer Ossa E, editores. *Virología clínica*. Segunda ed. Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo; 2018. p. 21–31.
8. Urcuqui S, Ossa J. Historia de la virología y características generales de los virus. En: Urcuqui S, Ossa J, editores. *Principios de virología*. Cuarta ed. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquía; 2008. p. 9–17.
9. Urcuqui S, Haenni A-L. Nominación y clasificación de los virus de los vertebrados. En: Urcuqui S, Ossa J, editores. *Principios de virología*. Cuarta ed. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquía; 2008. p. 19–28.

Capítulo 7: Bibliografía

10. Baltimore D. Expression of Animal Virus Genomes. Vol. 35, BACTERIOLOGICAL REVIEWS. 1971.
11. Rodas J. Estrategias de replicación viral. En: Urcuqui S, Ossa J, editores. Principios de virología. Cuarta ed. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquía; 2008. p. 61–70.
12. Swiss Institute of Bioinformatics. Baltimore classification [Internet]. ViralZone. Disponible en: <https://viralzone.expasy.org/254>
13. Lefkowitz EJ. Taxonomy and Classification of Viruses. En: Jorgensen J, Pfaller M, editores. Manual of Clinical Microbiology. 11 ed. Washington D.C.: American Society of Microbiology; 2015. p. 1393–404.
14. Rodas J. Bases de la replicación viral. En: Urcuqui S, Ossa J, editores. Principios de virología. Cuarta ed. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquía; 2008. p. 47–60.
15. Cabrera Roca G, Domínguez Ortega F, Lafarga Capuz B, Calvo Rosales J. Estudio clínico-epidemiológico de la infección por virus respiratorio sincitial en el lactante. An Españoles Pediatría. 1997;46(6):576–80.
16. Instituto de Salud Pública de Chile. Informe de Circulación de Virus Respiratorios semana 29. Santiago de Chile; 2017.
17. World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. Mathers C, Fat DM, Boerma JT, World Health Organization, editores. Ginebra, Suiza: World Health Organization; 2008. 146 p.
18. Lozano C J, Yáñez P L, Lapadula A M, Lafourcade E R M, Burgos F F, Budnik O I, et al. Infecciones respiratorias agudas bajas en niños: Estudio etiológico prospectivo. Rev Chil enfermedades Respir. 2008;24(2):107–12.
19. Avendaño C. LF, Palomino MA, Larrañaga C. Surveillance for respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory infection in Chile (1989 to 2000). J Clin Microbiol. 1 de octubre de 2003;41(10):4879–82.
20. Groothuis JR, Simoes EA, Hemming VG, Dobson S, Jumaah S al, Stephens D, et al.

Capítulo 7: Bibliografía

- Respiratory syncytial virus (RSV) infection in preterm infants and the protective effects of RSV immune globulin (RSVIG). Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Study Group. *Pediatrics*. 1 de abril de 1995;95(4):463–7.
21. Meert K, Heidemann S, Lieh-Lai M, Sarnaik AP. Clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections in healthy versus previously compromised host. *Pediatr Pulmonol*. 1989;7(3):167–70.
 22. Imaz MS, Sequeira MD, Videla C, Veronessi I, Cociglio R, Zerbini E, et al. Clinical and epidemiologic characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fe, Argentina. *J Med Virol*. 1 de mayo de 2000;61(1):76–80.
 23. McConnochie KM, Hall CB, Walsh EE, Roghmann KJ. Variation in severity of respiratory syncytial virus infections with subtype. *J Pediatr*. julio de 1990;117(1 Pt 1):52–62.
 24. Palomino M. MA, Larenas A. J, Moraga A. G, Avendaño C. LF. Severidad clínica de la infección respiratoria aguda baja primaria por virus respiratorio sincicial grupos A y B. *Rev Chil pediatría*. octubre de 2004;75:18–24.
 25. Palomino MA, Avendaño C. LF. Infecciones respiratorias por VRS y adenovirus en Chile: qué hemos aprendido en 14 años de vigilancia epidemiológica. *Pediatría (Santiago de Chile)*. 2003;46:38–47.
 26. Pigiet V. *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*. Robert J. Kuchler. Vol. 53, *The Quarterly Review of Biology*. Stroudsburg, USA: Dowden, Hutchinson and Rodd, Inc.; 2004. 159–160 p.
 27. Castaño M. Cultivos celulares. En: Urcuqui S, Ossa J, editores. *Principios de virología*. Cuarta ed. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquía; 2008. p. 29–46.
 28. Freshney R. Primary Culture. En: *Culture of Animal Cells*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. p. 163–86.
 29. Herrero Uribe L, Ávila Arias R, Corrales Aguilar E, Hun Opfer L. *Procedimientos en virología médica*. 1° edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica, editor. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica; 2004. 178 p.

Capítulo 7: Bibliografía

30. Ginocchio CC, Van Horn G, Harris P. Reagents, Stains, Media, and Cell Cultures: Virology. En: Jorgensen JH, Pfaller MA, editores. *Manual of Clinical Microbiology*. 11 ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology Press; 2015. p. 1422–31.
31. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color*. 6° ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. 1691 p.
32. Ferrés M. Diagnóstico viral. En: Avendaño Carvajal LF, Ferrés Garrido M, Luchsinger Farías V, Spencer Ossa E, editores. *Virología clínica*. Segunda ed. Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo; 2018. p. 85–98.
33. Nolte FS. Molecular Microbiology. En: Jorgensen J, Pfaller MA, editores. *Manual of Clinical Microbiology*. 11 ed. Washington D.C.: American Society of Microbiology Press; 2015. p. 54–90.
34. González N, Zavala J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En: *Manual de técnicas básicas de biología molecular*. Mérida, Yuc.: Universidad Autónoma de Yucatán; 2005. p. 117–21.
35. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Secuenciación de genomas y caracterización genética del virus de la influenza | Influenza (gripe) estacional | CDC [Internet]. 2017 [citado 2 de abril de 2018]. Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/professionals/laboratory/genetic-characterization.htm>
36. ATCC. HEp-2 ATCC ® CCL-23™ Homo sapiens HeLa contaminant Carcinoma [Internet]. [citado 15 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-23.aspx#characteristics>
37. Ávila Adarme LV, Castellanos JE. Diagnóstico virológico de la infección por virus sincitial respiratorio. *Rev Salud Bosque*. 8 de agosto de 2015;3(1):23.
38. Ogilvie M. Molecular techniques shouldn't now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Rev Med Virol*. noviembre de 2001;11(6):351–4.

Capítulo 7: Bibliografía

39. Rabagliati B R, Serri V M, Montecinos P L, Azocar A T, Ferrés G M. Utilidad de la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real en el diagnóstico de infecciones por virus respiratorio sincicial en adultos. *Rev Chil infectología*. diciembre de 2007;24(6):441–5.
40. Casiano-Colón AE, Hulbert BB, Mayer TK, Walsh EE, Falsey AR. Lack of sensitivity of rapid antigen tests for the diagnosis of respiratory syncytial virus infection in adults. *J Clin Virol*. 1 de octubre de 2003;28(2):169–74.
41. Larrañaga C, Martínez H. J, Palomino M. A, Peña C. M, Carrión A. F, Avendaño C. LF. Molecular characterization of hospital-acquired adenovirus infantile respiratory infection in Chile using species-specific PCR assays. *J Clin Virol*. 1 de julio de 2007;39(3):175–81.
42. Hernández Y, Lobo E, Martínez S, Zamora L. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE MICOPLASMAS PARA SU EMPLEO EN EL DIAGNÓSTICO POR PCR. *Rev Salud Anim*. 2009;31(2):108–14.
43. Instituto de Salud Pública de Chile. Informe de Circulación de Virus Respiratorios. Santiago de Chile; 2017.
44. Palomino MA, Larrañaga C, Avendaño LF. Hospital-acquired adenovirus 7h infantile respiratory infection in Chile. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19(6):527–31.
45. Departamento de Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Genotipificación muestras Virus Respiratorio Sincicial [Internet]. Santiago de Chile; 2011 [citado 8 de julio de 2019]. p. 8. Disponible en: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2011/08/secuenciamiento_VRS.pdf

Capítulo 8: Anexos

8.1. Protocolos para cultivos celulares

8.1.1. Mantención y cambio de medio

1. Observar las placas al microscopio y confirmar la formación de monocapa de células.
2. Durante el crecimiento, las células se mantienen con medio L-15 al 10% en Suero Fetal Bovino (SFB), una vez acidificado el medio (al tornarse de color anaranjado), se procede con el cambio de medio.
3. Calentar previamente las soluciones en el baño termorregulado a 37° C (medio de cultivo L-15, SFB, PBS) al menos 15 minutos desde que el baño alcanza los 37° C.
4. Encender la cabina de bioseguridad con la luz UV, manteniendo dentro todo el material a utilizar (placas, pipetas, puntas, etc.) al menos 5 minutos, luego esperar 10 minutos para que el flujo de aire de la cabina se estabilice.
5. Una vez calentadas las soluciones, sacar las placas con células de la incubadora y llevar a la cabina de bioseguridad.
6. Descartar el medio acidificado de las placas en un recipiente de vidrio estéril.
7. Lavar la monocapa con PBS, moviendo horizontalmente la placa para la total homogenización y descartar el PBS en el recipiente de vidrio estéril. Repetir este paso dos veces.
8. Añadir 10 ml de medio L-15 al 10% de SFB y dejar incubar a 37°C. Si la monocapa ha alcanzado más del 50% de confluencia, es posible disminuir el crecimiento cambiando la concentración de SFB en un rango de 2% a 5%.
9. Observar periódicamente las placas, si las células comienzan a caerse (soltarse) en un medio con SFB al 2-5%, éstas se deben traspasar.

8.1.2. Traspaso y tripsinización de las células

1. Observar las placas al microscopio, asegurando una confluencia de al menos 90% de la monocapa.
2. Calentar previamente las soluciones en el baño termorregulado a 37° C (tripsina, L-15, SFB, PBS) al menos 15 minutos desde que el baño alcanza los 37° C.

3. Encender la cabina de bioseguridad con la luz UV, manteniendo dentro todo el material a utilizar (placas, pipetas, puntas, etc.) al menos 5 minutos, luego esperar 10 minutos para que el flujo de aire de la cabina se estabilice.
4. Una vez calentadas las soluciones, sacar las placas con células de la incubadora y llevar a la cabina de bioseguridad.
5. Descartar el medio de cultivo de las placas en un contenedor de vidrio estéril.
6. Lavar la monocapa de células, agregando 4 ml de PBS estéril y descartar en el contenedor, si queda algún excedente, eliminarlo con una pipeta Pasteur. Repetir este paso hasta completar 3 lavados.
7. Agregar 500 μ l de tripsina (para una placa de 25 cm^3 homogenización toda la monocapa durante 1 minuto.
8. Incubar por 1 a 3 minutos en la incubadora a 37° C, verificando en el microscopio si las células se han soltado, se pueden aplicar pequeños golpes para ir soltando las células.
9. Una vez sueltas las células, agregar 2 ml de L-15 al 10% de SFB y resuspender continuamente, de manera de soltar los grupos celulares que aún estén formados.
10. Tomar 1 ml de la suspensión celular y agregarlos en una placa nueva, completando hasta 10 ml con L-15 con SFB al 10%.
11. Homogenizar bien e incubar a 37° C.

8.1.3. Congelamiento de células

Se utiliza este procedimiento para poder guardar líneas celulares que no requieren ser mantenidas en un crecimiento constante. Esta técnica permite guardar las líneas celulares por un tiempo extendido. Para ello se traspasan de las botellas a frascos pequeños o criotubos estériles.

1. Observar las placas de células a congelar y verificar confluencia cercana al 90%.
2. Calentar previamente las soluciones en el baño termorregulado a 37° C (L-15, SFB, tripsina, PBS) al menos 15 minutos desde que el baño alcanza dicha temperatura.
3. Rotular la cantidad de tubos necesarios para las células a congelar con los siguientes datos: fecha actual, fecha de último traspaso, línea celular, número de pasaje.

4. Encender la cabina de bioseguridad con la luz UV, manteniendo dentro todo el material a utilizar (placas, pipetas, puntas, guantes, etc.). La luz debe estar encendida al menos 5 minutos antes de trabajar, luego esperar 10 minutos para que el flujo de aire de la cabina se estabilice.
5. Una vez calentadas las soluciones, sacar las placas de la incubadora y llevar a la cabina de bioseguridad.
6. Descartar el medio de cultivo de la placa en un contenedor de vidrio estéril.
7. Lavar la monocapa de células, agregando 4 ml de PBS estéril y descartar en el contenedor, si queda algún excedente debe ser eliminado con una pipeta Pasteur. Repetir este paso hasta completar 3 lavados.
8. Agregar 500 μ l de tripsina (para una placa de 25 cm^3), homogenizando toda la monocapa durante 1 minuto.
9. Incubar por 1 a 3 minutos en la incubadora a 37° C, verificando en el microscopio si las células se han soltado, se pueden aplicar pequeños golpes para ir soltando las células.
10. Agregar 1 ml de medio L-15 al 10% de SFB y resuspender continuamente de manera de remover la monocapa.
11. Añadir 6,65 ml de medio L-15 al 10% de SFB y 0,85 ml de DMSO (dimetil sulfóxido).
12. Rápidamente resuspender y repartir en los criotubos, agregando a cada uno 1,8 ml de la mezcla.
13. Colocar los criotubos en el contenedor⁴ con isopropanol y congelar a -80° C por 24 horas.
14. Pasadas las 24 horas, guardar en un rack a -80° C.

8.1.4. Descongelamiento de células

1. Calentar previamente las soluciones en el baño termostático a 37° C (L-15, SFB y PBS) al menos 15 minutos desde que el baño alcanza dicha temperatura.
2. Encender la cabina de bioseguridad con la luz UV, manteniendo dentro todo el material a utilizar (placas, pipetas, puntas, guantes, etc.). La luz debe estar encendida

⁴ El contenedor de los viales utiliza alcohol isopropílico y debe permanecer siempre lleno al volumen indicado.

al menos 5 minutos antes de trabajar, luego esperar 10 minutos para que el flujo de aire de la cabina se estabilice.

3. Rotular las placas que se utilizarán, indicando tipo de línea celular, fecha y número de pase.
4. Agregar 10 ml de L-15 al 10% de SFB a cada una de las placas.
5. Calentar agua al menos a 80° C y depositar en un recipiente resistente.
6. Sacar los criotubos con las células del refrigerador -80° C.
7. Descongelar rápidamente los criotubos y depositar el contenido con una pipeta estéril en las placas (se recomienda 2 viales por placa de 25 cm³ y 4 viales por placa de 75 cm³) y resuspender.
8. Poner las placas en la incubadora a 37° C.
9. A las 24 horas hacer un cambio de medio a las placas.

8.1.5. Inoculación de virus

1. Seleccionar las células adecuadas para la amplificación de las cepas virales deseadas, las células a inocular deben estar en una confluencia de alrededor del 80% a 90%.
2. Calentar previamente las soluciones en el baño termorregulado a 37° C (L-15, SFB y PBS) al menos 15 minutos desde que el baño alcanza dicha temperatura.
3. Encender la cabina de bioseguridad con la luz UV, manteniendo dentro todo el material a utilizar (placas, pipetas, puntas, guantes, etc.). La luz debe estar encendida al menos 5 minutos antes de trabajar, luego esperar 10 minutos para que el flujo de aire de la cabina se estabilice.
4. Sacar las placas desde la incubadora, e ingresarlas en la cabina de bioseguridad.
5. Sacar los inóculos desde los refrigeradores de muestras.
6. Eliminar el medio de cultivo de las placas en un recipiente estéril.
7. Lavar la monocapa con 3 ml de PBS a 37° C, moviendo horizontalmente la placa para homogenizar el lavado, luego eliminar el PBS en el recipiente estéril, si queda excedente eliminar con una pipeta Pasteur. Repetir hasta completar 3 lavados.
8. Agregar sobre la monocapa 500 µl del inóculo, homogenizando sobre toda la monocapa durante 1 minuto, y poner en la incubadora al menos 2 minutos más.
9. Agregar 10 ml de medio de cultivo L-15 al 10% en SFB, e incubar a 37° C.

10. Dejar una placa como control. Esta debe tener el mismo tratamiento, reemplazando el inóculo por medio de cultivo.
11. Observar las placas diariamente hasta notar cambios o diferencias.

8.2. Protocolos de kits dados por fabricantes

8.2.1. Extracción de ácidos nucleicos con kit Thermo Scientific

- Reconstituir el *buffer* de lavado 1 con 15 ml de etanol al 96%.
 - Reconstituir el *buffer* de lavado 2 con 44 ml de etanol al 96%.
 - Reconstituir el ARN *Carrier* agregando 300 µl de eluyente (eluent). Dejar incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, luego mezclar en vórtex y hacer un *spin down* al tubo. Usar inmediatamente o almacenar a -20° C. No descongelar el ARN *Carrier* reconstituido más de 10 veces. Hacer alícuotas de 5,5 µl en tubos de 1,5 ml y almacenar a -20° C.
1. Calentar en termoblock a 56° C incubando el eluyente.
 1. Agregar 50 µl de líquido de preparación de columnas al centro de la membrana de la columna.
 2. Agregar 200 µl de solución de lisis a un tubo de 1,5 ml que contenga 5,5 µl de ARN *Carrier*. Mezclar resuspendiendo.
 3. Agregar 200 µl de muestra y 50 µl de proteinasa K. Mezclar en vórtex.
 4. Hacer *spin down*.
 5. Incubar la muestra por 15 minutos a 56° C mezclando en vórtex cada 1 minuto. Luego, centrifugar a máxima velocidad por 4 segundos.
 6. Agregar 300 µl de etanol al 96% y mezclar en vórtex. Incubar la muestra a temperatura ambiente por 3 minutos. Centrifugar a máxima velocidad por 4 segundos.
 7. Transferir el lisado (aproximadamente 800 µl) a la columna. Centrifugar la columna por 1 minuto a 8000 RPM. Descartar el tubo recolector y el filtrado. Poner la columna en un tubo de recolección limpio.
 8. Agregar 700 µl de solución de lavado 1 a la columna, centrifugar a 8000 RPM por 1 minuto. Descartar el tubo recolector y el filtrado. Poner la columna en un tubo de recolección limpio.

9. Agregar 500 µl de solución de lavado 2 a la columna, centrifugar a 8000 RPM por 1 minuto. Descartar el tubo de recolección y el filtrado. Poner la columna en un nuevo tubo de recolección.
10. Agregar 500 µl de solución de lavado 2 a la columna, centrifugar a 8000 RPM por 1 minuto. Descartar el tubo de recolección y el filtrado. Poner la columna en un nuevo tubo de recolección.
11. Centrifugar el tubo vacío por 3 minutos a máxima velocidad. Descartar el tubo de recolección.
12. Poner la columna en un tubo limpio de 1,5 ml y agregar 50 µl de eluyente precalentado a 56° C en el centro de la membrana. Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
13. Centrifugar a 12.000 RPM por 1 minuto. Descartar la columna. Almacenar el eluido a -20°C o -70° C.

8.2.2. Purificación de ADN desde gel (Promega Wizard® Gel and PCR Cleanup System)

1. Pese un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y anote en su costado el valor.
2. Seguido de la electroforesis, corte la banda de ADN desde el gel y deposítelo en el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml rotulando el número de muestra.
3. Vuelva a pesar los tubos y registrar en el costado. Luego llevar a la campana.
4. Agregar a cada tubo 10 µl de “*Membrane Binding Solution*” por cada 10 mg de gel. Vortexear e incubar a 50°-65° C hasta que el gel esté disuelto completamente.
5. Insertar la minicolumna en el tubo de recolección.
6. Transferir el gel disuelto a la minicolumna e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
7. Centrifugar a 16.000 g por 1 minuto. Luego, descartar el tubo de recolección e insertar la columna en un tubo de recolección nuevo.
8. Agregar a la columna 700 µl de “*Membrane Wash Solution*” (Solución de lavado de membrana, con el etanol añadido, según indicación del fabricante) y centrifugar a 16.000 g por 1 minuto. Luego, descartar el tubo de recolección e insertar la columna en un tubo de recolección nuevo.

9. Agregar a la columna 500 μL de “*Mebrane Wash Solution*” y centrifugar a 16.000 g por 5 minutos. Luego, descartar el tubo de recolección e insertar la columna en un tubo de recolección nuevo.
10. Centrifugar por 1 minuto a máxima velocidad sin tapa de seguridad plástica para evaporar el etanol residual.
11. Transferir la minicolumna a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml debidamente rotulado.
12. Agregar 50 μl de “*Nuclease-Free Water*” (agua libre de nucleasas) en la minicolumna. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
13. Centrifugar a 16.000 g por 1 minuto.
14. Descartar minicolumna y almacenar el ADN a 4° C o 20° C.

8.3. Tabla de preparación de mezcla para PCR

8.3.1. Para virus respiratorio sincicial

Tabla 8.1 Preparación de mix para PCR I de VRS

Producto	Para 1 tubo (en μl)	Para 5 tubos (en μl)	Para 9 tubos (μl)
H ₂ O	31,25	156,3	281,3
<i>Buffer 5X</i>	10	50	90
dNTP 10 mM	1	5	9
C	1	5	9
E	1	5	9
dream Taq	0,25	1,3	2,3
Tetro RT	0,25	2,5	4,5
Total	45	225	405

Tabla 8.2 Preparación de mix para PCR II de VRS

Producto	Para 1 tubo (en μl)	Para 5 tubos (μl)	Para 9 tubos (μl)
H ₂ O	32,75	163,8	294,8
<i>Buffer 5X</i>	10	50	90
dNTP 10 mM	1	5	9

H	1	5	9
I	1	5	9
L	1	5	9
M	1	5	9
dream Taq	0,25	1,3	2,3
Total	48	240	432

8.3.2. Para adenovirus

Tabla 8.3 Preparación de mix para PCR I de ADV

Producto	Para 1 tubo (en µl)	Para 5 tubos (µl)	Para 9 tubos (µl)
H ₂ O	31,75	158,8	285,8
<i>Buffer 5X</i>	10	50	90
dNTP 10 mM	1	5	9
ADV 1+	1	5	9
ADV 1-	1	5	9
Dream Taq	0,25	1,3	2,3
Total	45	225	405

Tabla 8.4 Preparación de mix para PCR II de ADV

Producto	Para 1 tubo (en µl)	Para 5 tubos (en µl)	Para 9 tubos (en µl)
H ₂ O	34,75	173,8	312,8
<i>Buffer 5X</i>	10	50	90
dNTP 10 mM	1	5	9
ADV 2+	1	5	9
ADV 2-	1	5	9
Dream Taq	0,25	1,3	2,3
Total	48	240	432

8.4. Configuración de termociclador

Tabla 8.5 Primera amplificación (programa RESP1).

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	15 min
45	95°C	30 seg
	50°C	1 min
	72°C	1 min
1	72°C	10 min
1	4°C	espera

Tabla 8.6 Segunda amplificación (programa RESP2).

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	4 min
35	94°C	30 seg
	55°C	1 min
	72°C	30 seg
1	72°C	10 min
1	4°C	espera

8.5. Soluciones de trabajo

8.5.1. Preparación de medios de cultivos

Antes de preparar cualquier medio, se deberá minimizar los riesgos de contaminación, para ello el área de cultivo debe ser descontaminar. Se limpian todas las superficies con solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, luego enjuagar con agua filtrada y se repasa con una toalla absorbente humedecida con alcohol al 70%, esto también se realizará dentro del gabinete de bioseguridad. Una vez realizado este procedimiento, se someterán las superficies a luz ultravioleta (UV) por al menos 15 minutos.

8.5.1.1. ***Preparación de medio de cultivo L-15 con antibióticos***

1. Encender la cabina de bioseguridad con la luz UV, manteniendo dentro todo el material a utilizar (matraz, embudo con filtro, pipetas, puntas, guantes, etc.). La luz debe estar encendida al menos 5 minutos antes de trabajar, luego esperar 10 minutos para que el flujo de aire de la cabina se estabilice.
2. Descongelar en baño termorregulado a 37° C la solución de antibióticos 100X (penicilina/estreptomicina/anfotericina) que se encuentra congelada a - 20° C en el refrigerador de reactivos.
3. Retirar del refrigerador de reactivos un sobre con medio en polvo de L-15.
4. En matraz estéril de 1 litro, disolver el contenido del sobre en 500 ml de agua tipo II estéril.
5. Una vez disuelto, aflorar a 1 litro con agua tipo II estéril.
6. Utilizar embudo con filtro (Corning 430513) de 0,22 µm para botellas de 1 litro marca SHOTT.
7. Vaciar 500 ml de contenido del matraz en el embudo, conectar la manguera de la bomba de aspiración al embudo.
8. Encender la bomba y comenzar la filtración del medio.
9. Una vez filtrado el medio, agregar los 500 ml restantes y continuar con la filtración.
10. Una vez terminada la filtración, agregar 10 ml de solución de antibióticos 100X.
11. Rotular el medio (L-15) con fecha e iniciales de quién lo preparó. Guardar a 4° C en refrigerador de reactivos.

8.5.1.2. ***Preparación de medio L-15 con SFB y antibióticos***

Este medio se puede preparar a diferentes concentraciones de SFB dependiendo de los requerimientos del cultivo a realizar. La más utilizada es al 10%, para otras concentraciones se puede revisar la Tabla 8.7 Preparación de medios de cultivos.

1. Descongelar SFB y solución de antibióticos en baño termorregulado.
2. Colocar 10 ml en una botella estéril de 100 ml.
3. Añadir 90 ml de medio L-15 con antibióticos preparado anteriormente.

4. Agregar 100 µl de solución de antibióticos y mezclar (para otros volúmenes, considerar que se deben añadir 100 µl de solución de antibióticos 100X por cada 10 mL de SFB).

Tabla 8.7 Preparación de medios de cultivos

Medio	10% SFB				20% SFB				5% SFB			
	Volumen para preparar (ml)											
	50	100	250	500	50	100	250	500	50	100	250	500
Medio de cultivo (ml)	45	90	225	450	40	80	200	400	47,5	95	237,5	475
Suero Fetal Bovino (ml)	5	10	25	50	10	20	50	100	2,5	5	12,5	25
Mix de antibióticos (µl)	50	100	250	500	100	200	500	1000	25	50	125	250

8.5.2. Preparación de *buffer* PBS

1. Pesar los siguientes ingredientes:
 - 8 gr. NaCl.
 - 0,2 gr. KCl.
 - 0,12 gr. KH₂PO₄.
 - 0,91 gr. Na₂ HPO₄
2. Medir 1 litro de agua filtrada, agregando en un matraz Erlenmeyer de 1 litro, junto con los ingredientes pesados.
3. Luego introducir el magneto y llevar a disolver al agitador magnético.
4. Una vez disueltos traspasar a botellas según se requiera y enviarlos a sala de esterilización.
5. Una vez estéril el producto dejarlos en refrigerador de reactivos de cultivo.
6. Anotar en registro de preparación de cultivos.

8.5.3. Preparación de Buffer TBE

Capítulo 8: Anexos

1. Recolectar los siguientes reactivos: TRIS Base, ácido bórico, EDTA.
2. Para preparar 1 litro de *buffer* TBE 1X se procede de la siguiente forma:
 - Pesar 10,8 gr de TRIS Base.
 - Pesar 5,5 gr de ácido bórico.
 - Pesar 0,93 gr de EDTA.
3. Agregar 100 ml de agua filtrada estéril y los reactivos ya pesados en un matraz de 500 ml.
4. Colocar magneto y tapar con Parafilm el matraz.
5. Dejar en agitador magnético durante 20 a 30 minutos hasta disolver los reactivos.
6. Una vez disueltos los reactivos agregar en botella Schott de 1 litro.
7. Agregar 900 ml de agua filtrada estéril.
8. Anotar en registro de preparación de reactivos.

8.5.4. Preparación de bromuro de etidio

1. La solución de bromuro de etidio se encuentra alicuotada en microtubos, volúmenes de 10 μ l y 100 μ l en una caja rotulada y sellada, guardada en la parte inferior del refrigerador de reactivos.
2. En un microtubo agregar 10 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml), más 90 μ l de agua y homogenizar (solución lista para utilizar).
3. Agregar 2 μ l de la solución (1 mg/ml) por cada 25 ml de preparación de agarosa.

8.6. Electroforesis

8.6.1. Preparación de geles de agarosa

1. Preparar soporte pegando cinta adhesiva en los extremos de éste, cuidando no dejar ningún borde despegado.
2. Pesar cantidad de gramos de agarosa en balanza electrónica (según Tabla 8.8 Preparación de geles de agarosa).
3. Poner la agarosa pesada en un matraz de 100 ml.
4. Agregar 25 ml de TBE (Tris-borato-EDTA).
5. Homogenizar agitando suavemente.

6. Llevar la solución anterior a mechero Bunsen hasta ebullición y transparentar la solución, agitar de forma constante.
7. Agregar la cantidad de bromuro de etidio a la solución (indicado en la Tabla 8.8) y homogenizar.
8. Vaciar cuidadosamente el gel al soporte eliminando las burbujas.
9. Posicionar la peineta en el extremo superior del soporte.
10. Dejar solidificar por 25 a 30 minutos.
11. Una vez solidificado el gel, retirar la peineta.
12. Una vez teniendo los tubos listos, poner el gel con soporte y sin cinta adhesiva en la cámara de electroforesis.
13. Comenzar a cargar el gel según indica el protocolo de carga de geles.

Tabla 8.8 Preparación de geles de agarosa

% de gel	Gr. De agarosa	Volumen de TBE	µl de bromuro de etidio
2	0,5	25	3
3	0,75	25	3
4	1	25	3

8.6.2. Protocolo de carga de geles

1. Poner el gel con soporte y sin cinta adhesiva en la cámara de electroforesis.
2. Ordenar los tubos de izquierda a derecha:
 - 2.1. Control negativo.
 - 2.2. Muestra.
 - 2.3. Escalera o *Ladder* de referencia.
 - 2.4. Control positivo.
 - 2.5. Controles positivos de gel correspondientes.

8.6.2.1. Gel al 2 y 3%

1. Agregar 5 µl de *búffer* de carga 6X al control negativo, control positivo y a la muestra. Resuspender hasta homogenizar.
2. Ordenar los tubos en su orden correspondiente.

Capítulo 8: Anexos

3. Llenar con 10 μ l cada pocillo de gel para los controles y las muestras.
4. Agregar 5 μ l de *Ladder* de 100 pb en el pocillo correspondiente.
5. Tapar la cámara de electroforesis con la tapa correspondiente, y conectar los cables de energía en los lugares indicados.
6. Encender fuente de poder.
7. Configurar a 75 mV por un tiempo de 50 minutos.
8. Presionar START y fijarse que el equipo funciona, tanto en el indicador de energía, como las pequeñas burbujas que suben en la cámara.
9. Cubrir la cámara con la caja protectora de luz.

8.7. Secuencias de muestras positivas

8.7.1. Adenovirus

Tabla 8.9- Secuencias de muestras positivas de ADV en sentido positivo y negativo.

Muestra		Secuencia
ADV 13	Sentido positivo	CGCTCCGCTCATGTTGCTGGGCACGGTCGCTACGTGCCCTTTCACATCCAGGTTCCCTCAGAAGTT TTTTGCCATTAAGAACCTCCTACTCTTGCCGGGCTCATACACCTACGAGTGGAAGTTCCGCAAG GATGTAAGTT
	Sentido negativo	AGTGACCCGGCAGAGTAGGAGGTTCTTAATGGCAAAAACTTCTGAGGAACCTGGATGTGAAA GGGCACGTAGCGACCGTTGCCAGCAACATGGAGCGGTAGCGTAGGCCCGCATTGCGGTGGTG GTTAAACGGGATGGGG
ADV 17	Sentido positivo	GGGTTGCTCATGTTGTTGGGAACGGCCGCTACGTGCCTTTCACATTCAGGTGCCCCAAAAGT TTTTTGCCATTA AAAACCTCCTCCTCCTGCCAGGCTCATACACATATGAATGGAAGTTCCGCAA GGATGTAACAGC
	Sentido negativo	GTTACCCCTGGCGGAGGAGGAGGTTTTTAATGGCAAAAACTTTTGGGGCACCTGAATGTGAA AAGGCACGTAGCGGCCGTTTCCCAACAACATGGAGCGGTAACGCAGGCCCGCATTGCGGTGGT GGTAAACGGGACTA
ADV 27	Sentido positivo	TCCCCGGCTTAATGTTGCTGGGCATGGTCGCTATGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCTCAGAAG TTCTTTGCCATTA AAAACCTCCTTCTCCTGCCGGGCTCATACACCTACGAGTGGAAGTTCCGCAA GGATGTAA

Capítulo 8: Anexos

Muestra		Secuencia
	Sentido negativo	AGGGGACCCCGGGCCAGAGAGAGGTTTTATGGCAAAGAACTTCTGAGGCACCTGGATGTGGA AGGGCACATAGCGACCATTGCCAGCAACATTGAGCGGTAGCGCAGGCCAGCATTGCGGTGGT GGTTAAACGGGAAT
ADV 52	Sentido positivo	ACGCCCCGCCTCCATGTTGCTGGGCACGGTCGCTACGTGCCCTTTCACATCCAGGTTCCCTCAGA AGTTTTTTGCCATTAAGAACCTCCTACTCTTGCCGGGCTCATACACCTACGAGTGGAACCTCCGC AAGGATGTAATTGG
	Sentido negativo	TGGTTTACCCCGGCAGAGTAGGAGGTTCTTAATGGCAAAAACTTCTGAGGAACCTGGATGTG AAAGGGCACGTAGCGACCGTTGCCAGCAACATGGAGCGGTAGCGTAGGCCCGCATTGCGGTG GTGGTTAAACGGGACGCC
ADV 83	Sentido positivo	AGGCCCAGGTCCATGCTTCTGGGAATGGTCGTTATGTGCCTTTCACATACAAGTGCCTCAAAA ATTCTTTGCTGTCAAAAACCTACTTCTTCTACCTGGCTCCTACACCTACGAGTGGAACCTCCGCA AGGATGTAATAT
	Sentido negativo	GTGGACAGTAGAGAGTAGGTTTTTGACAGCAAAGAATTTTTGAGGCACTTGTATGTGGAAAGG CACATAACGACCATTTCCAGAAAGCATGGACCTGTAGCGCAGACCAGCATTGCGGTGGTGGTT AAACGGGATTTT

8.7.2. Virus respiratorio sincicial

Tabla 8.10- Secuencias de muestras positivas de VRS en sentido positivo y negativo.

Muestra		Secuencia
VRS 01	Sentido positivo	GATTAGGTTATAATTAAGCCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGA TCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAG ATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTT TAACCAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCA ACAGAGCTGTCGCATCACCA
	Sentido negativo	CAAATCCCCTAATGTATCAATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTG TAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGA ACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCA GTGTTTTAACCAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGT AAATCAACAGAGCTGTCGCATCACCAA
VRS 05	Sentido positivo	TTCATTAAGCCAGAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGC AAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAAAATGC TTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCAGCAA GTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTGTC GCATCACCA

Muestra		Secuencia
	Sentido negativo	CAAATCCTTAATGTATCATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTA GGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAAC AAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGT GTTTTAACCAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAA ATCAACAGAGCTGTTCGCATCACCAA
VRS 10	Sentido positivo	CTCAATTAAGCCAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATA GCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAAAAT GCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCAGCA AAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG TCGCATCACCA
	Sentido negativo	CAATACCTAAATGTATCAATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGT AGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAA CAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGT GTTTTAACCAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAA ATCAACAGAGCTGTTCGCATCACCA
VRS 11	Sentido positivo	TTCCAATAGCAGAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCA AGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAAAATGCT TTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCAGCAGAG TGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTGTTCG CATCACCC

Muestra		Secuencia
	Sentido negativo	CAATTCCGTA AATGTATCAATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTG TAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGA ACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCA GTGTTTTAACCAGCAGAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGT AAATCAACAGAGCTGTTCGCATCACCAA
VRS 13	Sentido positivo	GATTCAAATTAAGCCAAGGAAGGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCT GCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATC AAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAA CCAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACA GAGCTGTTCGCATCTCCCA
	Sentido negativo	GAAAACCTTAAATGTATCAATAAGCAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGT AGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAA CAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGT GTTTTAACCAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAA ATCAACAGAGCTGTTCGCATCACCTATTA
VRS 14	Sentido positivo	CTCCCAATAAAGCCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCA ATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAA AATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCA GCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGA GCTGTTCGCATCACCC

Muestra		Secuencia
	Sentido negativo	CCAATTCCTAAAATGTATCATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTG TAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGA ACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCA GTGTTTTAACCAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGT AAATCAACAGAGCTGTCGCATCACCACAATA
VRS 16	Sentido positivo	TTTCAAAAAGCCAGGAAGAGGAAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGC AATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAA AAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTAACC AGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAG AGCTGTCGCATCACCCCA
	Sentido negativo	CAATCCTAATGTATCAATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAG GATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACA AGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGT TTAACCAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAAT CAACAGAGCTGTCGCATCACCACATT
VRS 24	Sentido positivo	ATTATAATTTAGGTAAGGAAAAGGGAAAAGAAGGATTTCTTGGAATTTTTGTTAGGGTGTGG ATCTGCAAATCGCCAGTGGCAATAACCGTATCCAAGGTCCTGCACCTAGAAGGGGAAGTGAAC AAAATCAAAGTGCTCTACTATCCACAAACAAAGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCAGTG TCTTAACCAGCAAGGTGCTAGACCTCAAAACTATATAGATAAACAGTTGTTACCTATTGTAA

Muestra		Secuencia
		CAAGCAAAGCTGCAGCATATCAAACATTGAAACTGTGATAGAGTTCCAATAAAAAGAACAACAG ATTACTAGAGATTACCAGAGAATTCAGTGTCAAATGCAGGTGTAACAACAC
	Sentido negativo	CGAAAAAACAATGTAACATTAAGTAAGAAAAGGAAAAGAAGATTTCTTGGATTTTTGTTAGG TGTTGGATCTGCAATCGCCAGTGGCATTGCCGTATCCAAGGTCCTGCACCTAGAAGGGGAAGTG AACAAAATCAAAGTGCTCTACTATCCACAAACAAAGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCA GTGTCTTAACCAGCAAGGTGCTAGACCTCAAAAACCTATATAGATAAACAGTTGTTACC
VRS 31	Sentido positivo	GTTTCCTTTAGGTAGGAAAGGAAAGAGATTTCTTGGATTTTTGTTAGGTGTTGGATCTGCAATCG CCAGTGGCATTGCCGTATCCAAGGTCCTGCACCTAGAAGGGGAAGTGAACAAAATCAAAGTG CTCTACTATCCACAAACAAAGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCAGTGTCTTAACCAGCAA GGTGCTAGACCTCAAAAACCTATATAGATAAACAGTTGTTACCTATTGTTAACAAGCAAAGCTGC AGCATATCAAACATTGAAACTGTGATAGAGTTCCAACAAAAGAACAACAGACTACTAGAGATT ACCAGAGAATTCAGTGTCAATGCAGGTGTAACCTACACCTCATAGTAAATCAACAGAGCTGTGC CATCACCACCATAGTAAATCCACAGAGCTGTCGCATCTCCCCACCTTTATATCCCAAATGAAA G
	Sentido negativo	CAATTCAATGTAACATTAAGTAAGAAAAGGAAAAGAAGATTTCTTGGATTTTTGTTAGGTGTTG GATCTGCAATCGCCAGTGGCATTGCCGTATCCAAGGTCCTGCACCTAGAAGGGGAAGTGAACA AAATCAAAGTGCTCTACTATCCACAAACAAAGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCAGTGT CTTAACCAGCAAGGTGCTAGACCTCAAAAACCTATATAGATAAACAGTTGTTACCTATTGTTAAC AAGCAAAGCTGCAGCATATCAAACATTGAAACTGTGATAGAGTTCCAACAAAAGAACAACAGA

Muestra		Secuencia
		CTACTAGAGATTACCAGAGAATTCAGTGTCAATGCAGGTGTA ACTACACCTCATAGTAAATCAA CAGAGCTGTCGCATCACCACAA
VRS 32	Sentido positivo	GTATTAATAAGGCAAGAGAGGACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATA GCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAAAAT GCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACAGCA GAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG TCGCATCACCA
	Sentido negativo	GAAATATTAATGTATCATAAGCAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAG GATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACA AGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGT TTTAACCAGCAGAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAAT CAACAGAGCTGTCGCATCACCAAAGA
VRS 33	Sentido positivo	ATTTAAATTTAGGTAAGGAAAGGGAAAAGAAGATTTCTTGGATTTTTGTTAGGTGTTGGATCTG CAATCGCCAGTGGCATTGCCGTATCCAAGGTCCTGCACCTAGAAGGGGAAGTGAACAAAATCA AAAGTGCTCTACTATCCACAAACAAGGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCAGTGTCTTAAC CAGCAAGGTGCTAGACCTCAAAAATATATAGATAAACAGTTGTTACCTATTGTTAACAAGCAA AGCTGCAGCATATCAAACATTGAAACTGTGATAGAGTTCCAACAAAAGAACAACAGACTACTA GAGATTACCAGAGAATTTAGTGTCAATGCAGGTGTA ACTACACCTCATAGTAAATCTCCAGAGC TGTTCTCATCACCACAAATAG

Muestra		Secuencia
	Sentido negativo	GGTCCCTCCAATGTACATTTTGTAGAAAGGAAGAAGATTTCTTGGATTTTTGTTAGGTGTTGGATCTGCAAAAAACAGTGGCATTGCCGTATCCAAGGTCCTGCACCTCTAAGGGGAAGTGAACAAAA TCAAAGTGCTCTACTATCCACAAACAAGGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCAGTGTCTT AACAGCAAGGTGCTAGACCTCAAAAACCTATATAGATAAACAGTTGTTACCTATTGTTAACAAAG CAAAGCTGTGCATATCCAACATTGATCTG
VRS 35	Sentido positivo	ATATATATTTAGATAGGAAAGGAAAGAAGATTTCTTGGATTTTTGTTAGGTGTTGGATCTGCAA TCGCCAGCGGATTGCCGTATCCAAGGTCCTGCACCTAGAAGGGGAAGTGAACAAAATCAAAG TGCTCTACTATCCACAAACAAGGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCAGTGTCTTAACCAGC AAGGTGCTAGACCTCAAAAACCTATATAGATAAACAGTTGTTACCTATTGTTAACAAAGCAAAGCT GCAGCATATCAAACATTGAAACTGTGATAGAGTTCCAACAAAAGAACAACAGACTACTAGAGA TTACCAGAGAATTCAGTGTCAATGCAGGTGTAACCTACACCTCATAGTAAATCAACAGAGCTGTC GCATCACCACCAGT
	Sentido negativo	GAAATTCACAATGTAACATTAAGTAAGAAAGGAAAGAAGATTTCTTGGATTTTTGTTAGGTGTT GGATCTCGCAATCGCCAGTGGCATTGCCGTATCCAAGGTCCTGCACCTAGAAGGGGAAGTGAA CAAAATCAAAGTGCTCTACTATCCACAAACAAGGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCAGT GTCTTAACCAGCAAGGTGCTAGACCTCAAAAACCTATATAGATAAACAGTTGTTACCTATTGTTA ACAAGCAAAGCTGCAGCATATCAAACATTGAAACTGTGATAGAGTTCCAACAAAAGAACAACA GACTACTAGAGATTACCAGAGAATTCAGTGTCAATGCAGGTGTAACCTACACCTCATATTAATC AACAGAGCTGTGCGCATCACCACATAAATATT

Muestra		Secuencia
VRS 37	Sentido positivo	GTCAATTAAGGCCAAGGAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCA ATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAA AATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCA GCAGAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGA GCTGTCGCATCTCCC
	Sentido negativo	CAAACCCTTAAATGTAATCAATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAG GTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGT GAACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGT CAGTGTTTTAACCCAGCAGAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATA GTAAATCAACAGAGCTGTCGCATCTCCCCATT
VRS 41	Sentido positivo	ATTCATTAAGCCAAGGAAGAAGGAGACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGC AATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAA AAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCC AGCAGAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAG AGCTGTCGCATCTCC
	Sentido negativo	AAAACCCCTTAAATGTTATCAATTAAGCAAAGAAGAGGAAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTT AGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGA AGTGAACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGG GGTCAGTGTTTTAACCCAGCAGAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCC ATAGTAAATCAACAGAGCTGTCGCATCTCCAAA

Muestra		Secuencia
VRS 53	Sentido positivo	TTCCATTAGGCAAGGAAAGAGGAAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCA ATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAA AATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCA GCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGA GCTGTCGCATCTCCA
	Sentido negativo	CGGAGTGCTAACAGCTACGAAAACTAATGTATCAATAAGCAAGAAGAGGAAACGAAGATTTCT GGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACAC CTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGT CTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACC AATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTGTGCGCATCTCCA
VRS 54	Sentido positivo	CTTTCCAATAAAGCCAAGAAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTG CAATAGCAAGTGGCATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCA AAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAAC CAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAG AGCTGTCGCATCTCCA
	Sentido negativo	CTATCTTTTGATTTGTTTGGGCAAACCAAATGTATCAATAAGCAAGAAGAGGAAACGAAGATT TCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGCATAGCTGTATCCAAAGTTCTA CACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTC AGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACA ACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTGTGCGCATCACCAA

Muestra		Secuencia
VRS 55	Sentido positivo	GGGGGGTTCCCCTGCCATTGATCTGCATTCTCTGGTGATCTCTACTAGTCTGTTGTTCTTTTGTG GAACTCTATCACAGTTTCAATGTTTGATATGCTGCAGCTTTGCTTGTTAACAATAGGTAACA GTTTATCTATATAGTTTTTGAGGTCTAGCACCTTGCTGGTTAAGACACTGACTCCATTATATAAG CTGACTACAGCTTTGTTTGTGGATAGTAGAGCACTTTTGATTTTGTTCCTTCCCCTTCTAGGTG CAGGACCTTGGATACGGCAATGCCACTGGCGATTGCAGATCCAACACCTAACAAAAATCCAAG AAATCTTCTTTTCCTTTTCTTACTTAATGTTACATTGGTGTTTTTGGTATTGTTGAGTGTATAAAT CATAAACCTTATTA
	Sentido negativo	GGGTTTCCCTGCCATTGTTCTGCAAGTCTCTGGTAGTCTCTACTAGTCTGTTGTTCTTTTGTGGA ACTCTATCACAGTTTCAATGTTTGATATGCTGCAGCTTTGCTTGTTAACAATAGGTAACA TTATCTATATAGTTTTTGAGGTCTAGCACCTTGCTGGTTAAGACACTGACTCCATTATATAAGCT GACTACAGCTTTGTTTGTGGATAGTAGAGCACTTTTGATTTTGTTCCTTCCCCTTCTAGGTGCA GGACCTTGGATACGGCAATGCCACTGGCGATTGCAGATCCAACACCTAACAAAAATCCAAGAA ATCTTCTTTTCCTTTTCTTACTTAATGTTACATTGGTGTTTTTGGTATTGTTGATTGTATAATTCAT AAACCTTCTTAAGGAATTGATGATTGTATAAATCATAACACATTCAGGAATAGTTGATTTAACAA ATCCAAAACAGGCACCCGGACGGGCAC
VRS 57	Sentido positivo	GTTTAATAAGCCAAAGAAAGAGGAAACGAAGATTTCTAGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGC AATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTGCACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAA AAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACC AGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAG AGCTGTCGCATCTCCA

Muestra		Secuencia
	Sentido negativo	<p>CAAAACCCTAATGTATCAATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTAGGCTTCTTGTTAGGTGT AGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTGCACCTTGAAGGAGAAGTGAA CAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGT GTTTTAACCAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAA ATCAACAGAGCTGTTCGCATCACCAAATGC</p>
VRS 58	Sentido positivo	<p>GTCAAAAAAGCCAAGAAAGAGGGAAACGAAGATTTCTAGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCT GCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTGCACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATC AAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAA CCAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACA GAGCTGTTCGCATCTCCA</p>
	Sentido negativo	<p>CAAAAACCCCTAAATGTATCATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTAGGCTTCTTGTTAGG TGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTGCACCTTGAAGGAGAAGTG AACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTC AGTGTTTTAACCAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAG TAAATCAACAGAGCTGTTCGCATCACCAAATTA</p>
VRS 59	Sentido positivo	<p>TTTTAATAAAGCAAGAAGAGGAACCGAAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCA ATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAA AATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCA GCAGAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGA GCTGTTCGCATCTCCA</p>

Muestra		Secuencia
	Sentido negativo	<p>CCAAAACCCTTAAATGTATCATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGT GTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTG AACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTC AGTGTTTTAACCAGCAGAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAG TAAATCAACAGAGCTGTTCGCATCACCA</p>
VRS 60	Sentido positivo	<p>ATTTCAATAAGCCAAGAAGGAGGAACGAAGATTTCTAGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCA ATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTGCACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAA AATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCA GCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGA GCTGTTCGCATCTCCA</p>
	Sentido negativo	<p>CAAACCCCTTAAAATGTATCCATAAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTAGGCTTCTTGTTA GGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTGCACCTTGAAGGAGAA GTGAACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGG GTCAGTGTTTTAACCAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCA TAGTAAATCAACAGAGCTGTTCGCATCTCCA</p>
VRS 60	Sentido positivo	<p>AGGGTATGGTTCCTGCATTGACACTGAATTCTCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGTTGTTCTTTTG TTGGA ACTCTATCACAGTTTCAATGTTTGATATGCTGCAGCTTTGCTTGTTAACAATAGGTAACA ACTGTTTATCTATATAGTTTTTGAGGTCTAACACCTTGCTGGTTAAGACACTGACTCCATTAAAT AAGCTGACTACAGCCTTGTTTGTGGATAGTAAAGCACTTTTGATTTTGTTCACCTCCCTTCTAG GTGCAGAACCTTGGATACGGCAATGCCACTGGCGATTGCAGATCCAACACCTAACAAAAATCC</p>

Muestra		Secuencia
		AAGAAATCTTCTTTTCTTTTCTTACTTAATGTTACATTGGTTTTTTTTGGTATTGTTGAGTGTATA AATCATAAACCTTTTGGCATTGTTGAGTAGATAAATCATAAACCTATATAAATTGTTGAGTGTA TAAATTTAAGGCGTGAAGCATCGTTGGC
	Sentido negativo	CGTTTGTCCCCTGCATTGAACTGAATTCTCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGTTGTTCTTTTGTGGA ACTCTATCACAGTTTCAATGTTTGATATGCTGCAGCTTTGCTTGTTAACAATAGGTAACAACCTGT TTATCTATATAGTTTTTGAGGTCTAACACCTTGCTGGTTAAGACACTGACTCCATTAATAAGCT GACTACAGCCTTGTTTGTGGATAGTAGAGCACTTTTGATTTTGTTCACCTCCCCTTCTAGGTGCA GAACCTTGGATACGGCAATGCCACTGGCGATTGCAGATCCAACACCTAACAAAAATCCAAGAA ATCTTCTTTTCTTTTCTTACTTAATGTTACATTGGTTTTTTTTGGTATTGTTGAGTGTATAAATCA TAAACCTTATGGATTGTTGAGTGTATAAATCAAGCCTTAAACAG
VRS 72	Sentido positivo	GTTTTTCATAAAGCCAAGAAGAGGAACCGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTG CAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCA AAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCCGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAAC CAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAG AGCTGTCGCATCTCCA
	Sentido negativo	CCAAAACCCTAATGGTATCCATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGT GTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTG AACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCCGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTC AGTGTTTTAACAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAG TAAATCAACAGAGCTGTTCGCATCACCA

Muestra		Secuencia
VRS 84	Sentido positivo	G TTCATTAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATA GCAAGTGGTATAGCTGTATCAAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAAAAT GCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACAGCA AAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG TCGCATCTCCA
	Sentido negativo	CAAAAACCCCTTAAAATGTTATCCAATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGT TAGGTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCAAAAGTTCTACACCTTGAAGGAG AAGTGAACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATG GGGTCAGTGTTTTAACAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACC CATAGTAAATCAACAGAGCTGTCGCATCACCAAATT
VRS 85	Sentido positivo	GTAAATTTTAAGTTAAAGAAAGGAAAAGAGATTTCTTGGATTTTTGTTAGGTGTTGGATCTGCA ATCGCCAGTGGCATTGCCGTATCCAAGGTCCTGCACCTAGAAGGGGAAGTGAACAAAATCAAA AGTGCTCTACTATCCACAAACAAAGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCAGTGTCTTAACCA GCAAGGTGCTAGACCTCAAAAATATATAGATAAACAGTTGTTACCTATTGTTAACAAGCAAA GCTGCAGCATATCAAACATTGAAACTGTGATAGAGTTCCAACAAAAGAACAACAGACTACTAG AGATTACCAGAGAATTCAGTGTCAATGCAGGTGTAACCTACACCTAGTAAATCAACAGAGCTGT CGCATCACCCCC
	Sentido negativo	CAAAACCAAATTGTACATTAAGTAAGAAAGGAAAAGAAGATTTCTTGGATTTTTGTTAGGTGTT GGATCTGCAATCGCCAGTGGCATTGCCGTATCCAAGGTCCTGCACCTAGAAGGGGAAGTGAAC AAAATCAAAAGTGCTCTACTATCCACAAACAAAGCTGTAGTCAGCTTATCTAATGGAGTCAGTG

Muestra		Secuencia
		TCTTAACCAGCAAGGTGCTAGACCTCAAAAACCTATATAGATAAACAGTTGTTACCTATTGTAA CAAGCAAAGCTGCAGCATATCAAACATTGAAACTGTGATAGAGTTCCAACAAAAGAACAACAG ACTACTAGAGATTACCAGAGAATTCAGTGTCAATGCAGGTGTAACCTACACCTAGTAAATCAAC AGAGCTGTCGCATCTCCCC
VRS 87	Sentido positivo	GTCATTTAGGCCAGGAAAAAGGAAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCA ATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAA AATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCA GCAGAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGA GCTGTCGCATCTCC
	Sentido negativo	CAAAATCCCTTAAATGTATCCAATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAG GTGTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGT GAACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGT CAGTGTTTTAACCCAGCAGAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCATA GTAAATCAACAGAGCTGTCGCATCACCAAATCA
VRS 88	Sentido positivo	GTTATTAAGCCAGAAGAGGAAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGTAGGATCTGCAATA GCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTGAACAAGATCAAAAAT GCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTCAGTGTTTTAACCCAGCA AAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAGTAAATCAACAGAGCTG TCGCATCTCCA

Capítulo 8: Anexos

Muestra		Secuencia
	Sentido negativo	CCAAATCCCTAAATGTATCAATAAGCAAGAAGAGGAACGAAGATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGT GTAGGATCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCTGTATCCAAAGTTCTACACCTTGAAGGAGAAGTG AACAAGATCAAAAATGCTTTGCAGCTTACAAACAAAGCTGTAGTCAGTCTATCAAATGGGGTC AGTGTTTTAACCAGCAAAGTGTTAGATCTCAAGAATTATATAAACAACCAATTATTACCCATAG TAAATCAACAGAGCTGTTCGCATCACCAA

8.8. Código de GenBank de las secuencias usadas para crear los dendrogramas

8.8.1. Para adenovirus

Tabla 8.11- Listado de códigos identificatorios de secuencias de GenBank usado para crear el dendrograma de adenovirus.

Código de GenBank					
MH558113	X67709	KF268127	X74666	AY819828	JQ412615
MH121087	MH121075	KF268199	MH121097	JX173077	EF494640
JX173086	JX173082	KM190941	MH121114	JX423389	FJ744159
JX173080	JX173078	KX513975	KX384959	KM458627	KF268128
EU867492	EU867471	KX868466	KP274044	MH121083	KF268131
AF534906	AB436560	M73260	JX173081	MF198459	KF268132
EU179788	EU439575	MH121094	AJ293905	AY819911	KF268202
KF268311	KY511691	AY283780			

8.8.2. Para virus respiratorio sincicial

Tabla 8.12- Listado de códigos identificatorios de secuencias de GenBank usado para crear el dendrograma de virus respiratorio sincicial.

Código de GenBank					
MH760721	MH760726	MH760718	MH760686	MH760674	MG839547
MG773270	MG773268	MG773266	MG323926	MG323925	MF978750

Capítulo 8: Anexos

Código de GenBank					
MF978749	MF978747	MF978746	MF978742	MF978741	MF978737
MF978734	MF978732	MF978731	MF978729	MF978727	MF978718
MF978717	MF978700	MF978699	MF978698	MF978697	MF978696
MF978695	MF978693	MF001058	LC385008	LC385006	LC385005
LC385004	LC385002	LC384997	LC324678	LC311529	LC311526
KY924878	KY296704	KY296701	KY296698	KY296680	KY296660
KY296654	KY249681	KY249660	MH760728	MF978743	JF920050
MH187308	LC365898	MH760633	MF978553	MF145168	MF361899
MH181998	MH187305	KY967362	LC367177	KY865233	KY883566
LC377910	MF978525	MF978545	MF978592	MF978620	MH181988
MH182013	MH182054	MH182056	MH182060	MH187303	MH447954
MH447956	MH447959	MK167035	AY283780		