



# **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Infectómica y Patogenésis Molecular

## **Detección de Calicivirus humanos y Rotavirus en infantes con diarrea aguda de la ciudad de Mérida Yucatán, México.**

Tesis que presenta

**Joel Ramírez Ricardo**

Para obtener el título de

**Maestro en ciencias**

En la especialidad de

**Infectómica y Patogénesis Molecular**

Directora de tesis:

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Asesores:

Dra. Rosa María del Ángel

Dr. José Luis Rosales Encina

Ciudad de México, 23 de Marzo de 2018



**Agradecimientos:**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo con el otorgamiento de la beca con n° de registro 585507, al Proyecto del fondo sectorial de salud de CONACYT n°261257 y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por el patrocinio para realizar este proyecto de maestría que lleva por nombre: **“Detección de Calicivirus humanos y Rotavirus en infantes con diarrea aguda de la ciudad de Mérida Yucatán, México”**.

### **A mi directora de tesis:**

Debo agradecer de manera especial y sincera a la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano por aceptarme en su laboratorio para realizar esta tesis de maestría bajo su dirección, por todo su apoyo, confianza y capacidad para orientarme durante el desarrollo de la misma. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Muchas gracias Dra. Lorena.

### **A mis sinodales:**

Quiero hacer extensiva mi gratitud a mis sinodales, a la Dra. Rosa María del Ángel y al Dr. José Luis Rosales por su disposición y tiempo para revisar mis avances de tesis hasta su culminación.

### **A la auxiliar y el técnico de laboratorio:**

A la Dra. Clotilde Cancio Lonches por sus consejos y aportaciones durante la realización de este proyecto, a nuestro técnico Luis Echeverría por su colaboración en el suministro de los materiales necesarios para la realización de la parte experimental.

### **A mis compañeros de laboratorio:**

A mis compañeros de laboratorio: Oscar (Eddie el sombreado), Adriana, Adrian, Juan Carlos, Brenda, Samantha, Jakof y Eduardo por su amistad y colaboración.

### **A mis padres:**

A mi papá Silvino (†) que a pesar de ya no estar conmigo, él siempre será un pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica como en la vida, sin los consejos que me dejaste no lo hubiese logrado mi viejo. A mi mamá Delfina, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

### **A mis Hermanos:**

A mis hermanos Ricardo, Polo, Jero, Soco Toña, Nachita, Silvi y Javi por estar conmigo y apoyarme siempre, especialmente a ustedes Toña y Nachita, por darme ánimos y nunca

dejar de creer en mí, ¡los quiero mucho!, y por último, desde el fondo de mi corazón agradezco a mi hermana Reyna (†) por ser el ejemplo de la cual aprendí el deseo de superación, porque fue y seguirá siendo el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, por sus siempre tan sabios consejos, te agradezco ese enorme corazón que tuviste, siempre te recordaré.

**A mi esposa May:**

Por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por su apoyo incondicional y ánimo que me brinda día con día para alcanzar nuevas metas: tanto profesionales como personales. No fue sencillo culminar con éxito este proyecto. Sin embargo, siempre fuiste muy motivadora y esperanzadora, me decías que lo lograría, me ayudaste hasta donde te fué posible, incluso más que eso, gracias totales mi amor.

**Dedicatoria:**

**“Esta tesis está dedicada a mi hermoso ángel que muy pronto tendremos en nuestros brazos, te estamos esperando con ansias bebé”**

## ÍNDICE GENERAL

PÁGINA

ÍNDICE GENERAL	I
ABREVIATURAS	II
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 GENERALIDADES	1
1.2 Clasificación	2
1.3 Genoma y estructura	4
1.4 Ciclo Replicativo de los norovirus y rotavirus	6
1.4.1 Norovirus	6
1.4.2 Rotavirus	8
1.5 Transmisión, sintomatología y aspectos clínicos	9
1.6 Control y prevención	10
1.7 Diagnostico	11
1.8 Epidemiología	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. OBJETIVOS	15
5. DISEÑO METODOLÓGICO	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
7. RESULTADOS	21
8. DISCUSIÓN	34
9. CONCLUSIÓN	38
10. PERSPECTIVAS	38
11. BIBLIOGRAFÍA	39
12. ANEXOS	46

## **ABREVIATURAS**

**GA.** Gastroenteritis Aguda.

**EDA.** Enfermedad Diarreica Aguda.

**OMS.** Organización Mundial de la Salud.

**NLVs.** Norwalk-like viruses (actualmente denominados norovirus).

**HuCVs.** Calicivirus humanos.

**NoVs.** Norovirus.

**SaV.** Sapovirus.

**ORFs.** Marcos de lectura abiertos.

**VP1.** Proteína viral estructural 1.

**VP2.** Proteína viral estructural 2.

**VPg.** Proteína vinculada al genoma del virus.

**RdRp.** RNA polimerasa dependiente de RNA.

**GI.** Genogrupo I.

**GII.** Genogrupo II.

**GII.3.** Genotipo 3.

**GII.4.** Genotipo 4.

**CDC.** Centro de Control de Enfermedades.

**CR.** Complejos replicativos.

**RE.** Retículo endoplasmático.

**GAPDH.** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>TITULO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Micrografía electrónica de norovirus (Micrografía electrónica de partículas de norovirus).	3
2	Micrografía electrónica de partículas Rotavirus.	3
3	Organización genómica de los norovirus.	4
4	Electroforesis de los diferentes segmentos que componen al genoma de rotavirus.	6
5	Ciclo Replicativo de los Calicivirus.	7
6	Ciclo Replicativo de los Rotavirus.	9
7	Electroforesis de RNA total de muestras fecales	21
8	Rotaforesis para la detección de RNA de rotavirus en muestras fecales controles.	23
9	Rotaforesis para la detección de RNA de rotavirus en muestras fecales.	23
10	Porcentaje de positividad de rotavirus.	24
11	Detección de HuCVs en muestras fecales mediante la técnica de RT-PCR.	25
12	Amplificación del RNA de GAPDH de células CRFK mediante RT-PCR.	26
13	Amplificación de plásmido NVL-319 y 478.	27
14	Electroforesis del producto de la trascrición in vitro.	28
15	Amplificación por RT-PCR de un transcrito exógeno incluido en muestras fecales.	29
16	RT-PCR para la detección de HuCVs en heces	30
17	Porcentaje de positividad de HuCVs.	31
18	Coinfecciones entre HuCVs y Rotavirus.	32



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>TITULO</b>	<b>PAGINA</b>
1	Set de oligonucleótidos.	19
2	Brotos de gastroenteritis aguda por HuCVs.	33

## Resumen

Las gastroenteritis son la quinta causa de muerte en neonatos y niños menores de 5 años de edad, causando 1.8 millones de muertes al año. Principalmente, los virus del género Rotavirus y Calicivirus Humanos (HuCVs) son responsables de 450,000 y 50,000 muertes al año en niños <5 años respectivamente. Desde la introducción de una vacuna que protege contra las formas severas de la enfermedad diarreica por rotavirus, la incidencia y severidad de esta enfermedad se han reducido de manera importante, por lo que hoy en día, en los lugares donde se aplica esta vacuna los HuCVs son ahora reconocidos como los principales agentes patógenos entéricos causantes de brotes de gastroenteritis a nivel mundial. Los HuCVs incluyen a los géneros sapovirus y norovirus y están subdivididos en cinco genogrupos (GI a GV) que se dividen en veintisiete genotipos en el caso de norovirus y seis genotipos para sapovirus. Actualmente, el genotipo GII.4 de norovirus es el más común en el ámbito mundial. Así, el objetivo de este estudio fue identificar molecularmente casos de HuCVs y Rotavirus asociados a cuadros de gastroenteritis aguda infantil en niños menores de 5 años que recurrieron al hospital, en la ciudad de Mérida, Yucatán, México. Para ello se utilizaron las técnicas de RT-PCR y Rotaforesis respectivamente. El material de estudio consistió de 99 muestras fecales de niños menores de 5 años con gastroenteritis aguda durante 2013. Los resultados mostraron que 57/99 (57.6%) de las muestras analizadas fueron positivas para HuCVs mientras que 23/99 (23.2%) fueron positivas para Rotavirus y 32/99 (32.4%) resultaron negativas para ambos agentes. Así mismo, 13/99 (13.2%) fueron casos de coinfección. Los resultados de este trabajo sugieren que los HuCVs son una causa importante de generación de GA en la ciudad de Mérida, lo cual, podría ser un reflejo de lo que ocurre a nivel nacional. Sin embargo, hacen falta más estudios en diferentes regiones del país para determinar el papel que tienen estos virus en las gastroenteritis producidas en la República Mexicana.

## **Abstract**

Gastroenteritis is the fifth cause of death in neonates and children under 5-years of age, causing about of 1.8 million deaths per year. Rotaviruses and Human Caliciviruses (HuCVs) are responsible for 450,000 and 50,000 deaths per year in this population respectively. Since the introduction of the rotavirus vaccine that protects against the severe forms of the disease, the incidence and severity of rotavirus infections have diminished importantly; thus, nowadays, HuCVs are recognized as the principal enteric pathogenic causative of outbreaks of gastroenteritis worldwide. HuCVs include members of the genus Sapovirus and Norovirus, subdivided into five genogroups (GI to GV) that are subdivided into twenty-seven genotypes in the case of noroviruses and six genotypes for sapoviruses. Nowadays, the norovirus GII.4 is the most common worldwide. Thus, the aim of this study was to molecularly identify the presence of HuCVs and Rotavirus associated with gastroenteritis in children less that 5-year of age, which were remitted to the hospital, in the city of Merida, Yucatan, Mexico. For these propose, RT-PCR and Rotaforesis techniques were used respectively. The material of study consisted of 131 fecal samples from children less than 5-years of age, with gastroenteritis symptoms, during 2013. The results showed that 57/99 (57.6%) of the analyzed samples positive for HuCVs whereas 23/99 (23.2%) was positive for Rotavirus. 32/99 (32.4%) resulted negative for both agents. Moreover, 13/99 (13.2%) were found to be co-infections. This work suggests that the HuCVs are an important agent of gastroenteritis in the city of Merida, and might reflect its importance at a national level. Nevertheless, more studies are needed in different regions of the country to determine the role these viruses in the gastroenteritis produced in the Mexican Republic.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde la introducción de la vacuna que protege de las formas graves de la enfermedad diarreica causada por rotavirus, los calicivirus humanos (HuCVs) son reconocidos cada vez más frecuentemente como uno de los principales agentes patógenos entéricos causantes de brotes de gastroenteritis (GA) no bacteriana, así como de casos esporádicos que afectan a toda la población alrededor del mundo. Se estima que más 200 millones de estos casos y 50,000 muertes de gastroenteritis por HuCVs ocurren en niños menores de 5 años de edad, la mayoría de los cuales se producen en países en vías de desarrollo. Debido a la escasez de información sobre la caracterización molecular de los HuCVs que circulan en México, el objetivo de este trabajo fue determinar la incidencia de HuCVs mediante el diagnóstico molecular, en la población infantil de la ciudad de Mérida, Yucatán. Este estudio permitió detectar una asociación de la presencia de estos virus entéricos en los casos de enfermedad diarreica en infantes menores de 5 años de edad.

### 1.1 GENERALIDADES

La gastroenteritis es una enfermedad caracterizada por la inflamación ("*itis*") del tracto gastrointestinal que está compuesto por el estómago ("*gastro*") y el intestino delgado ("*entero*"), sus principales síntomas son la presencia de diarrea acuosa, náuseas, vómito, y calambres en el estómago [1]. De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la gastroenteritis es la segunda causa de mortalidad en neonatos y niños menores de 5 años, generando aproximadamente 1.8 millones de muertes al año [2]. Los agentes infecciosos causantes de gastroenteritis incluyen una gran variedad de parásitos, bacterias y virus; estos últimos son una de las principales causas de diarrea asociada a enfermedad y muerte en infantes y adultos mayores en todo el mundo [3].

Aun cuando la frecuencia de las gastroenteritis causadas por bacterias o parásitos se ha reducido como consecuencia de mejoras en las medidas higiénicas relacionadas con el consumo de agua y alimentos y el saneamiento del agua,

estas no han impactado considerablemente en la disminución de las producidas por virus entéricos [2].

Los virus que causan enfermedades gastrointestinales afectan a poblaciones alrededor del mundo; entre estos se encuentran principalmente los rotavirus, calicivirus, astrovirus y adenovirus. Todos ellos representan un grave problema de salud pública, debido a la alta prevalencia tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, ya que ocurren de forma endémica y epidémica. Particularmente, los rotavirus han sido por décadas, la causa principal de muerte asociada a enfermedades diarreicas en niños menores de 5 años, donde se estima que causan entre 120,000 a 215,000 muertes al año [4]; sin embargo, con la aplicación de las vacunas que protegen contra las formas graves de la infección, la incidencia y severidad de esta enfermedad se han reducido de manera importante en los últimos años. Hoy en día, en algunos de los países en los que se aplica la vacuna contra rotavirus, se ha determinado que la causa pediátrica más común de enfermedad viral entérica en hospitales es la infección por calicivirus humanos (HuCVs) [5, 6].

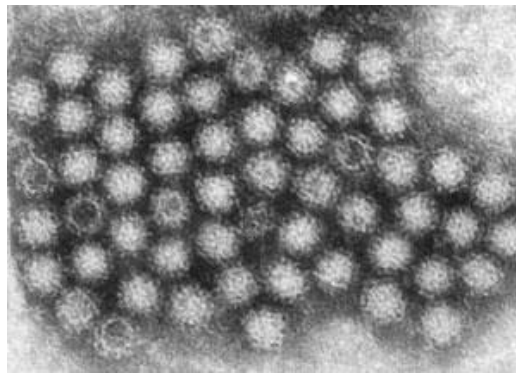
Se ha establecido que los HuCVs, son responsables de brotes de gastroenteritis (GA) así como de casos esporádicos que afectan a toda la población. A nivel mundial, se estima que los norovirus son la causa más común de brotes de GA [7], y responsables de 685 millones de casos cada año (18% del total de los brotes de GA, valor que aumenta al 58% cuando se consideran únicamente los brotes de origen alimentario). Aproximadamente 200 millones de estos casos ocurren en niños menores de 5 años de edad. Esto conduce a un estimado de 50.000 muertes infantiles cada año, las cuales ocurren principalmente en países en vías de desarrollo [8, 9].

## **1.2 Clasificación**

La familia *Caliciviridae* está conformada por pequeños virus esféricos de 25 nm de diámetro, con un genoma de RNA de cadena sencilla y de polaridad positiva, que infectan a una gran variedad de animales y a los humanos, provocando una amplia gama de enfermedades [10]. Actualmente se dividen en cinco

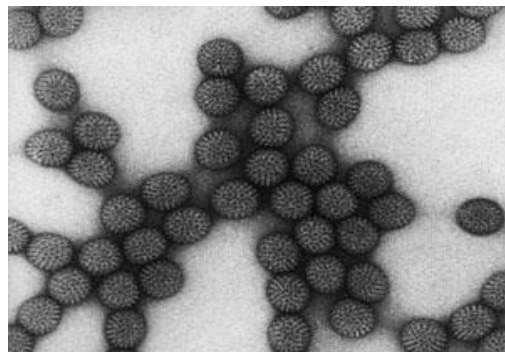
géneros: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Nebovirus*, *Sapovirus* y *Norovirus*, estos dos últimos denominados HuCVs, han recibido una mayor atención debido a que son agentes etiológicos de gastroenteritis aguda en todo el mundo (AGE) [11].

Los miembros del género *Norovirus* (NoVs) (Figura 1) se clasifican en 7 genogrupos (G) que a su vez se subdividen en treinta genotipos. Los NoVs que pertenecen a los genogrupos GI, GII y GIV son los que infectan a humanos [12, 13], mientras que los que pertenecen a los GII, GIII, GIV, GV, GVI y GVII infectan a animales. [14]. Hasta la fecha, no se han reportado infecciones zoonóticas por norovirus, pero hay una clara evidencia de la posibilidad de transmisión de estos virus de animales al humano [15].



**Figura 1. Micrografía electrónica de partículas de norovirus TEM.** CDC/ Charles D. Humphrey

Por otro lado, los rotavirus pertenecen a la familia Reoviridae. Son virus sin envoltura, icosaédricos, de 70 nm de diámetro y presentan una cápside proteica de tres capas que rodea a un genoma de 11 fragmentos de RNA de doble cadena. Su forma semeja a la de una rueda de carreta (Figura 2) [16].

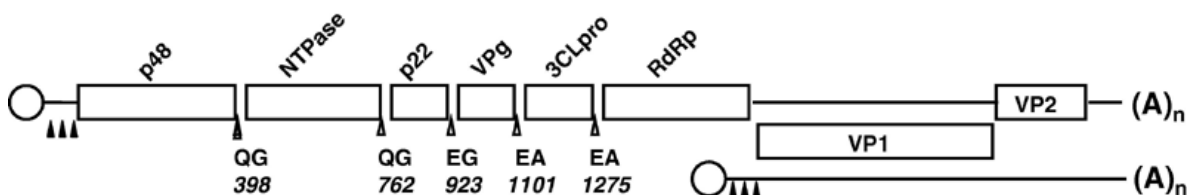


**Figura 2 Micrografía electrónica de partículas de Rotavirus.** TEM. Forma de "rueda de carreta".  
 CDC/ Dr. Erskine Palmer.

Se clasifican en 7 grupos (A - G) y 2 subgrupos (SGI y SGII). Asimismo, se ha agrupado al rotavirus A en genotipos G y P, con base en variaciones en las proteínas superficiales de la cápside VP7 (genotipo G) y VP4 (genotipo P). Las proteínas VP4 y VP7 inducen una importante respuesta inmune, con producción de anticuerpos neutralizante. Los rotavirus de los grupos A, B y C son los agentes causales de la infección en humanos. Entre ellos, el grupo A es la principal causa de gastroenteritis severa en infantes y niños menores de 5 años a nivel mundial [17]. Los principales genotipos involucrados son G1, G2, G3, G4 y G9, los que, combinados con los tipos P8, P4 y P6, son responsables de >80% de los episodios de gastroenteritis asociados a rotavirus a nivel mundial [18]. Los rotavirus del grupo B y C son morfológicamente idénticos a los del grupo A, pero genética y antigénicamente diferentes y se han asociado a brotes diarreicos en niños, adolescentes y adultos.

### 1.3 Genoma y estructura de los norovirus y rotavirus.

El genoma de los norovirus es un RNA de cadena sencilla y sentido positivo que consta de aproximadamente de 7.7 Kb en el cual existen tres marcos de lectura abiertos (ORFs). En el extremo 5' se encuentra una proteína unida covalentemente al genoma viral conocida como VPg y en el extremo terminal 3' el RNA está poliadenilado [19, 20] (Figura 3).



**Figura 3. Organización genómica de los norovirus.**

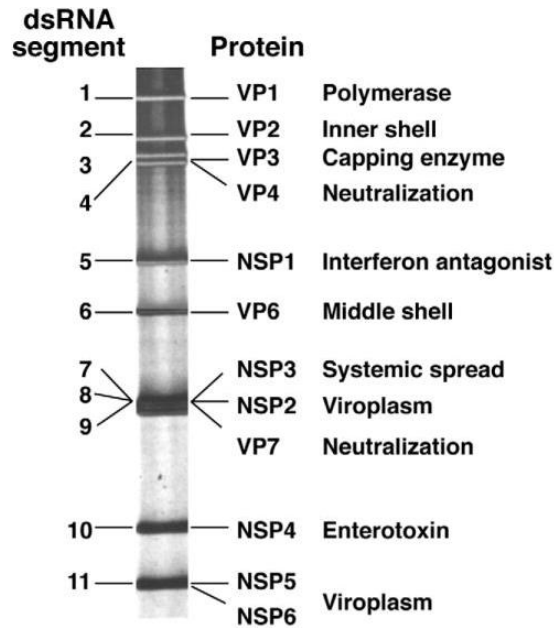
El ORF1 codifica a una poliproteína que da origen a las proteínas no estructurales (NS) , entre las cuales se encuentran una proteasa que procesa a la poliproteína viral, y la polimerasa de RNA; los ORF 2 y 3 codifican a las proteínas estructurales mayoritaria (Vp1) y minoritaria (Vp2) de la cápside respectivamente, a partir de un RNA subgenómico (sgRNA) [21].

Las secuencias de proteínas como la replicasa viral (RdRP) y la mayoritaria de la cápside (VP1), contienen regiones conservadas, debido a la importancia de las funciones que realizan. Es por ello que estas secuencias conservadas son utilizadas como blancos para la detección molecular de un amplio espectro de genotipos.

A diferencia de los calicivirus, el genoma de rotavirus está constituido por once segmentos de RNA de doble cadena, cuyos tamaños varían de aproximadamente 660 pb del gen más pequeño, hasta aproximadamente 3300 pb para el gen más grande y codifican para seis proteínas estructurales y seis proteínas no estructurales [22].

Esta diferencia de tamaños permite que estos segmentos al ser separados electroforéticamente presenten un patrón característico, típico y único para los rotavirus, lo que ha sido la base para desarrollar un método para su diagnóstico. En general el patrón electroforético, o electroferotipo, consiste de un grupo de cuatro segmentos de RNA (1-4) de alto peso molecular; 5 segmentos de tamaño mediano (5 a 9) que incluyen un triplete muy característico formado por los segmentos 7, 8 y 9; y los dos segmentos más pequeños 10 y 11.





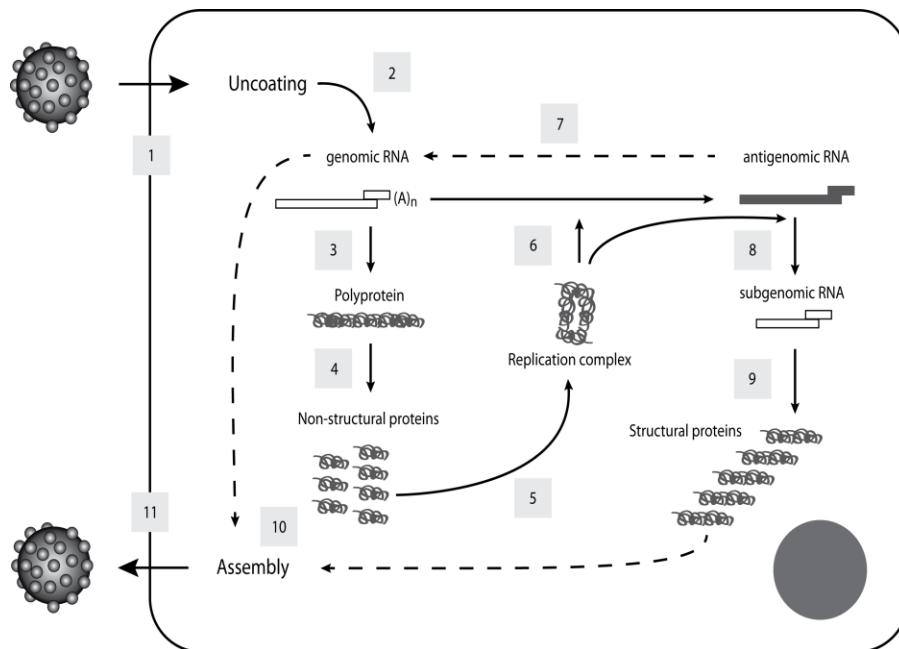
**Figura 4. Electroforesis de los diferentes segmentos que componen al genoma de rotavirus.** El genoma viral de 11 segmentos de RNA bicatenario se analiza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Cada gen codifica para al menos una proteína con al menos una función principal [16].

## 1.4 Ciclo Replicativo de los norovirus y rotavirus.

### 1.4.1. Norovirus.

Los calicivirus inician su ciclo replicativo con la interacción del virión al receptor celular y su ingreso hacia el interior de la célula [23]. Se conoce que durante la unión del virus a la célula blanco, participan estructuras de hidratos de carbono, que en el caso de HuCVs incluyen los antígenos de grupo sanguíneo (HBGAs) [24, 25]. Se desconoce la participación de alguna molécula de origen proteico en la entrada del virus, sin embargo, una vez que la cápside se encuentra en el citoplasma celular, el RNA que está ligado covalentemente a VPg [26, 27] es liberado y éste se comporta como un RNAm que es traducido mediante la participación de la proteína VPg, que hace las veces de Cap proteinaceo, y que es reconocido por factores del inicio de traducción celular dando lugar a la síntesis de las proteínas virales no estructurales (NS). Estas proteínas son indispensables para la replicación del RNA viral [28, 29] ya que se localizan en el retículo

endoplásmico, en donde inducen la generación de los complejos de replicación (CR). En estos CR, el RNA es reclutado y utilizado como molde para la síntesis de RNAs de polaridad negativa que a su vez sirven como moldes para la síntesis de múltiples copias de RNA de polaridad positiva que constituyen a los genomas de la progenie viral. En estos CR también se sintetizan los RNAs subgenómicos, a partir de los cuales se producen las proteínas estructurales que formarán a las cápsides virales. La formación de las cápsides y el empaquetamiento del RNA genómico, conocido como morfogénesis, ocurre de manera concomitante. El proceso de salida del virus aún no está completamente esclarecido, sin embargo, se ha propuesto que la inducción de la apoptosis producida por la infección, ocurre para favorecer la salida de la progenie viral y su dispersión en el huésped (figura 5) [30, 31].

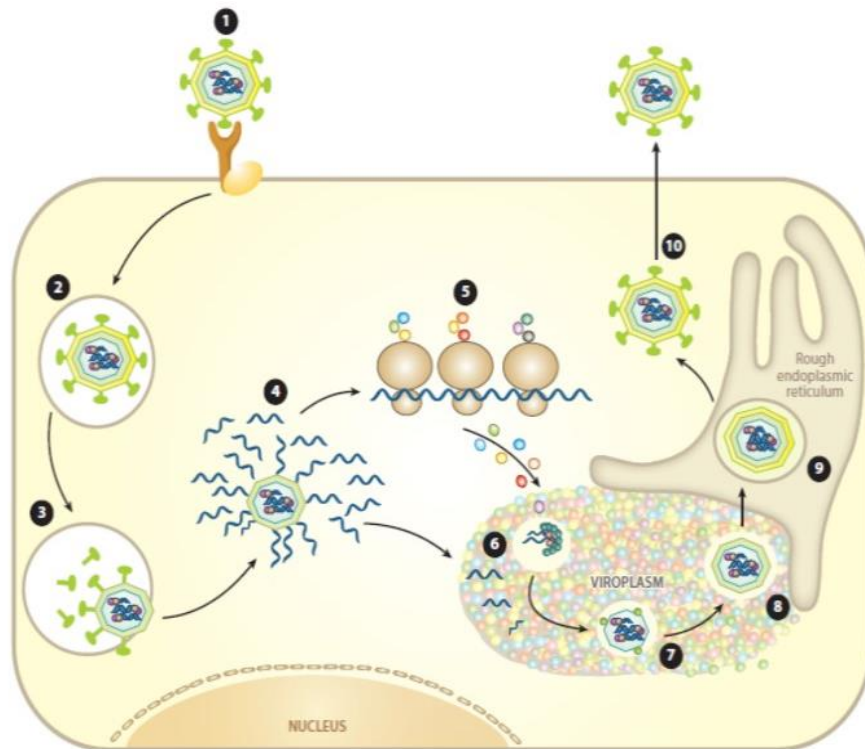


**Figura 5. Ciclo replicativo de los calicivirus.** 1) unión del virus a su receptor. 2) Liberación del RNA genómico al espacio citoplasmático. 3) Traducción del RNAm a una poliproteína en el RE. 4). Incisión de la poliproteína dando origen a las proteínas no estructurales. 5). Formación de los complejos replicativos en el RE. 6) Transcripción del RNA genómico a un RNA antígenómico, 8) transcripción del RNA antígenómico a RNAs subgenómicos y genómicos. 9) Traducción del RNA subgenómico a las proteínas estructurales. 10) Ensamble de las partículas virales. 11. Salida de las partículas virales por apoptosis.

### **1.4.2. Rotavirus**

El ciclo replicativo de rotavirus comienza con la unión del virión a sialo-glicanos [32] o antígenos del grupo histo-sanguíneo (HBGA) [33] en la superficie de la célula huésped, seguido de interacciones con otros receptores celulares, incluyendo integrinas y Hsc70 [34]. El virus es luego internalizado por endocitosis mediada por receptor y su internalización por endocitosis. Una vez que el rotavirus penetra al interior de la célula pierden su capa de proteína exterior, con lo cual se activa la transcripción que depende de la RNA polimerasa viral (VP1). Esto da lugar a 11 transcritos de RNA que codifican 12 proteínas virales así los RNAs recién sintetizados que cumplen dos funciones: como mensajeros dirigiendo la traducción y como moldes para la síntesis de los RNAs complementarios. La selección, el empaquetamiento, y la replicación de los segmentos del genoma, así como la morfogénesis de las partículas de doble capa (DLPs), se llevan a cabo en estructuras electrondensas denominadas viroplasmas, que están compuestos de grandes cantidades de RNA y proteínas virales [35].

Una vez formadas, las DLPs abandonan el viroplasma, se dirigen al lumen del retículo endoplásmico rugoso donde se completa la maduración de la partícula viral. Los viriones maduros son liberados de la célula por lisis. Todo el ciclo replicativo de los rotavirus se lleva a cabo en el citoplasma celular, sin necesitar el núcleo de la célula [36].



**Figura 6. Ciclo replicativo de los rotavirus.** 1) Unión del virus a su receptor celular, 2) internalización por endocitosis, 3) liberación de la partícula viral de la vesícula endocítica, 4) liberación de los 11 segmentos de genoma viral, 5) activación de la transcripción, 6-8) selección, empaquetamiento, replicación de los segmentos del genoma, morfogénesis de las partículas de doble capa (DLPs) en estructuras electrondensas denominadas viroplasmos, 9) maduración de la partícula viral en el RER, 10) salida de la partícula viral por lisis celular.

### 1.5 Transmisión, sintomatología y aspectos clínicos.

Tanto los norovirus como los rotavirus son altamente contagiosos. Se transmiten principalmente por la vía fecal-oral, mediante el consumo de agua y alimentos contaminados o a través del contacto con personas infectadas; las infecciones por NoVs producen una típica infección gastrointestinal aguda que se autolimita [37]. Estos virus se pueden encontrar en las heces incluso antes de que comiencen a aparecer los síntomas y permanecer en ellas durante 2 semanas o más después de la desaparición de los mismos.

El periodo de incubación es corto y dura de 1 a 4 días; durante la infección con ambos virus, la principal sintomatología reportada es el vómito y la diarrea, y

también se puede presentar náuseas, dolor abdominal, dolor de cabeza, fiebre de bajo grado, y mialgia. La mayoría de las personas con enfermedad por HuCVs y rotavirus mejoran entre 2-5 días después de la aparición de los síntomas. La semejanza de la sintomatología entre ellas, así como de otras infecciones gastrointestinales producidas por otros agentes hace necesario el diagnóstico diferencial.

La enfermedad por norovirus afecta a todas las personas, y puede ser grave, especialmente en los niños pequeños y los adultos mayores, lo cual se asocia directamente con una inmunidad muy corta por lo que un individuo convaleciente está protegido contra una infección por el mismo serotipo por un periodo de entre 5 y 6 semanas [37]. Sin embargo, la protección es muy específica, de tal manera que puede infectarse con otro serotipo en este mismo periodo. En el caso de las infecciones por rotavirus, estos afectan principalmente a infantes, ya que se produce una inmunidad a largo plazo que los protege de infecciones subsecuentes graves [38]. Aunque la severidad de la infección por rotavirus se ha reportado mayor a la que ocurre por las infecciones causadas por los norovirus, esta última ha sido recientemente identificada como una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, y puede resultar en una enfermedad persistente a largo plazo [39]. Las infecciones asintomáticas producidas por cualquiera de los dos virus, pueden mantener la transmisión de la infección en la comunidad [40].

### **1.6 Control y prevención**

Las principales estrategias para el control de la infección por norovirus y rotavirus se basan en medidas generales como la higiene de manos, la desinfección de los objetos y superficies contaminadas y el aislamiento de los individuos infectados. Una vez adquirida la infección, el tratamiento es únicamente de soporte, principalmente para prevenir la deshidratación.

Para el caso de rotavirus, se han desarrollado dos vacunas que se aplican desde el 2006 y que han mostrado ser seguras y efectivas en los niños: Rotarix (monovalente) y RotaTeq (pentavalente) creadas con virus recombinantes

humanos y bovinos. Ambas se administran vía oral y contienen virus vivos atenuados. Desde su introducción hasta la fecha, la mortalidad por enfermedad diarreica por rotavirus se ha reducido considerablemente [65].

Para el caso de los norovirus, a pesar del gran impacto económico (pérdidas de 2 billones de dólares por año solamente en USA) y la considerable morbilidad causada, ningún fármaco o vacuna ha sido eficiente para prevenir o controlar el desarrollo de la enfermedad [41].

Estudios de la infección natural y en voluntarios han demostrado que la exposición repetida a los norovirus induce protección inmune a corto plazo, que no tiene una amplia reacción cruzada para la gran diversidad antigénica que presentan. Esto ha complicado los avances en la investigación para producir una vacuna capaz de prevenir una infección contra la mayoría de las cepas circulantes a nivel mundial, siendo el reto más grande a superar, la diversidad genética y antigénica [42].

### **1.7 Diagnóstico**

Las infecciones producidas por HuCVs y por rotavirus hoy en día, se basan en la detección de antígenos virales en heces o anticuerpos anti-antígenos virales en suero (ELISA). Para el caso particular de los rotavirus, los ensayos de retroforesis han sido ampliamente utilizados debido a su costo reducido y a las características de su genoma.

Por otro lado, la detección del RNA viral mediante la técnica de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), es considerada la prueba diagnóstica estándar de oro, adaptada en numerosos laboratorios de diagnóstico e investigación. Esta técnica ha sido aplicada para la detección de secuencias virales en muestras fecales, vómito, agua, alimentos y muestras ambientales, utilizando cebadores o “primers” para la amplificación de secuencias genómicas muy conservadas (regiones de la polimerasa viral o de la proteína mayoritaria de la cápside) en los distintos HuCVs [48]. Particularmente, la detección del genoma en muestras fecales ha sido una de las más complicadas, debido a la presencia de sales biliares y otros componentes que inhiben la actividad de las enzimas que amplifican las secuencias genómicas [43].

El aumento en el uso y disponibilidad de métodos de detección, han permitido establecer que los HuCVs son la causa más común de brotes de gastroenteritis epidémica y endémica en muchos países del mundo [5, 37]. Así mismo, dado que la sintomatología de las gastroenteritis producidas por virus es muy semejante entre sí y con la producida por infecciones bacterianas, el diagnóstico molecular diferencial es fundamental para poder proporcionar un tratamiento específico y con ello evitar el uso indiscriminado de antibióticos.

### **1.8 Epidemiología**

Los norovirus son reconocidos cada vez más como los principales agentes etiológicos causantes de gastroenteritis a nivel mundial [5]. Las cepas de norovirus y particularmente la GII.4 (genogrupo II genotipo 4) es el genotipo más frecuente en los brotes en todo el mundo [41, 44], aunque nuevas cepas de norovirus emergen aproximadamente cada 2 a 4 años. A menudo, pero no siempre, estas nuevas cepas conducen a un incremento de los brotes. Hoy en día, la cepa GII.4 2012, también llamada cepa Sidney, comenzó a detectarse en brotes y casos esporádicos en el mundo [45]. Recientemente, la cepa GII.17 o Kawasaki, que se originó a partir de la pandemia de GII.4 por una rápida diversificación genética en sublinajes, generó un grupo de virus pre-epidémicos, entre ellos, la nueva cepa que circula en Hong Kong, China continental y Japón [46].

En Latinoamérica, los patrones epidemiológicos y clínicos de las infecciones por norovirus presentan prevalencias semejantes a las reportadas en otros países [8,47]. Asimismo, se ha reportado un cambio en la relación de rotavirus/norovirus en las etiologías de la gastroenteritis, como ocurre en algunos países, que podría atribuirse en parte, a la cobertura de la vacuna contra el rotavirus en la población infantil y al resultado de la aplicación de métodos de diagnóstico para norovirus [5,6]. Como en el resto del mundo, no se observan diferencias en la distribución de los genotipos tanto en el medio ambiente (a través de la toma de muestras de aguas residuales) como entre los genotipos circulantes en pacientes sanos y

diarreicos. Por ello, se considera que las características epidemiológicas encontradas para las infecciones por HuNoV son semejantes en todo el mundo.

En México existe un número limitado de estudios sobre la frecuencia de los HuCVs como agentes etiológicos en casos esporádicos, o en brotes. Uno de los primeros realizado en el 2004, donde se utilizaron cebadores modificados que detectaban un número mayor de genotipos que el par original P289 y P290, que se había utilizado de manera estándar. Con ellos, se lograron caracterizar 25 cepas de sapovirus (16 de México) asociadas con brotes y casos esporádicos de gastroenteritis aguda en niños y adultos de diferentes localidades geográficas (EEUU, Argentina y México) [48]. También en este año, un estudio seroepidemiológico realizado en la zona rural de México, reportó la detección de anticuerpos y presencia de secuencias virales de virus de tipo Norwalk/cepa de México en menores de 4 años [49].

En el 2005 en un estudio de prevalencia, mediante RT-PCR se encontró a los Norovirus como agente causal de la diarrea del viajero entre extranjeros que visitaron México y Guatemala, y que cuando se encuentran en co-infección con enterobacterias, principalmente *E. Coli* enterotoxigenica, los síntomas son más severos y por mas días [50,51].

Gutiérrez Escolano y colaboradores en el 2010, analizaron muestras fecales de niños menores de 5 años con GA no asociada a otros patógenos, provenientes de tres hospitales de la ciudad de México para la detección de HuCVs en un periodo de marzo 1998-diciembre 2000. Se encontró que entre el 5.3% y 7.3% de las muestras positivas para NoV GII, como agente causal único [52].

Por último, Gómez-Santiago en el 2012, encontró que la cepa de norovirus GII.4 es el agente predominante en la EDA causada por HuCVs en niños mexicanos de que regiones varias regiones de la república mexicana [53], reportando una tasa de infección del 32% del total de las muestras analizadas.



## **2. Planteamiento del problema**

Determinar la frecuencia de diarreas infantiles causadas por HuCVs y compararla con la de Rotavirus y con la reportada en otros países

## **3. Justificación**

Las gastroenteritis virales representan un problema de salud pública importante, que impacta a la población en general y son causa de una elevada morbilidad y mortalidad en la población infantil. En las distintas ciudades de nuestro país, existe hacinamiento, consumo de alimentos de la venta callejera y falta de condiciones sanitarias adecuadas, por lo que es muy probable que los HuCVs representen un problema importante de salud pública en la población en general, y particularmente en la infantil. Es por ello, que consideramos de importancia el conocer la incidencia y los genogrupos circulantes de HuCVs para poder determinar su participación en los casos de enfermedad asociadas a diarrea en la población infantil del sureste de la República Mexicana y comparar los niveles encontrados con los de rotavirus.

## **4. Objetivos.**

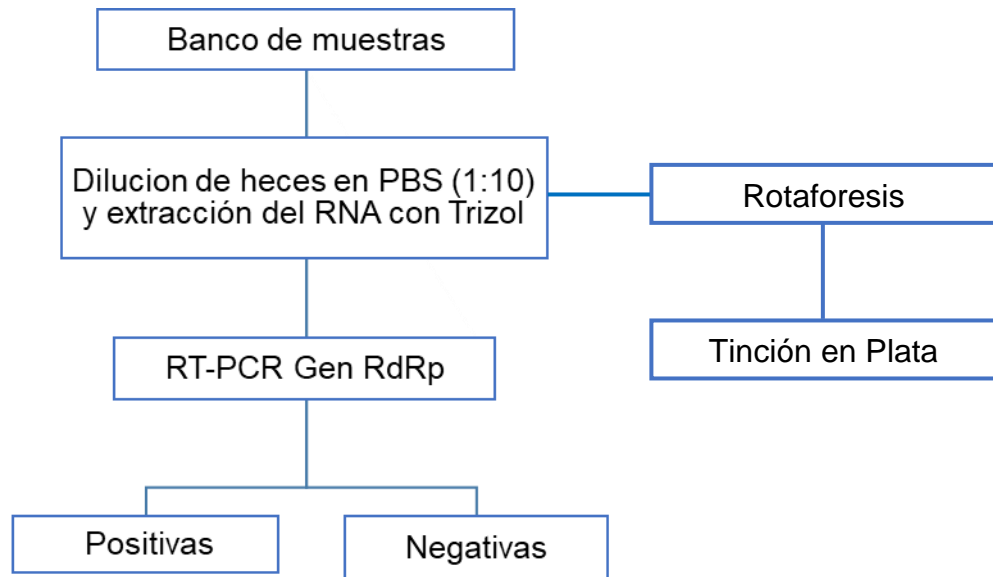
### **General**

Determinar la presencia de HuCVs y Rotavirus en muestras fecales de infantes menores de 5 años que recurrieron al hospital en la región suroeste de la República Mexicana.

### **Particulares**

- Establecer las condiciones metodológicas para la detección de rotavirus y HuCVs en muestras fecales.
- Evaluar la presencia de HuCVs y Rotavirus en las muestras fecales provenientes de niños con GA que recurrieron al hospital en el Sureste de la República Mexicana.

## DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



Esquema general de trabajo.

## **5. DISEÑO METODOLÓGICO**

### **Tipo de estudio:**

Corte transversal retrospectivo.

### **Lugar donde se realizó el estudio:**

La región del Suroeste (Hospital Corea, Mérida, Yucatán) de la República Mexicana.

### **Población objetivo:**

- Infantes menores de 5 años, que acudieron al hospital con un cuadro agudo de gastroenteritis.

### **Tipo de muestreo:**

Aleatorio simple.

### **Criterios de inclusión:**

Muestras fecales de niños que recurrieron al hospital por diarrea aguda.

Se consideró muestra diarreica a aquella que cumplió con las características de:

- Consistencia acuosa.
- Tres o más evacuaciones de heces acuosas en un periodo de 24hrs.

### **Criterios de exclusión:**

- Niños que tienen malformaciones en el tracto intestinal.
- Enfermedad intestinal crónica.
- Niños que han recibido antibióticos por más de 2 días.
- Niños mayores de 5 años.

### **Tamaño de la muestra:**

131 muestras.

### **Análisis estadístico:**

Software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Una  $P < 0.05$  se considerara como estadísticamente significativo.

### **Consideraciones éticas:**

Se solicitó la autorización de los padres de familia para realizar este estudio (Formato de consentimiento informado en Apéndice). Se informó a los participantes sobre los objetivos del estudio y se solicitó su consentimiento para la toma de muestra. La información proporcionada es confidencial.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **Colecta de muestras.**

Las muestras fecales fueron colectadas en el Hospital Corea, Mérida, Yucatán el cual está vinculado a la Universidad de Yucatán y el Cinvestav, en un periodo de dos años (2015 – 2017). Las muestras colectadas fueron enviadas al laboratorio 9 de virología que está a cargo de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano.

### **Especímenes fecales.**

Las muestras fecales de infantes menores de 5 años que acudieron al hospital con un cuadro agudo de gastroenteritis fueron colectadas por los médicos residentes del hospital, en contenedores de un volumen aproximado de 15 ml. Todas las muestras que se recolectaron en un periodo de dos años (2015 - 2017) fueron transportadas al laboratorio en hielo seco y se almacenaron en un ultra congelador a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , con ello se comenzó el banco de muestras fecales para su posterior análisis.

### **Extracción del RNA total.**

Se realizó una suspensión fecal en una proporción entre 1:10 y 1:20 en amortiguador de fosfato salino (PBS) que se mezcló mediante el uso de un vortex; de esta dilución se tomaron 200 $\mu\text{l}$  a los que se les añadió un 1ml de Trizol para posteriormente obtener mediante centrifugaciones, el RNA total de cada una de ellas según el protocolo descrito por el fabricante (Life Technologies) (ANEXO I). El RNA fue resuspendido en 30 $\mu\text{l}$  de agua DEPC (Dietilpirocarbonato) y se almacenó en un ultracongelador a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Transcripción reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).**

La reacción de RT-PCR para obtener el cDNA, se realizó utilizando el Kit “M-MLV Reverse Transcriptase” según las especificaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific) (ANEXO II). Los amplicones de las secuencias virales se obtuvieron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final (ANEXO III), utilizando un set de oligonucleótidos que se ha empleado para la

amplificación de una secuencia de 319nt de una región conservada en los distintos genogrupos de HuCVs que codifica a la polimerasa viral (cuadro 1). La presencia de los amplicones se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y aquellas en las que se observó el amplicón del tamaño esperado (319nts), fueron consideradas como positivas.

Como controles de las reacciones de RT-PCR se utilizaron: 1) el RNA de una muestra fecal positiva para norovirus, 2) un transcrito de 478 bases como control interno de la reacción de RT-PCR que consiste en la región de 319nts del virus NV y una secuencia de 159nt que se insertó en medio de esta secuencia, y que es amplificada mediante RT-PCR con los mismos oligonucleótidos usados para la reacción de amplificación [48]. Como control de PCR se utilizó un plásmido que contiene el genoma completo del NV.

**Tabla.1.** Set de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de una secuencia de 319nt de la región que codifica a la RNA polimerasa viral de distintos genogrupos de HuCVs [48].

Nombre	Secuencia 5´ - 3´	Sentido	Localización	Tm°	GC%	Dímeros
<b>p290</b>	GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	Positivo	4354–4376	64.7	52.1	No
<b>p290H</b>	GATTACTCCAGGTGGGACTCCAC	Positivo	4354–4376	66.8	56.5	No
<b>P290I</b>	GATTACTCCAGGTGGGACTCAAC	Positivo	4354–4376	64.7	52.1	No
<b>P290J</b>	GATTACTCCAGGTGGGATTCAAC	Positivo	4354–4376	64.4	47.8	No
<b>P290k</b>	GATTACTCCAGGTGGGATTCCAC	Positivo	4354–4376	66.5	52.1	No
<b>P289</b>	TGACAATGTAATCATCACCATA	Negativo	4663–4684	57.8	31.8	No
<b>P289H</b>	TGACGATTTTCATCATCACCATA	Negativo	4663–4684	62.7	36.3	No
<b>P289I</b>	TGACGATTTTCATCATCCCCGTA	Negativo	4663–4684	68.2	45.4	No

### **Ensayo de rotaforésis (RNA-PAGE) y tinción con Nitrato de Plata**

El RNA-PAGE (Rotaforesis) se realizó según el procedimiento descrito por Laemmli (1970) y Herring., et al. (1982) [54, 55] con pequeñas modificaciones seguido por tinción de plata para determinar la presencia de rotavirus (ANEXO III). Brevemente, las muestras de RNA recién extraídas, se incubaron a 56°C durante 5-10 minutos para disolver la pastilla. Posteriormente, se mezclaron 10µl de la muestra de RNA con 5µl de buffer de carga 6X (ANEXO III) para RNA/DNA sobre papel de cera de parafina y se cargaron en los pocillos de un gel al 7.5%. El gel se sometió a electroforesis a voltaje constante (100V) hasta que el colorante alcanzó el fondo del gel (generalmente entre 1-1.5 horas).

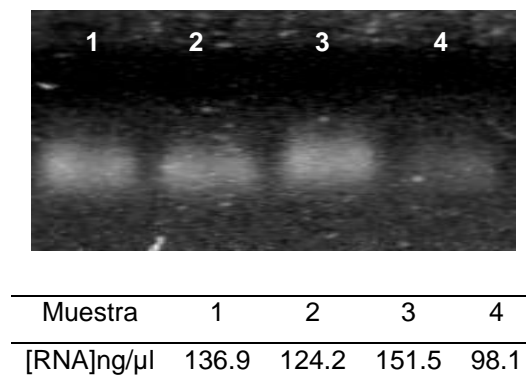
La tinción del gel se llevó a cabo según el protocolo estandarizado por Kumar (2006) donde los geles se mantuvieron en una solución de fijación (ácido acético glacial al 0.5% en etanol al 10%) durante 30 minutos, seguido de tinción con plata (0.185 g de nitrato de plata en 100mL de agua destilada) durante 30 min. Después de esto, los geles se mantuvieron en una solución reveladora (3g de NaOH en 100mL de agua destilada y 0.75mL de formaldehído) durante 10-15min o hasta alcanzar las 11 bandas características del genoma de rotavirus, seguido de solución de paro (5% de ácido acético glacial) [56]. Los geles fueron observados a simple vista y foto-documentados.

## 7. RESULTADOS

Se recibieron 131 muestras provenientes del Hospital Corea de la ciudad de Mérida Yucatán, las muestras con código de identificación fueron ordenadas y almacenadas en un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Obtención del RNA viral de muestras fecales.

La detección de genomas y secuencias de virus con genomas de RNA presentes en muestras fecales se lleva a cabo mediante distintas metodologías; una de las más comúnmente utilizadas es la de la extracción de RNA total mediante el método de trizol. Esta, permite obtener tanto las secuencias de RNA libre presentes en la muestra, como el que se encuentra dentro de las cápsides virales. Mediante esta metodología, obtuvimos el RNA total de las muestras fecales, y esta fue cuantificada mediante el uso de un NanoDrop™, y visualizada en geles de agarosa al 0.8% para determinar su integridad. (Figura 7).



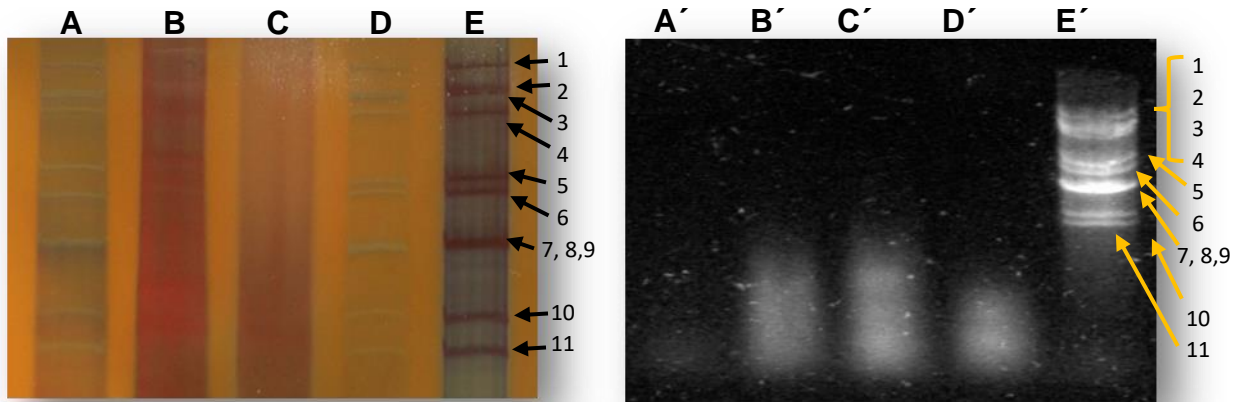
**Figura 7. Electroforesis de RNA total de muestras fecales.** RNA extraído de 4 muestras fecales analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y cuantificados por NanoDrop™.



Mediante esta metodología de trizol obtuvimos distintas cantidades de RNA de cada una de las muestras analizadas, las cuales fueron cuantificadas y utilizadas en concentraciones constantes para detectar la presencia de RNA de rotavirus mediante la metodología de rotaforésis y para la detección de HuCVs por RT-PCR.

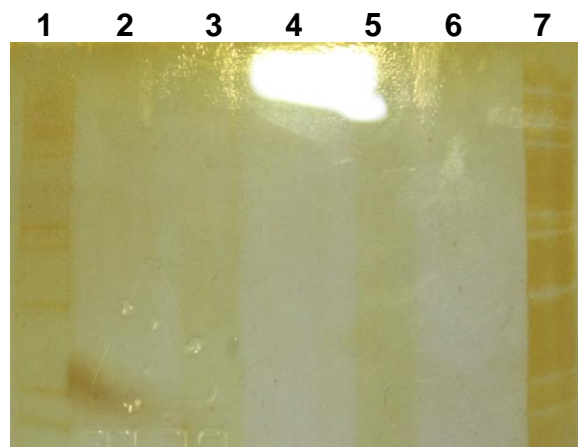
### **Detección de rotavirus mediante ensayos de rotaforésis**

Para estandarizar la metodología para la detección de rotavirus (ensayos de rotaforésis) en las muestras fecales, el RNA extraído mediante la técnica de trizol, fue analizado por electroforesis. Encontramos que en la literatura, se utilizan dos tipos de geles para este propósito, de poliacrilamida y de agarosa [54, 55, 56, 57]. Para determinar cuál de las dos metodologías podría ser más adecuada para observar el genoma viral, utilizamos para el análisis de las muestras un gel de poliacrilamida al 7.5% (Figura 8, A-E), así como de agarosa al 1.2%, (Figura 8, A'-E'). Las cinco muestras analizadas, corresponden a: RNA viral (Figura 8A y A'), dos muestras fecales negativas a rotavirus (Figura 8B y B'; y C y C'), una positiva a rotavirus (Figura 8D e D'), y una muestra problema (Figura 8E y E'). Tanto en el control positivo (Figura 8A) como en la muestra fecal control (Figura 8A, y D), se observaron claramente las 11 bandas de los genes de Rotavirus cuando se utilizaron geles de poliacrilamida, mientras que en los controles negativos, como era de esperarse, no se observaron bandas. De manera interesante, la muestra problema resultó ser positiva (Figura 8E), observándose un patrón de bandas muy nítido y semejante al del control. Sin embargo, al analizar las mismas muestras en geles de agarosa, pudimos determinar que los genes de rotavirus de las muestras controles no se observaban tan claramente (Figura 8 A' a E' respectivamente). Por lo tanto, el análisis del RNA de las muestras problema se realizó en geles de poliacrilamida.



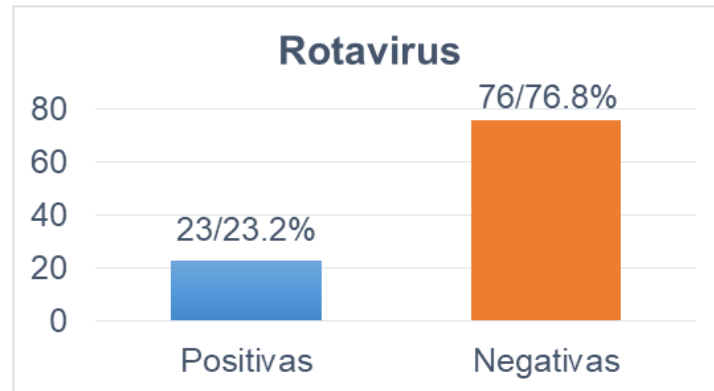
**Figura 8. Rotavirus para la detección de RNA de rotavirus en muestras fecales controles.** A y A') Control positivo rotavirus, B y B') muestra negativa rotavirus 1660, C y C') control negativo de heces, D y D') control positivo de heces, E y E') muestra problema con resultado positivo de acuerdo al patrón de banda de los controles positivos. Gel de poliacrilamida al 7.5% teñido con Nitrato de Plata (Panel izquierdo) o gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Panel derecho).

Una vez establecida la metodología de rotaforesis en geles de poliacrilamida, analizamos la presencia de rotavirus en 99 muestras fecales (Figura 9).



**Figura 9. Rotavirus para la detección de RNA de rotavirus en muestras fecales.** El RNA de las muestras fecales fue obtenido mediante trizol y analizado por rotaforesis. En los carriles 1y 7 se observa con claridad el patrón de bandas característico del genoma de rotavirus por lo cual se tomaron como muestras positivas.

El análisis de todas las muestras fecales nos permitió determinar que el 23.2% (23/99) resultaron positivas, mientras que el 76.8% (76/99) resultaron negativas a la presencia de rotavirus (Figura 10).



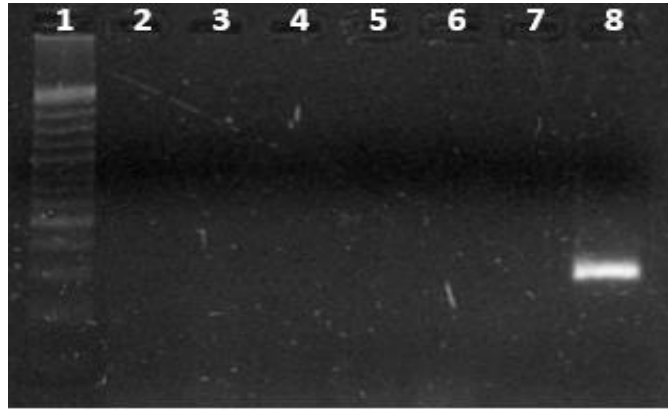
**Figura 10. Porcentajes de positividad de Rotavirus.** Grafica de barras que muestra el porcentaje de positividad para rotavirus donde; el 23.2% (23/99) fueron positivos a la presencia del genoma viral y 76.8% (76/99) fueron negativas.

### **Detección de calicivirus humanos mediante RT-PCR.**

Como observamos anteriormente, la técnica de trizol para la extracción del RNA total y la detección del RNA de rotavirus mediante ensayos de rotaforesis resultaron adecuadas. Esta metodología de aislamiento de RNA por trizol también ha sido reportada para la detección del genoma de otros virus de RNA mediante técnicas como la RT-PCR. Es por ello, que decidimos utilizar este mismo RNA extraído por trizol, para la detección de HuCVs mediante RT-PCR, ya que en este caso es necesario secuenciar los genomas para determinar los genogrupos circulantes.

Para el análisis de RNA por RT-PCR, se utilizó inicialmente el RNA de 6 muestras fecales, 5 que habían sido reportadas previamente como positivas (Figura 11, carriles 2-6) y una negativa (Figura 11, carril 7). En este ensayo se esperaba amplificar una región que corresponde a una secuencia conservada de la RdRp de 319 nt en los HuCVs o de 331 en los SaV [46]. También se incluyó un ensayo en

el que se amplificó esta secuencia viral a partir de un plásmido que contiene la secuencia completa del cDNA virus Norwalk y que nos serviría como control de PCR (carril 8) y del tamaño del amplificado.



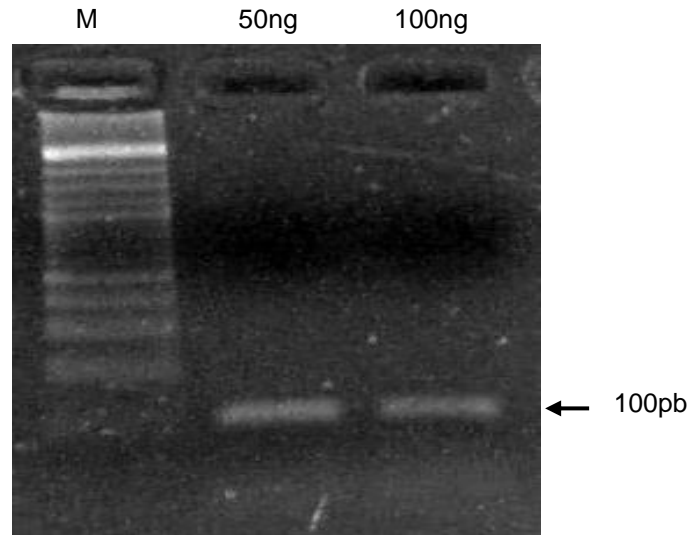
**Figura. 11. Detección de HuCVs en muestras fecales mediante la técnica de RT-PCR.** Carril 1) marcador de tamaño molecular, carril 2-6 muestras positivas a HuCVs, carril 8) control de PCR del plásmido NV que contiene la secuencia completa de cDNA del genoma del virus Norwalk.

En ninguna de las muestras analizadas obtuvimos el amplificado, lo cual fue distinto a los que esperábamos, ya que estas muestras ya habían sido detectadas como positivas. Dado que el control de amplificación de PCR resultó positivo, y que el RNA estaba integro, según lo mostramos para los ensayos anteriores, decidimos analizar las condiciones de la RT para validar que los componentes de la reacción estaban funcionando correctamente.

Información en la literatura describe que la presencia de sales biliares en las muestras fecales inhibe la actividad enzimática de la RT. Es por ello que inicialmente decidimos analizar la reacción de RT-PCR sobre un RNA celular de expresión constitutiva, como lo es el de la Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), y con ello determinar si los componentes funcionaban correctamente. Para ello, se extrajo RNA de células CRFK y se trató con DNAsa Turbo (cuya actividad ya había sido probada en el laboratorio), para eliminar DNA que pudiera estar presente en la muestra y que pudiera ser amplificado por PCR, lo cual

arrojaría en un resultado falso positivo a la reacción de RT-PCR (figura no mostrada).

A partir del RNA extraído de un cultivo celular, se realizó una reacción de RT-PCR que amplifica para una región de 100pb del RNA de GAPDH, (Figura 12), utilizando dos concentraciones distintas de RNA (50 y 100ng).



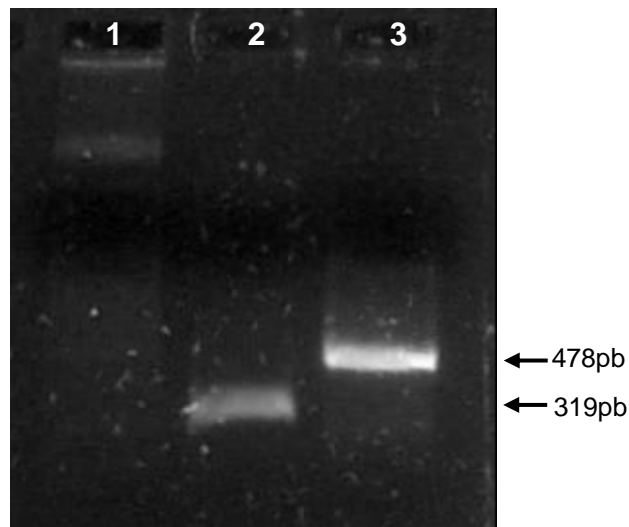
**Figura 12. Amplificación del RNA de GAPDH de células CRFK mediante RT-PCR.** Para la retrotranscripción (RT) de RNA a cDNA se utilizó como molde 50 y 100ng de RNA de células CRFKs (carril 2,3 respectivamente) para un volumen final de reacción de 20uL, del producto de la RT, se tomaron 2uL de cDNA para la reacción de PCR de un volumen final de 10ul.

Como podemos observar, con ambas concentraciones de RNA se logró amplificar una banda con el peso molecular esperado (Figura 12). Con estos resultados pudimos demostrar que la reacción de RT y PCR se estaba llevando a cabo de manera correcta.

### **DNA y RNA controles para RT y PCR del RNA y cDNA obtenido de muestras fecales.**

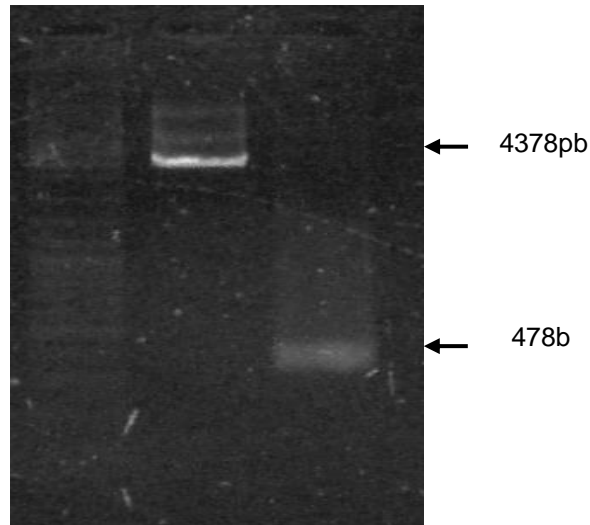
Para determinar si el RNA de las muestras fecales estaba en condiciones óptimas para su amplificación por RT-PCR y que este no contenía concentraciones de sales que pudieran inhibir las reacciones, decidimos incluir dos controles de reacción. 1) El cDNA del plásmido pNV319 que contiene a la región de 319 nt de

la replicasa del virus NV, como control de la PCR y 2) El RNA de 478 bases que se transcribió *in vitro* con el Kit de “MEGAscript T7 Transcription Kit”, a partir del plásmido pNV478, derivado del pNV319, pero que contiene en la región de 319 nts del genoma del virus NV una región no viral de 159 nt que se insertó en medio de esta. Este RNA puede ser amplificado mediante RT-PCR con los mismos oligonucleótidos usados para la reacción de amplificación pero puede diferenciarse por tamaño, del que se produce a partir del genoma viral presente en las heces [43]. Los productos de amplificación de ambos plásmidos se verificaron por PCR (Figura 13).



**Figura13. Amplificación de los productos de 319 y 478 a partir del DNA plasmídico.** Gel de agarosa al 2% que muestra el amplificado de cDNA de 319 y 478 kDa proveniente de los plásmidos pNV319 (carril 2) y pNV478 (carril3). Carril 1) marcador de pb; carril 2) amplicón de 319 pb, carril 3) amplicón de 478pb.

Una vez corroborado que cada plásmido contenía la secuencia de 319 y 478 pb respectivamente, se procedió a obtener el RNA de 478 bases mediante transcripción *in vitro* y el producto se evaluó mediante el corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 14).



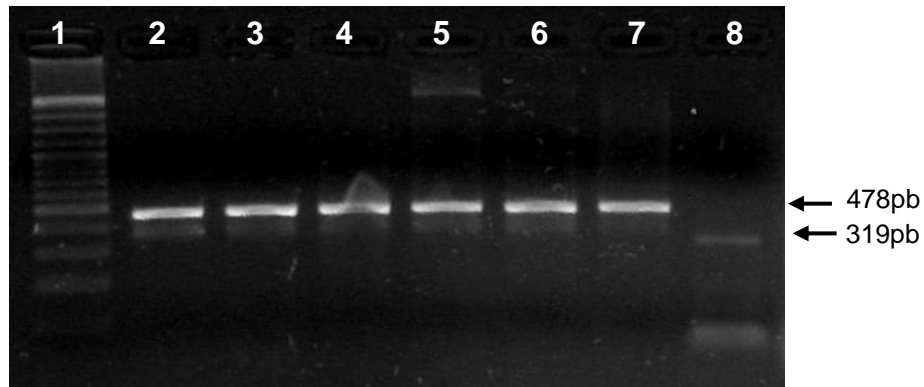
**Figura. 14. Electroforesis del producto de la transcripción *in vitro*.** Carril 1) marcador de tamaño molecular, carril 2) plásmido NV478 de 4378 pb que contiene el fragmento control de 478 pb, carril 3) RNA producto de la transcripción *in vitro* de un tamaño de 478 bases.

Como se puede observar en la figura 14, se obtuvo el transcrito correspondiente al tamaño esperado, de 478 bases.

Una vez obtenido el transcrito de 478 bases, se incluyeron concentraciones crecientes del mismo en una muestra fecal en el momento de la extracción de RNA para determinar si podía amplificarse mediante la técnica de RT-PCR; sin embargo, en ninguna de ellas se observó amplificado (datos no mostrados). Este resultado sugería que efectivamente se inhibía la actividad de las enzimas en presencia de sales en concentraciones inhibitorias de la reacción como habíamos pensado, ya que estas mismas amplificaron secuencias a partir de RNA celular.

Paralelamente, en el laboratorio, se estaban probando tres diferentes marcas de Taq polimerasa para tratar de solucionar este problema, incluyendo la de la marca Fermentas, la cual en años anteriores, había funcionado muy bien para este propósito. Es por ello que decidimos probar también las distintas Taq polimerasas, con la finalidad de determinar si alguna de ellas era menos sensible a altas concentraciones de sales (datos no mostrados).

Cuando realizamos nuevamente el ensayo de incluir el RNA plasmídico en 6 diferentes muestras fecales, pero utilizando la Taq de la marca Fermentas, se observó en todas las muestras analizadas el producto de 478 pb correspondiente al RNA exógeno (Figura 15).



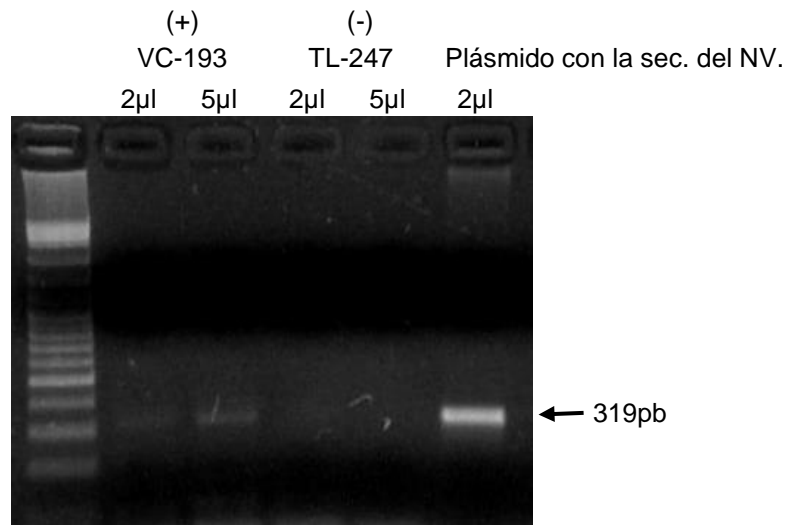
**Figura. 15. Amplificación por RT-PCR de un transcrito exógeno incluido en muestras fecales.** El transcrito de 478 b se incluyó en 6 diferentes muestras fecales durante la extracción de RNA y el RNA extraído fue sometido a amplificación por RT-PCR. Carril 1) marcador de tamaño molecular; carriles 2 – 7 diferentes muestras fecales con RNA exógeno. Carril 8) amplificado de 319 pb a partir del plásmido pNV319.

### **RT-PCR para la detección de HuCVs en heces.**

Una vez estandarizadas las condiciones para la detección de HuCVs en heces, se procedió a analizar la presencia de HuCVs en las muestras fecales. La extracción de RNA se realizó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente y diluyendo la muestra fecal en una proporción 1:5. La reacción de RT se llevó a cabo inicialmente con el RNA obtenido de dos muestras que habían sido confirmadas como positiva (VC-193) y negativa (TL-247). La reacción de PCR se llevó a cabo con dos distintas concentraciones de cDNA. Como se puede



observar en la Figura 16, se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado a partir de la muestra VC-193, utilizando tanto 2 como 5  $\mu$ l del cDNA, mientras que cuando se utilizó el RNA de la muestra negativa control (TL-247), no se observó ningún producto de amplificación (Figura 16).

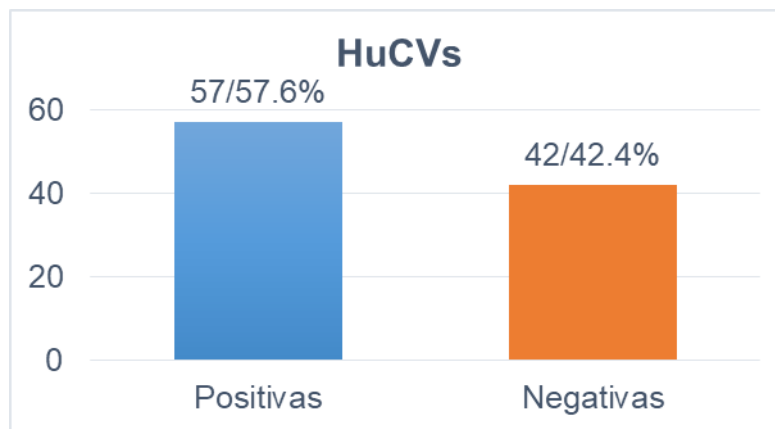


**Figura 16. RT-PCR para la detección de HuCVs en heces.** Gel de agarosa al 2% que muestra el amplicón obtenido a partir de dos concentraciones crecientes de cDNA de una muestra positiva para HuCVs (carriles 2 y 3). No se obtuvo producto de amplificación en ninguna de las dos concentraciones de cDNA de la muestra negativa (carriles 4 y 5) Carril 1, marcador de tamaño molecular. Carril 6 amplicón obtenido por PCR a partir del plásmido con la secuencia completa del virus Norwalk.

Una vez corroborada la amplificación del RNA viral por RT-PCR en muestras fecales, procedimos al análisis de las 99 muestras problema.

### Porcentajes de positividad de HuCVs.

Para determinar la frecuencia de positividad para HuCVs en las 99 muestras fecales, el RNA proveniente de las mismas fue analizado mediante RT-PCR como se mostró anteriormente. Del total de muestras, el 57.6% (57/99) resultaron positivas a HuCVs, lo cual representa el doble de las muestras positivas a rotavirus y 42.4% (42/99) negativas (Figura 17).



**Figura 17. Porcentajes de positividad de HuCVs.** Grafica de barras que muestra los porcentajes de positividad. El 57.6% (57/99) de la muestras testeadas resultaron positivas para HuCVs.

### Co-infecciones entre HuCVs y Rotavirus.

Después de haber determinado la positividad de los rotavirus y norovirus en las muestras analizadas, observamos que los HuCV se encuentran en casi el doble de las muestras que resultaron positivas para rotavirus. Asimismo, encontramos que en el 13.2% (13/99) de las muestras positivas para HuCVs también lo fueron para Rotavirus, evidenciando casos de infecciones entre estos dos virus.



**Figura18. Co-infecciones entre HuCVs y Rotavirus.** Gráfica de barras que muestra el porcentaje de co-infecciones donde, el 13.2% (13/99) de las muestras testeadas resultaron positivas a la presencia de ambos genomas virales.

### **Posible presencia de brotes de HuCVs entre las muestras analizadas.**

Una vez analizadas las muestras para la presencia de rotavirus y norovirus, pudimos correlacionar los resultados con los datos clínicos. Encontramos que la sintomatología de todos los pacientes fue semejante, siendo los signos y síntomas mas frecuentes la diarrea, el vómito, el dolor de estomago, de cabeza y fiebre.

Por otro lado, cuando analizamos la positividad de las muestras a la presencia de HuCV y rotavirus por fecha de toma de muestra, se encontró una correlación con algunos casos positivos a la presencia de HuCVs (Tabla 2). Este hallazgo sugiere la posible presencia de brotes de GA por HuCVs dentro de la población estudiada, además de los casos esporádicos. Cabe mencionar que dicha asociación entre la positividad de rotavirus y las fechas de toma de muestra no se encontró en nuestro análisis.

**Tabla 2. Brotes de GA por HuCVs.** Asociación entre la positividad a HuCVs y la fecha de toma de muestra, que sugieren la presencia de brotes ya que son más de dos casos por grupo.

<b>Grupo</b>	<b>Fecha</b>	<b>Hospital</b>	<b>N° casos</b>
1	15/06/2017	Corea	3
2	22/06/2013	Corea	3
3	11/07/2013	Corea	4

## 8. DISCUSIÓN

Los virus entéricos causantes de los brotes de gastroenteritis representan un problema de salud pública importante en todo el mundo, como lo es el caso de las causadas por rotavirus y los calicivirus humanos [3, 7, 8]. En muchos países en vías de desarrollo como el nuestro, se conoce ampliamente la incidencia y prevalencia de las gastroenteritis causadas por rotavirus, como ha sido reportado desde los años 70s. Estos estudios han progresado debido a diversos factores, como lo son el interés en el control de la enfermedad debido a la alta morbilidad y mortalidad que ocasionan, así como por las facilidades de su cultivo y estudio en el laboratorio. Sin embargo, a pesar del descubrimiento de muchos otros patógenos entéricos causantes de gastroenteritis desde la década de los 70s, no todos ellos han podido ser estudiados debido a las dificultades en su cultivo que ocasiona un retraso en su estudio y por lo tanto en reconocer su incidencia y severidad en la población.

Existen varios reportes de diferentes países que han documentado que tras la aplicación de la vacuna contra las formas graves de rotavirus, se ha comenzado a evidenciar una alta incidencia de norovirus como generadores de gastroenteritis [5, 6, 58, 59]. Sin embargo, la asociación de los HuCVs con esta enfermedad en la población mexicana no se encuentra caracterizada.

El objetivo de este estudio fue detectar a los HuCV asociados a gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años de edad en la ciudad de Mérida Yucatán, como parte de un proyecto en el que se estudian también poblaciones del centro y norte de la República Mexicana. Este proyecto tiene la finalidad de determinar si los norovirus representan un problema de salud en nuestro país. Por otro lado, detectar la presencia de rotavirus, nos permitió comparar la frecuencia de los dos virus en las mismas muestras con lo cual se podría comenzar a determinar la importancia de los HuCVs como generadores de diarrea aguda en la población infantil. Para ello, utilizamos la metodología de RT-PCR y Rotaforesis para la detección de HuCVs y rotavirus respectivamente como las principales herramientas moleculares para su detección.

El desarrollo de la metodología para la detección de rotavirus, conocida como rotaforesis, fue sencilla de implementar debido a que la mayor dificultad es el aislamiento del RNA, mismo que pudimos obtener mediante el uso de trizol. Ello nos permitió determinar el porcentaje de muestras positivas y negativas de una manera sencilla y relativamente rápida. Sin embargo, para la detección de norovirus, decidimos utilizar la técnica de RT-PCR, que nos da la ventaja de poder obtener la secuencia nucleotídica de cada genotipo, y con ello poder conocer los virus circulantes en nuestro país. Sin embargo, esta metodología involucra el uso de dos enzimas que son susceptibles a las concentraciones elevadas de sales. Dado que las muestras fecales contienen sales biliares, fue difícil poder estandarizar la técnica. A pesar de haber corroborado que todos los reactivos permitieron la amplificación de secuencias a partir de RNA celular, fue necesario determinar cuál de las dos enzimas, la RT o la Taq polimerasa podría estar funcionando con baja eficiencia o no era funcional para la amplificación de RNA proveniente de muestras fecales.

Nosotros encontramos que de las tres Taq polimerasas utilizadas en esta trabajo, (Thermo Fisher Scientific, Jena Bioscience y Fermentas), las dos primeras resultaron tener mayor sensibilidad a la presencia de sales, y por lo tanto no resultaron ser eficientes para la amplificación de ácidos nucleicos obtenidos de muestras fecales; mientras que cuando utilizamos la Taq polimerasa de la marca Fermentas, logramos la amplificación de los productos esperados en las mismas muestras utilizadas. Es importante entonces, considerar este resultado para no volver a tener problemas de estandarización durante el análisis de muestras fecales de otras regiones contemplado en el Proyecto global del laboratorio.

Utilizando un set de oligonucleótidos dirigidos hacia la región RdRp que contiene secuencias conservadas en el genoma viral [46], encontramos que los HuCV predominan en el 57.6% de las muestras totales analizadas, este porcentaje resulto ser alto en comparación con lo reportado en países de Latinoamérica como Argentina, Brasil y Paraguay que reportan 39%, 33.3% y 43% respectivamente

[60, 61, 62] y en otros estudios realizados en México en donde se reportan porcentajes de positividad que van de 5.3 a 32% [50, 51, 63].

Es bien conocido, que los HuCVs son responsables de brotes así como de casos esporádicos de gastroenteritis en la población estudiada. A este respecto, si bien no pudimos corroborar posibles casos de brotes hasta que no contemos con las secuencias virales que nos permitan identificar a los genogrupos, si podemos sugerir la presencia de brotes ya que se encontraron dos o más muestras positivas con las mismas fechas [64, 65, 66]. Es importante mencionar que hubo tres casos donde la edad del paciente era mayor a cinco años (dos casos 6 años en la fecha 15-06-2013 y uno de siete años en la fecha 22-06-2013), los cuales no fueron incluidos en este trabajo; sin embargo, se determinó tomarlos dentro del grupo de estudio debido que a pesar de superar el rango de edad de nuestro criterio de inclusión, no dejaban de ser pacientes que acudieron al hospital por una sintomatología característica de GA que además eran positivas a HuCVs, lo cual nos sugería la presencia de brotes en esa población de infantes. De igual manera, podemos inferir también la presencia de casos esporádicos, que fueron detectados en fechas aisladas. Sin embargo, también será importante analizarlos una vez que hayamos identificado los genogrupos (datos no mostrados).

Así mismo, el 23.2% del total de las muestras analizadas mediante rotaforesis fueron positivas a la presencia del genoma de rotavirus, lo cual representa la mitad en el número de los casos detectados como positivos para HuCVs. Estos resultados podrían deberse a que la metodología de rotaforesis, pudiera no ser tan sensible como la RT-PCR, lo que podría estar resultando en una subestimación de los casos. Analizando las fechas de captación de las muestras que fueron positivas a rotavirus, no se encontró ningún patrón que pudiera sugerirnos la presencia de brotes por este virus en la población de estudio, ya que todas las muestras que fueron positivas eran de fechas aisladas, sugiriendo un comportamiento de casos esporádicos.

Los resultados de este estudio también reflejan y coinciden con la clara disminución en el número de casos de GA por rotavirus en México, probablemente debido a que las autoridades sanitarias mexicanas aprobaron el uso de la vacuna monovalente de rotavirus desde enero del 2004 (Rotarix) [67] o bien a la menor sensibilidad de la técnica usada. También podemos atribuir este descenso a las mejoras en las medidas de higiene, el saneamiento ambiental, el diagnóstico oportuno y el tratamiento adecuado de la GA.

Aunque encontramos que el 13.2% de las muestras eran casos de co-infección entre ambos virus, no observamos ninguna correlación con la severidad de los síntomas; sin embargo, en cuatro de los diez casos de co-infección, se detectó que presentaban el mayor número de evacuaciones al día reportado (igual o mayor a 5) en comparación con las que únicamente presentaron presencia de HuCVs o rotavirus, que en general fue de 3 a 5 evacuaciones por día. La presencia de co-infecciones pudiera hablarnos de que todavía es necesario el continuar y reforzar las campañas de mejoramiento de condiciones y hábitos higiénicos en nuestra población.

La asociación entre la presencia de HuCVs y la diarrea que ocasionó que los pacientes recurrieran al hospital, es una correlación importante que sugiere que estos agentes son responsables de esta sintomatología en los pacientes, como fue anteriormente reportado por nuestro grupo de trabajo (50). Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que la GA haya sido causada en asociación con otro tipo de agentes virales, o bacterianos, debido a que ello todavía no ha sido investigado.



## 9. CONCLUSIONES

- Se demostró que el 57.6% del total de las muestras fecales de niños menores a 5 años de edad, que recurrieron al hospital en la Ciudad de Mérida, Yucatán, resultaron positivas para HuCVs, 23.2% para rotavirus y de estos el 13.2% fueron co-infecciones entre ambos virus.
- En este estudio se reporta un mayor número de casos detectados de GA producida por HuCVs, en comparación con otros estudios de otras poblaciones en Latinoamérica y en el mundo, sugiriendo su importancia como generadores de infección en nuestra población.

## 10. PERSPECTIVAS

- Secuenciar el genoma de las muestras positivas a HuCVs y determinar mediante análisis *in silico* los genogrupos circulantes al que pertenecen y la prevalencia.
- Determinar la relación filogenética entre estos calicivirus humanos.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Singh, Amandeep (July de 2010). Pediatric Emergency Medicine Practice Acute Gastroenteritis. An Update. Emergency Medicine Practice 7(7).
2. Dennehy, P.H., Viral gastroenteritis in children. *Pediatr Infect Dis J*, 2011. 30(1): p.63-4.
3. Szajewska, H; Dziechciarz, P (2010 Jan). «Gastrointestinal infections in the pediatric population.». *Current opinion in gastroenterology* 26 (1): 36-44.
4. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000–2013. *Clin Infect Dis*. 2016; 62 Suppl 2:S96–S105.
5. Koo, H.L., et al., Noroviruses: The Most Common Pediatric Viral Enteric Pathogen at a Large niversity Hospital After Introduction of Rotavirus Vaccination. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 2013. 2(1): p.57---60.
6. Grimwood K, Lambert SB, Milne RJ. 2010. Rotavirus infections and vaccines: Burden of illness and potential impact of vaccination. *Paediatr Drugs* 12:235–256.
7. Siebenga J. J., et al. 2009. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J. Infect. Dis*. 200:802–812
8. Ahmed, S.M., et al., *Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta---analysis*. *Lancet Infectious Diseases*, 2014. 14(8): p.725---730.
9. Estes MK, Kapikian AZ. 2007. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE editors. *Fields virology*, 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp 1918–1974.
10. Fankhauser R. L., et al. 2002. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis*. 186:1–7
11. Vashist S., Bailey D., Putics A., Goodfellow I. 2009. Model systems for the study of human norovirus biology. *Future Virol*. 4:353–367.
12. Ando, T., Noel, J.S., Fankhauser, R.L., 2000. Genetic classification of “Norwalk-like viruses”. *J. Infect. Dis*. 181 (Suppl. 2), S336–S348.

13. Koopmans, M., von Bonsdorff, C.H., Vinje, J., de Medici, D., Monroe, S., 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 187–205.
14. Mesquita J. R., Barclay L., Nascimento M. S. J., Vinjé J. (2010). Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg Infect Dis* 16, 980–982.
15. Widdowson MAb, Rockx B, Schepp R, van Duynhoven YT, Vinjé J, van der Poel WH. Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *J. Med. Virol.* 2005; 76:119- 28.
16. Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. pp. 1747–1785.
17. Kirkwood CD (septiembre de 2010). «Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs». *The Journal of Infectious Diseases*. 202 Suppl: S43-8. PMID 20684716.
18. Dey SK, Thongprachum A, Ota Y, Phan TG, Nishimura S, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Molecular and epidemiological trend of rotavirus infection among infants and children in Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, Sept 2009;9 (5):955-961. doi:10.1016/j.meegid.2009.06.017.
19. Burroughs J N, Brown F. Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *J Gen Virol.*1978; 41:443–446.
20. Dunham D M, Jiang X, Berke T, Smith A W, Matson D O. Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch Virol.* 1998; 143:2421–2430.
21. Glass, P.J., White, L.J., Ball, J.M., Leparac-Goffart, I., Hardy, M.E., Estes, M.K., 2000. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J. Virol.* 74, 6581–6591.
22. Both, G. W., A. R. Bellamy, and D. B. Mitchell 1994. Rotavirus protein structure and function *Curr Top Microbiol Immunol.* 185:67-105.
23. Bhella, D., et al., *Structural insights into calicivirus attachment and uncoating.* *Journal of Virology*, 2008. 82(16): p. 8051---8058.
24. Donaldson E. F., Lindesmith L. C., Lobue A. D., Baric R. S. (2008). Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev* 225, 190–211.

25. Herbert T. P., Brierley I., Brown T. D. (1997). Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol* 78, 1033–1040.
26. Goodfellow I. (2011). The genome-linked protein VPg of vertebrate viruses – a multifaceted protein. *Curr Opin Virol* 1, 355–362.
27. Firth A. E., Brierley I. (2012). Non-canonical translation in RNA viruses. *J Gen Virol* 93, 1385–1409.
28. Chaudhry, Y., et al., *Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components*. Journal of Biological Chemistry, 2006. 281(35): p.25315--25325.
29. Goodfellow I., Chaudhry Y., Gioldasi I., Gerondopoulos A., Natoni A., Labrie L., Laliberté J.-F., Roberts L. (2005). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Rep* 6, 968–972.
30. Sosnovtsev, S.V., et al., *Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells*. Virus Research, 2003. 94(1): p. 1---10.
31. Alvarez---Sanchez, C., Cancio---Lonches, C., Mora---Heredia, J. E., Santos---Valencia, J. C., Barrera---Vázquez, O. S., Yocupicio---Monroy, M., & Gutierrez---Escolano, A. L., *Negative effect of heat shock on feline calicivirus release from infected cells is associated with the control of apoptosis*. Virus research, 2015. 198: p.44---52.
32. Haselhorst T, Fleming FE, Dyason JC, Hartnell RD, Yu X, Holloway G, Santegoets K, Kiefel MJ, Blanchard H, Coulson BS, von Itzstein M. Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nat Chem Biol*. 2009; 5:91–93.
33. Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, Estes MK, Prasad BV. Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature*. 2012; 485:256–259.
34. Lopez S, Arias CF. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006; 309:39–66.
35. López, S; Sánchez-Tacuba, L; Moreno, J; Arias, C. *Rotavirus: Strategies Against the Innate Antiviral System*. Annual Review of Virology, Vol. 3: (Volume

- publication date November 2016). Doi: 10.1146/annurev-virology-110615-042152.
36. Acosta O, Calderón MN, Moreno LP, Guerrero CA. *Un modelo del mecanismo de entrada de los rotavirus a la célula hospedera*. Rev.Fac.Med. 2009; 57: 124-148.
  37. Koo, H.L., et al., *Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide*. Discov Med, 2010. 10(50): p. 61---70.
  38. Hrdy DB (1987). «Epidemiology of rotaviral infection in adults». Rev. Infect. Dis. 9 (3): 461-9. PMID 3037675. doi:10.1093/clinids/9.3.461.
  39. Bok K., Green K. Y. (2012). Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. *N Engl J Med* 367, 2126–2132.
  40. Escobar---Herrera, J., et al., *Construction of an internal RT---PCR standard control for the detection of human caliciviruses in stool*. J Virol Methods, 2006. 137(2): p.334---8.
  41. Siebenga J. J., et al. 2009. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J. Infect. Dis.* 200:802–812.
  42. Lindesmith LC, Ferris MT, Mullan CW, Ferreira J, Debbink K, et al. (2015) Broad Blockade Antibody Responses in Human Volunteers after Immunization with a Multivalent Norovirus VLP Candidate Vaccine: Immunological Analyses from a Phase I Clinical Trial. *PLOS Medicine* 12(3): e1001807.
  43. Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K.G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J. and Megraud, F. (1997) Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 35, 995–998.
  44. Green, K.Y., Belliot, G., Taylor, J., Valdesuso, J., Lew, J., Kapikian, A., Lin, F.-Y., 2002. A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *J. Infect. Dis.* 185, 133– 146.
  45. Eden, John-Sebastian et al. “The Emergence and Evolution of the Novel Epidemic Norovirus GII.4 Variant Sydney 2012.” *Virology* 0 (2014): 106–113. PMC. Web. 18 Jan. 2018.

46. Chan, M., Hu, Y., Chen, H., Podkolzin, A. T., Zaytseva, E. V., Komano, J....Chan, P. (2017). Global Spread of Norovirus GII.17 Kawasaki 308, 2014–2016. *Emerging Infectious Diseases*, 23(8), 1359-1354. 61138
47. T. da Silva Poló., et al. Human norovirus infection in Latin America. *J Journal of Clinical Virology* 78 (2016) 111–119 113.
48. Farkas T, Zhong WM, Jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martínez N, Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK, Jiang X. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol*. 2004; 149:1309–1323.
49. Peasey AE, Ruiz-Palacios GM, Quigley M, Newsholme W, Martínez J, Rosales G, Jiang X, Blumenthal UJ: Seroepidemiology and risk factors for sporadic Norovirus/México strain. *J Infect Dis* 2004, 189: 2027-2036. 10.1086/386310.
50. Koo, H.L., et al., *Noroviruses as a Cause of Diarrhea in Travelers to Guatemala, India, and México*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010. 48(5): p. 1673---1676.
51. Chapin AR, Carpenter CM, Dudley WC, Gibson LC, Pratdesaba R, Torres O, Sánchez D, Belkind-Gerson J, Nyquist I, Kärnell A, Gustafsson B, Halpern JL, Bourgeois AL, Schwab KJ: Prevalence of norovirus among visitors from the United States to Mexico and Guatemala who experience traveler's diarrhea. *J Clin Microbiol* 2005, 43: 1112-1117. 10.1128/JCM.43.3.1112-1117.2005
52. Gutierrez---Escolano, A.L., et al., *Human caliciviruses detected in Mexican children admitted to hospital during 1998---2000, with severe acute gastroenteritis not due to other enteropathogens*. *J Med Virol*, 2010. 82(4): p. 632---7.
53. Gómez-Santiago F, Ribas-Aparicio RM, Garcia-Lozano: Molecular characterization of human calicivirus associated with acute diarrheal disease in mexican children. *Virology Journal* 2012. 9:54.
54. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage. *Nature*. 227: 680–685.
55. Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct infection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol*. 16: 473–477.

56. Kumar M. 2006. Polymerase chain reaction for rapid detection of important zoonotic diarrhoeal pathogens [M.V.Sc. Thesis]. Bareilly: IVRI.
57. Chudzio T, Kasatma S, Irvine N, Sankar-Mistry P. 1989. Rapid screening test for the diagnosis of rotavirus infection. *J Clin Microbiol.* 27: 2394–2396.
58. Tate JE, Panozzo CA, Payne DC, et al. Decline and change in seasonality of US rotavirus activity after the introduction of rotavirus vaccine. *Pediatrics.* 2009; 124:465–71.
59. Reduction in rotavirus after vaccine introduction—United States, 2000–2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58:1146–9.
60. Gomes KA, Stupka JA, Gómez J, Parra GI. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. *J Med Virol.* 2007; 79:1703–1709. doi: 10.1002/jmv.20989.
61. Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinjé J, Rácz ML. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in Sao Paulo State, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:3947–3953. doi: 10.1128/JCM.00279-06.
62. M.E. Galeano, M. Martinez, A.A. Amarilla, G. Russomando, M.P. Miagostovich, G.I. Parra, et al., Molecular epidemiology of norovirus strains in Paraguayan children during 2004–2005: description of a possible new GII.4 cluster, *J. Clin. Virol.* 58 (2013) 378–384.
63. Jiang X, Matson DO, Velázquez FR, Calva JJ, Zhong WM, Hu J, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK. Study of Norwalk-related viruses in Mexican children. *J Med Virol.* 1995; 47:309–316. doi: 10.1002/jmv.1890470404.
64. Reuter G, Venneman H, Koopmans M, Szucs G. Epidemic spread of recombinant noroviruses with four capsid types in Hungary. *J. Clin. Virol.* 2006; 35:84-8.
65. Mattner F, Sohr D, Heim A, Gastmeier P, Vennema H, Koopmans M. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 69-74.
66. Díaz T, Janepsy, Solari G, Verónica, Cáceres C, Omar, Mena A, Javier, Baeza P, Silvia, Muñoz U, Ximena, O’Ryan G, Miguel, Galeno A, Héctor, Maldonado

B, Aurora, & Mamani M, Nora. (2012). Brote de gastroenteritis aguda en la Región de Antofagasta, Chile: 2010. Revista chilena de infectología, 29(1),19-25.

67. Braine T. Rotavirus vaccine introduction in Mexico sets precedent. Bull World Health Organ 2005; 83:167.



## 12. ANEXOS

### Anexo I. Extracción de RNA total con TRIZOL en heces.

- Diluir la muestra fecal dependiendo de su consistencia en PBS estéril 1X, agua destilada estéril o agua inyectable y homogenizar vigorosamente por vortex (30seg-1min). Por ejemplo, una muestra muy acuosa se diluirá en una proporción 1:10, una muestra pastosa se diluirá 1:100, esto con la finalidad de reducir la concentración de sales que puedan inhibir la reacción de RT-PCR.
- De la dilución se toma 200µl y se le agrega 1mL de Trizol. Agitar suavemente por inversión durante 15 segundos y dejar reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 200µl de cloroformo. Agitar suavemente por inversión durante 15 segundos y dejar reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12,000 gravedades durante 15 minutos.
- Recuperar el sobrenadante (parte transparente) con una micropipeta de 200µL y pasarlo a un tubo eppendorf nuevo de 1.5mL.
- Agregar 500µL de Isopropanol. Agitar suavemente por inversión durante 15 segundos y dejar reposar durante 10 minutos.
- Centrifugar a 12,000 gravedades durante 10 minutos.
- Recuperar la pastilla de RNA (a veces no se visualiza).
- Hacer un lavado con etanol absoluto al 75% (se prepara con agua H<sub>2</sub>O DEPC) y centrifugar a 7,500 gravedades durante 5 minutos.
- Recuperar la pastilla por decantación y dejar secar el tubo boca abajo durante 20 minutos
- Resuspender el RNA en 30µL de H<sub>2</sub>O DEPC. Guardar en un ultracongelador a una temperatura de -80°C hasta su uso.

## Anexo II. Condiciones RT-PCR.

Transcripción reversa (Vf= 20µL)	
Reactivo	Cantidad (µL)
Olígo dT (500ng/mL)	1.0
RNA total	1.0 (1ng - 5µg)
dNTPs Mix (10mM)	1.0
H <sub>2</sub> O DEPC	10.0
Calentar el mix a 65°C durante 5 min y enfriar en hielo. Agregar:	
Buffer First-Strand	4.0
DTT (0.1M)	2.0
RNAsaOUT (40uni/µL)	1.0
Mezclar suavemente e incubar a 37° durante 2 min.	
Agregar 1µL de enzima M-MLV RT (200uni/µL) y mezclar suavemente con la micropipeta.	

PCR (Vf= 25µL)	
Reactivo	Cantidad (µL)
H <sub>2</sub> O DEPC	12.0
Buffer 10X	2.5
dNTPs 2.5mM	2.0
Olígo Set-Full 10µM	1.5
Taq-Polimerasa 0.5uni/µL	2.0
cDNA	5.0

## Anexo III: Protocolo de rotaforésis (RNA-PAGE) y tinción con Nitrato de Plata.

Preparación de la muestra y de corrimiento electroforético:

- Extracción de RNA total en heces (Dilución 1:10 en PBS 1X estéril, agua destilada estéril o agua inyectable) con TRIZOL (ANEXO I) y re-suspender el RNA en 30µL de H<sub>2</sub>O DEPC.
- Calentar el RNA en baño maría a 56°C durante 5-10min, tomar 10µL y mezclarlo con 5µL de buffer de corrida de DNA/RNA 6X (15g de sacarosa, 15mL de TBE 10X, 30mg de azul de bromofenol, 30mg de Xilen-Xianol) sobre papel parafilm. Cargar en los pocillos de un gel de poliacrilamida al 7.5% y correr el gel durante 1:30hrs a 100 voltios (dejar que el marcador se salga del gel).

Protocolo de tinción:

- Pasar el gel a un recipiente limpio de vidrio (preferentemente) y cubierto con aluminio, que contiene solución fijadora (0.5 ácido acético glaciado + etanol absoluto al 10%), agregar más solución hasta cubrir la membrana, dejar en shaker en agitación suave (30-40rpm) durante 30min.
- Retirar la solución fijadora por decantación y agregar la solución de nitrato de plata (0.185g de AgNO<sub>3</sub> + 100mL de H<sub>2</sub>O bidestilada) hasta cubrir bien la membrana, llevarlo al cuarto frío (4°C) y dejarlo en agitación lenta sobre el shaker (30-40rpm) durante 30min.
- Retirar la solución de nitrato de plata por decantación (si es nuevo, se puede reciclar y reutilizar dos veces), hacer un lavado con agua miliQ para retirar restos de la solución anterior. Posteriormente, agregar la solución reveladora (3g de NaOH + 100mL de H<sub>2</sub>O bidestilada + 0.75mL de formaldehído) y agitar suavemente el tiempo necesario (3-10min aprox.) hasta que aparezca el patrón de bandas característicos del genoma de rotavirus (11 bandas bien definidas).
- Una vez que aparezca el patrón de bandas esperado, retirar rápidamente la solución reveladora y agregar la solución de paro (ácido acético al 5%). Fotodocumentar de manera inmediata debido a que con el paso del tiempo las bandas se van degradando, o el gel teñido se ensucia.

**Anexo IV. Programas de RT-PCR para Termocicladores.**

<b>Transcripción reversa (Vf= 20µL)</b>	
<b>37°C</b>	<b>50 minutos</b>
<b>72°C</b>	<b>15 minutos</b>
<b>4°C</b>	<b>∞</b>

<b>PCR (Vf= 25µL)</b>	
<b>94°C</b>	<b>5 minutos</b>
<b>94°C</b>	<b>0.5 minutos</b>
<b>49°C</b>	<b>1 minutos</b>
<b>72°C</b>	<b>2.5 minutos</b>
<b>72°C</b>	<b>10 minutos</b>
<b>4°C</b>	<b>∞</b>

} 35 ciclos