

Adenovirus aislados de pacientes mexicanos con infección respiratoria aguda

Herlinda Mejía-López¹, Irma López-Martínez²

¹Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, México, D.F. ²Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), S.S., México, D.F.

RESUMEN

Introducción. Los Adenovirus (Ad) son responsables de al menos el 5% de las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) en el mundo. Generalmente producen infecciones de vías respiratorias medias que regularmente son autolimitadas. Sin embargo, algunos pueden inducir enfermedad respiratoria con alta morbilidad dependiendo de ciertos tipos de Ad y el estado inmunológico del paciente.

Objetivo. Identificar los tipos de Ad aislados de muestras de pacientes con infección respiratoria aguda.

Material y Métodos. Para aislar Ad, se inocularon muestras de secreciones respiratorias en células HEP-2. Se reconoció el aislamiento de Ad por inmunofluorescencia indirecta. La tipificación se realizó mediante análisis de restricción con las endonucleasas Eco-RI, Hind-III, Bgl-II y Sma-I (RFLP - Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción).

Resultados. Fueron analizadas 118 muestras, el 22% resultó positivo a adenovirus por inmunofluorescencia específica. El uso del RFLP, permitió la identificación de Ad1 en cuatro muestras, Ad2 en seis muestras y dieciséis presentaron Ad5.

Conclusiones. Este trabajo es el primero en reportar la presencia de Ad1, Ad2 y Ad5 en pacientes con infección respiratoria aguda.

Palabras Clave: Infección respiratoria aguda,

adenovirus, RFLP.

SUMMARY

Adenovirus isolated from Mexican patients with Acute Respiratory Infection

Introduction. Adenoviruses are responsible for at least 5% of acute respiratory infections world wide. Regularly, they produce self-limited middle respiratory tract infections. Depending on the type of infecting adenovirus and the immunological status of the patient, adenoviral infection may result in high morbidity of respiratory diseases.

Objective. To identify the adenovirus type from isolates of patients with acute respiratory infection.

Material and Methods. In order to isolate the adenovirus agent, samples of respiratory secretion were inoculated into HEP-2 cells. Detection of adenoviral isolation was done by indirect immunofluorescence. Adenoviral typing was done by restriction enzyme analysis using the enzymes Eco-RI, Hind-III, Bgl-II and Sma-I (RFLP).

Results. A total of 118 samples were analysed, of which 22% were identified as adenovirus positive by specific immunofluorescence. The RFLP pattern allowed the typing of Ad1 in 4 samples, Ad2 in 6 samples and 17 samples had the type Ad5.

Conclusions. We are reporting for the first time the presence of Ad1, Ad2, and Ad5 in patients with acute respiratory infection.

Solicitud de sobretiros: Herlinda Mejía López. Chimalpopoca 14 Col. Obrera, Delegación. Cuauhtemoc, C.P. 06800, México, D.F.
E-mail: linchm10@yahoo.com

Recibido: el 29 de mayo de 2007. **Aceptado para publicación:** el 29 de octubre de 2007.

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb071832.pdf>

Key words: Acute respiratory infections, Adenovirus, RFLP.

INTRODUCCIÓN

Los adenovirus (Ad) están ampliamente distribuidos en el mundo, infectan millones de personas causando diversas manifestaciones clínicas tales como queratoconjuntivitis, cistitis hemorrágica, gastroenteritis y afectan seriamente vías respiratorias altas y bajas (1). Son virus de ADN, desnudos, de forma icosaédrica de 70-90nm de diámetro. Están constituidos por 252 capsómeros, doce de los cuales forman la base de una proyección conocida como filamento, éste es utilizado para unirse a las células epiteliales de los tejidos que infectan (2). La familia *Adenoviridae* se constituye por más de 100 tipos de adenovirus que forman dos géneros, *Mastadenovirus* y *Aviadenovirus*. El género *Aviadenovirus* se limita a virus de aves mientras que *Mastadenovirus* afecta varios mamíferos; se han reportado 51 tipos capaces de afectar al hombre (3). Los tipos de Ad se han clasificado en 6 subgéneros (A-F) basados en su capacidad de aglutinar eritrocitos, facultad conferida al filamento. Otras características se han incluido en la clasificación, éstas incluyen la capacidad oncogénica del virus en ratones, movilidad electroforética de las proteínas y la homología en el genoma identificada por hibridación molecular cruzada, secuenciación o digestión con endonucleasas de restricción (4). Los adenovirus producen infecciones íntimamente relacionadas con su tropismo en diverso tejidos; Ad8, Ad19 y Ad37 infectan ojo; Ad1, Ad2, Ad3, Ad4, Ad5 y Ad6 infectan preferentemente vías respiratorias mientras que Ad40 y Ad41 causan infección en tracto digestivo (4,5).

Los Ad respiratorios son los responsables al menos del 5% de las infecciones respiratorias agudas (IRA) a nivel mundial. Los síntomas usuales incluyen congestión nasal, tos y coriza, acompañados por malestar general, fiebre, mialgias y dolor de cabeza. Algunos pacientes puede presentar inflamación exudativa de amígdalas que la hacen indistinguible de una enfermedad

causada por estreptococos del grupo A. Los tipos Ad1, Ad2, Ad5 y Ad6 que conforman al subgénero C, son los más frecuentemente involucrados (6,7); los tipos Ad3 y Ad7 (subgénero B) son responsables de cuadros faringo-conjuntivales y casos esporádicos de cuadros respiratorios severos (8-10). Particularmente en niños muy pequeños pueden ser fatales o asociarse con daños pulmonares crónicos. En pacientes con infección latente por adenovirus se ha mostrado bronquiolitis obliterante caracterizada por atrapamiento de aire, engrosamiento peribronquial con disminución del diámetro y cantidad de los vasos, bronquiectasias y atelectasia cicatrizal con colapsos pulmonares, con la consecuente bronquiolitis constrictiva (11-16). El objetivo de este estudio fue identificar los tipos de Ad aislados de muestras de pacientes con IRA, para lo cual se utilizó el aislamiento del agente etiológico en cultivos celulares y el análisis de restricción con endonucleasas sobre el ADN (RFLP).

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras clínicas. Se analizaron 118 muestras biológicas de exudados faríngeos las cuales fueron referidas al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) de la Secretaría de Salud, del 2001 al 2003 y que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: a) muestras provenientes de los estados de la República Mexicana de pacientes con IRA que acuden a consulta de centros de salud de primer nivel, b) Ambos sexos y c) Cualquier edad.

Toma de muestra. Las muestras fueron tomadas durante los primeros 5 días del inicio de la enfermedad con hisopos de dracón o rayón y colocadas en un medio de transporte viral; y mantenidas a 4°C hasta su envío al InDRE (17)

Aislamiento de adenovirus en cultivo celular. Las muestras biológicas fueron inoculadas en la línea celular HEp-2 procedentes de carcinoma epidermoide de laringe de rata (ATCC. Kansas Cy MO). Estas células con morfología epitelial son susceptibles a ser infectadas por Ad. Después de 3

Adenovirus e infección respiratoria aguda en mexicanos

a 5 pases, se observa el efecto citopático característico (ECP). Este efecto consiste en cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares producidos por la replicación viral y son visibles al microscopio óptico, las células se redondean y fusionan entre ellas formando racimos, se incrementa el efecto de refringencia y pueden observarse granulaciones irregulares intranucleares (18).

Prueba de inmunofluorescencia. El aislamiento fue corroborado mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (19). Se utilizó el estuche de diagnóstico Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification IFA Kit (Chemicon International Inc.) que permite la identificación de los virus de Influenza A y B, Sinsicial Respiratorio, Parainfluenza 1,2 y 4 y adenovirus (Chemicon International Inc.). Se usó yoduro de propidio como colorante de contraste (Sigma-Aldrich Co. St Louis MO), el cual tiñe de rojo los ácidos nucleicos.

Extracción de ADN. Los adenovirus aislados fueron replicados nuevamente en cultivos de células HEp-2 hasta obtener ECP. Las células infectadas se sometieron a un proceso de congelación y descongelación por tres períodos para liberar las partículas virales. Se centrifugaron a 300Xg por 10 minutos y se procedió a la extracción del ADN según el método de Elsom (20). El material genético fue almacenado a -20°C hasta su identificación.

Tipificación de adenovirus por RFLP. El DNA total de los virus aislados se sometió a análisis de restricción con las endonucleasas Eco-RI, Hind-III, Bgl-II y Sma-I, las digestiones se realizaron de acuerdo a los protocolos de Sigma (Sigma-Aldrich Co. St Louis MO). Los productos de digestión fueron procesados para electroforesis en un gel de agarosa al 1%, por 9h a 40 volts y se tiñó con bromuro de etidio 1ug/ml (Sigma-Aldrich Co. St Louis MO). Se usaron como marcadores estándares de pesos moleculares Lambda DNA/EcoRI + Hind III y ϕ X174 DNA/Hae III (Promega Co. Madison, WI). La identificación de los tipos se realizó por comparación con los patrones de restricción reportados en la literatura (14,21-23).

RESULTADOS

En este estudio se analizaron 118 muestras procedentes de pacientes con IRA y que cumplieron con los criterios de inclusión.

Aislamiento de Adenovirus en cultivo celular.

Todas las muestras se inocularon en la línea celular HEp-2. El control de células sin infectar no presentó alteraciones morfológicas (**Figura 1a**). El ECP característico de Ad se observó en 26 de las muestras estudiadas (22%) (**Figura 1b**).

Prueba de inmunofluorescencia. El aislamiento de Ad fue corroborado por esta prueba. Las células no infectadas sólo presentaron el colorante rojo de contraste. Las células infectadas se distinguen por la marcada fluorescencia verde brillante. (**Figura 1c y 1d**).

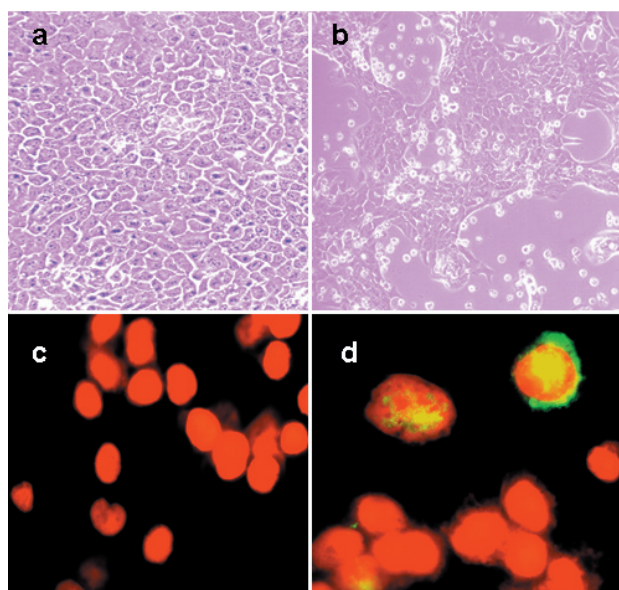


Figura 1. Cultivo celular e inmunofluorescencia. Células HEp-2 a) no infectadas; b) efecto citopático característico de adenovirus. La flecha indica la agrupación celular, c) Inmunofluorescencia en células HEp-2 no infectadas, sólo presentan el colorante de contraste con yoduro de propidio; d) las células infectadas presentan anticuerpo específico para adenovirus-FITC que tiñe de color verde brillante.

El **Cuadro 1** presenta los datos de edad y procedencia de los pacientes de quienes se aislaron e identificaron los Ad. El Distrito Federal y Nayarit
Vol. 18, No. 3, septiembre-diciembre de 2007

presentaron Ad1, Ad2 y Ad5, los estados de Michoacán Ad2 y Ad5, y Tamaulipas, Hidalgo y Yucatán Ad5. De los casos estudiados 22 de ellos fueron menores de 13 años (81%) y 4 adultos.

Cuadro 1

Muestras de pacientes con IRA positivas para Adenovirus

	NOMBRE	*EDAD	PROCEDECENCIA	TIPO
2001	AEM	24 A	Distrito Federal	Ad5
	ARS	53 A	Nayarit	Ad5
	DOR	6 A	Nayarit	Ad5
	EBM	13 A	Distrito Federal	Ad5
	EMV	3 A	Michoacán	Ad5
	ALS	10 A	Distrito Federal	Ad5
	AFA	1 A	Distrito Federal	Ad1
2002	AIBG	12 A	Nayarit	Ad1
	AIGL	R/n	Nayarit	Ad5
	JRR	4 A	Michoacán	Ad2
	GROG	2 A	Distrito Federal	Ad1
	LERC	2 A	Michoacán	Ad5
	MVM	5 M	Distrito Federal	Ad5
	JECJ	10 A	Distrito Federal	Ad1
	AEGG	11 A	Distrito Federal	Ad5
	OCZ	6 A	Hidalgo	Ad5
	BFP	3 A	Nayarit	Ad2
	JPP	6 A	Michoacán	Ad2
	FGR	1 A	Distrito Federal	Ad2
	CSP	12 A	Nayarit	Ad2
	AYOR	10 A	Yucatán	Ad5
2003	FCB	1 A	Distrito Federal	Ad5
	NLC	6 A	Distrito Federal	Ad5
	MALA	51 A	Tamaulipas	Ad5
	MRVM	39 A	Distrito Federal	Ad5
	MOG	8 A	Distrito Federal	Ad2

* R/n=Recién nacido, M=Meses, A=Años

Tipificación de adenovirus por RFLP. La Figura 2 presenta los patrones que se obtuvieron con los productos de digestión del DNA total de las partículas virales. El uso de las cuatro enzimas de restricción, permitió la identificación de Ad1 en cuatro muestras, Ad2 en seis muestras y dieciséis presentaron Ad5.

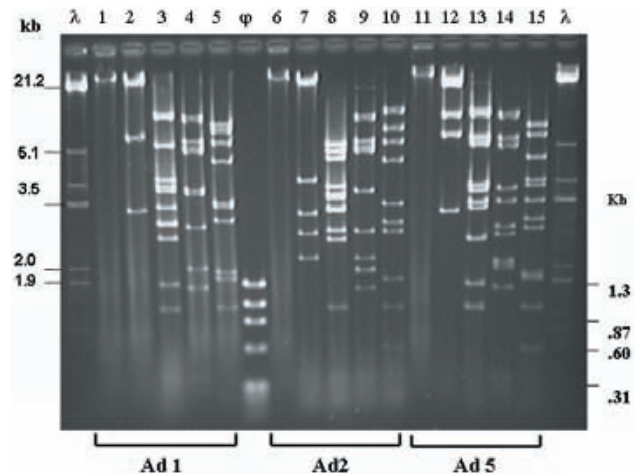


Fig 2. RFLP de Ad1, Ad2 y Ad5. Eco RI (líneas 2, 7 y 12); Hind III (líneas 3,8 y13); Bgl II (líneas 4, 9 y 14) y Sma I (líneas 5, 10 y 15). Las líneas 1, 6 y 11 presentan el DNA sin digerir. Se usaron como marcadores de peso molecular el DNA de λ digerido con Hind III y DNA de ϕ digerido con Hae III.

DISCUSIÓN

Los adenovirus respiratorios representan un problema de salud pública. Ellos inducen entidades clínicas de un amplio rango de severidad. A pesar de que las características epidemiológicas de los adenovirus varían según el tipo, todos son transmitidos mediante el contacto directo, éste suele ser fecal-oral, y ocasionalmente por el agua. Se ha demostrado que algunos adenovirus (como los serotipos 1, 2, 5 y 6), son endémicos en varios lugares del mundo donde han sido estudiados. La infección por estos tipos es adquirida en la niñez; en esta etapa pueden ser persistentes en pulmones y amígdalas, y cursan como casos asintomáticos (15,16). Otros tipos causan infección esporádica o brotes ocasionales. Se han reportado Ad responsables de infecciones de vías respiratorias medias que regularmente son autolimitadas. Las infecciones severas de vías respiratorias bajas, son producidas por tipos de Ad3 y Ad7 que pueden incapacitar al paciente o llegar a ser fatales (11-13). Los brotes de enfermedad respiratoria están asociados con este virus, ocurren más frecuentemente al final del invierno, en la primavera y al inicio del verano, sin embargo, las infecciones por adenovirus pueden

Adenovirus e infección respiratoria aguda en mexicanos

ocurrir en cualquier temporada del año.

En un estudio controlado realizado con 18000 niños del Hospital del Niño en Washington D.C., los tipos de Ad 1, 2, 3, 5, 6 y 7 se encontraron asociados significativamente con infección respiratoria aguda de vías bajas (24). Ocasionalmente se presentan neumonías en niños ocasionadas por Ad3, Ad44 y Ad21, muy probablemente estos casos están asociados a condiciones particulares del paciente como el estado nutricional e inmunológico, edad, y susceptibilidad genética (18, 25, 26).

Es importante mencionar que en países de América Latina se han reportado adenovirus que afectan vías respiratorias. Kajon y colaboradores, realizaron un análisis por enzimas de restricción en 148 muestras de niños menores de 1 año, procedentes de Argentina, Chile y Uruguay. Ellos identificaron Ad1, Ad2 y Ad5 y las variantes genotípicas D1 para Ad1, D5 de Ad2 y D36 de Ad5, también reportan que los varones son los más afectados (22). Un dato importante de citar, es que también se han identificado adenovirus del subgénero C asociados con conjuntivitis en pacientes mexicanos (27).

En una comunicación muy reciente (11 de octubre del 2007), las autoridades panameñas de salud confirmaron la muerte de 17 niños en la comarca indígena Gnöbe Buglé, del centro del país, por problemas respiratorios causados por el "adenovirus". Sin embargo no indican la identificación de tipos específicos (28).

En estados Unidos de América se ha dado particular interés al estudio de Ad7, debido a que es el Ad responsable de casos agudos que pueden ser fatales y casos con daños pulmonares crónicos (17,30).

En este estudio pudimos observar que el 81% de los pacientes afectados por adenovirus fueron niños e infantes, lo que concuerda con lo reportes antes mencionados.

En México se conoce poco sobre la prevalencia de adenovirus y de los tipos circulantes. Pizarro y colaboradores, identificaron por neutralización los anticuerpos de los tipos Ad1, Ad2 y Ad6 (30).

En otro reporte identifican por fijación de complemento, la presencia de anticuerpos anti-adenovirus en poblaciones cerradas (militares) así como el aislamiento de Ad2 como responsable de un brote faringo-conjuntival en una casa de cuna (31,32)

López y colaboradores de InDRE, realizaron un estudio de 1995 al 2000, con muestras provenientes de pacientes con diagnóstico presuntivo de IRA; reportan que de 8029 muestras analizadas por Inmunofluorescencia indirecta, 94 (1.17%) fueron positivas a adenovirus, además observaron que las infecciones por este virus no presenta un patrón estacional aparente (33)

A pesar de que los Ad1, Ad2, Ad5, y Ad6 infectan mas del 80% de la población humana en las primeras etapas de la vida, el virus puede establecerse como una infección asintomática en la cual los viriones infectivos son liberados en las heces por varios años, esta podría ser la fuente probable de las infecciones persistentes asociadas a los tejidos linfoides en mucosas (adenoides y amígdalas) en niños pequeños. Regularmente en etapas tempranas de la vida están más comúnmente asociadas a resfriados, conjuntivitis, complicaciones de vías respiratorias bajas y síndromes en pacientes inmunocomprometidos, lo que justifica la importancia de identificarlos y monitorearlos como parte de la vigilancia epidemiológica de virus que causan IRA.

En este artículo identificamos a los tipos Ad1, Ad2 y ad5 del subgénero C con un 22%, que corresponde únicamente al porcentaje de positividad con las técnicas utilizadas. Resulta de importancia realizar un estudio representativo a nivel nacional que permita entender la prevalencia de estos virus. Es de importancia aclarar que Ad6 raramente es detectado en comparación con los otros tipos del subgénero C, esto podría estar relacionado con varios factores como la edad en que se presenta la infección, el inicio de la misma y su temprana detección, el tipo de línea celular que se utiliza para el aislamiento, así como la permisibilidad de Ad6 a las células, entre otros.

El análisis RFLP para DNA viral puede

ser utilizado como una poderosa herramienta para estudios epidemiológicos (14,21-23). En este estudio mostramos el patrón de restricción del ADN de adenovirus aislados de pacientes mexicanos con IRA. El uso de un grupo de cuatro endonucleasas de restricción, permitió tipificar fácilmente los tipos Ad1, Ad2 y Ad5 usando comparativamente, patrones prototipos previamente publicados. Es importante mencionar que las enzimas de restricción utilizadas, pueden identificar cualquier tipo de adenovirus.

CONCLUSIONES

Este trabajo es el primero en México en mostrar la presencia de Ad1, Ad2, Ad5 en pacientes con IRA a partir de la inoculación de las muestras en la línea celular HEP-2 y el análisis de restricción con endonucleasas.

Sabemos que adenovirus es endémico en México, sin embargo se ha dado poca atención a la tipificación y el daño que puede causar. Este estudio propone una técnica para la identificación de tipos de Ad, como una alternativa que facilite los estudios epidemiológicos que muestren la importancia de la infección por este virus en nuestro país.

REFERENCIAS

1. **Schmitz H, Wigand R, Heinrich W.** Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 1983; 117: 455-66
2. **Zhang Y, Bergelson JM.** Adenovirus receptors. *J Virol* 2005; 79:12125-31.
3. **De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van Dillen P, Van Doornum GJ, et al.** Adenoviruses from human immunodeficiency virus-Infected Individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3940-5.
4. **Shenk T.** Adenoviridae: The viruses and their replication. En: Fields DM, Knipe PM, Howley *et al.* *Fields Virology*. 3a Edición. Philadelphia. Lippincott Raven Publishers. 1996; 2111-71.
5. **Schmitz H, Wigand R, Heinrich W.** Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 1983; 117: 455-66.
6. **Horwitz MS.** Adenoviruses. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM editores. *Virology*. 3a Edición. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers 1996. p 2149.
7. **Kajon AE, Mistchenko AS, Videla C, Hortal M, Wadell G, Avendaño LF.** Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the south cone of South America (1991-1994). *J Med Virol* 1996; 48:151-6.
8. **Brown RS, Nogrady MB, Spence L, Wiglesworth FW.** An outbreak of adenovirus type 7 infection in children in Montreal. *Can Med Assoc J* 1973; 108: 434-9.
9. **Carballal G, Videla C, Misirlian A, Requeijo PV, Aguilar Mdel C.** Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in argentine children. *MBC Pediatr* 2002; 2:6.
10. **Chen HL, Chiou SS, Hsiao HP, Ke GM, Lin YC, Lin KH, et al.** Respiratory adenoviral infections in children: a study of hospitalized cases in southern Taiwan in 2001-2002. *J Trop Pediatr* 2004; 50:279-84.
11. **Lang WR, Howden CW, Laws J y Burton JF.** Bronchopneumonia with serious sequelae in children with evidence of adenovirus type 21 infection. *Br Med J* 1969; 1:73-9.
12. **Similä S, Linna O, Lanning P, Heikkinen E, Ala-Houhala M.** Chronic lung damage caused by adenovirus type 7: a ten-year follow-up study. *Chest* 1981; 80:127-31.
13. **Spiegelblatt L, Rosenfeld R.** Hyperlucent lung: long-term complication of adenovirus type 7 pneumonia. *Can Med Assoc J* 1983; 128:47-9.
14. **Pumariega T, Savón C, Muné M, Cancio R, González G, Valdivia A, et al.** Isolation and identification of adenovirus in hospitalized children, under five years, with acute respiratory disease, in Havana, Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95:859-61.
15. **Ayashi S.** Latent adenovirus infection in COPD. *Chest* 2002; 121:183S-7.
16. **Ogawa E, Elliott WM, Hughes F, Eichholtz TJ, Hogg JC, Hayashi S.** Latent adenovirus infection induces production of growth factors relevant to airway remodeling in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286:L189-97.
17. **PAHO/WHO/CDC (1997).** Diagnosis of influenza and other respiratory viruses. Course Manual. April 21-25. Santiago, Chile.
18. **Crawford-Miksza LK, Schnurr DP.** Quantitative colorimetric microneutralization assay for characterization of adenovirus. *J Clin Microbiol* 1994 ; 32:2331-4.
19. **Wood SR, Sharp IR, Caul EO, Paul I, Bailey AS, Hawkins M, et al.** Rapid detection and serotyping of adenovirus by direct immunofluorescence. *J Med Virol* 1997; 51:198-201.
20. **Elsom BL, Herzog NK.** Rapid method for preparing adenovirus DNA. *Biotechniques* 1997; 22: 868-70.

Adenovirus e infección respiratoria aguda en mexicanos

21. **Johansson ME, Andersson MA, Thörner PA.** Adenoviruses isolated in the Stockholm area during 1987-1992: restriction endonuclease analysis and molecular epidemiology. *Arch Virol* 1994; 137:101-15.
22. **Kajon AE, Suarez MV, Avendaño LF, Hortal M, Wadell G.** Genome type analysis of South American adenoviruses of subgenus C collected over a 7-year period. *Arch Virol* 1993; 132:29-35.
23. **Vargosko AJ, Kim HW, Parrott RH, Jeffries BC, Wong D, Chanock RM.** Recovery and identification of adenovirus in infections of infants and children. *Bacteriol Rev* 1965; 29:487-95.
24. **Brandt CD, Kim HW, Vargosko AJ, Jeffries BC, Arrobio JO, Rindge B, et al.** Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *Am J Epidemiol* 1969; 90:684-500.
25. **Herbert FA, Wilkinson D, Burchak E, Morgante O.** Adenovirus type 3 pneumonia causing lung damage in childhood *Can Med Assoc J* 1977; 116:274-6.
26. **Lang WR, Howden CW, Laws J, Burton JF.** Bronchopneumonia with serious sequelae in children with evidence of adenovirus type 21 infection. *Br Med J* 1969; 1:73-9.
27. **Mejía-López H, Matías-Florentino M, Vélez-Montoya R.** Identificación por métodos moleculares de adenovirus asociados a conjuntivitis. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2006; 81:375-82.
28. **Don Winner.** Nothing weird killing kids in Panamá-just the usual stuff <http://www.panama-guide.com/article.php/20071006141754803>
29. **Erdman DD, Xu W, Gerber SI, Gray GC, Schnurr D, Kajon AE, et al.** Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. *Emerg Infec Dis* 2002; 8:269-77.
30. **Pizarro SC, Ortega-P O.** Investigación de anticuerpos hacia los adenovirus II. Anticuerpos específicos de tipo. *Rev Lat-amer Microbiol* 1962; 5:153-58.
31. **Pizarro E, Reséndiz-Lara J, Quintero-Marmol E, Arreguín-Macín L.** Investigación de anticuerpos hacia los adenovirus: III. Estudio en dos comunidades cerradas. *Rev Lat-amer Microbiol* 1966; 8:9-12.
32. **Pizarro E, Reséndiz-Lara J.** Aislamiento de adenovirus tipo 2. Estudio de un brote en la casa de cuna. *Rev Invest Pública* 1967; XXVII: 233-43.
33. **López-Martínez I, Flores-León R, Fuentes-Rosas E.** Infecciones respiratorias agudas (IRAS) de Etiología Viral en México. *Epidemiología*. 18 (41).Secretaría de Salud. México. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2001/sem41/edit41.PD>