

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Genotipificación de VP4 y VP7 por Transcripción Reversa (RT-PCR) de Rotavirus Humano en niños con diarrea de la ciudad de Quito

Carlos Andrés Cobo López

Proyecto presentado como requisito para la obtención del título de B.S en Biotecnología

Quito

Octubre de 2007

DERECHOS DE AUTOR

© Derechos de autor
Carlos Andrés Cobo López
2007

DEDICATORIA

A mis padres, por ser lo que han sido
y por permitirme ser lo que soy.

RESUMEN

Las infecciones por rotavirus en infantes menores de 5 años es un problema de salud pública. Algunos estudios demuestran que el genotipo G9 se ha esparcido a nivel mundial desplazando los genotipos tradicionales G1-G4. Esta situación parece ser común en aquellos países ubicados en zonas tropicales. El presente estudio muestra la prevalencia del genotipo G9 en muestras colectadas en un hospital urbano en la sierra del Ecuador. Un total de 74 muestras fueron estudiadas, el 39.2% fueron positivas para rotavirus durante noviembre 2005 y febrero 2006. El serotipo P8-G9 estuvo presente en el 76% de las muestras, mientras que la prevalencia de cepas tradicionales fueron detectadas en el 7.2% y el 16.8% % restante corresponde a posibles co-infecciones.

ABSTRACT

Infant rotavirus infections under 5 years old are a serious public health problem. There are some studies that show that G9 genotype has been spread all over the world replacing common genotypes G1-G4. This situation seems to be frequent in those countries located at tropical regions. The present study shows the emergence of genotype G9 in samples collected in an urban hospital at the highlands of Ecuador. A total of 74 samples were studied, 39.2% of which were rotavirus positive from november 2005 to february 2006. Serotype P8-G9 was present in 76% of the samples, while the classical serotypes were detected in 7.2% and 16.8% was represented by possible co-infections

TABLA DE CONTENIDOS

CONTENIDO	No. Pág.
1. INTRODUCCION.	1
1.1. Rotavirus.	1
1.1.1. Familia Reoviridae.	1
1.1.2. Estructura morfológica y morfogénesis del rotavirus.	1
1.1.3. Estructura genómica del rotavirus.	2
1.1.4. Clasificación serológica del rotavirus.	5
1.2. Ciclo de replicación del rotavirus.	6
1.2.1. Absorción, penetración y desmembramiento.	6
1.2.2. Transcripción y replicación.	7
1.2.3. Ensamblaje.	7
1.2.4. Liberación del virus.	8
1.3. Efectos en las células hospedador.	9
1.4. Transmisión.	11
1.5. Epidemiología.	12
1.6. Reacción en cadena de la polimerasa.	14
1.6.1. RT-PCR.	14
2. Objetivo general.	15
3. Objetivos específicos.	16
4. Justificación.	16
5. Área de Trabajo.	16
6. Materiales y Métodos.	16
6.1. Materiales	16
6.2. Métodos.	17
6.2.1. Colección de muestras.	17
6.2.2. Procesamiento de muestras.	17
6.2.2.1. Extracción de ARN.	18
6.2.2.2. RT-PCR y primera amplificación para G y P.	18
6.2.2.3. Segunda amplificación para G y P.	20

6.2.2.4. Electroforesis.	21
7. Resultados	21
7.1. Numero de muestras obtenidas.	21
7.2. Procesamiento de muestras en el Laboratorio de Microbiología de la USFQ.	21
8. Discusión.	22
9. Conclusiones y Recomendaciones.	26
9.1. Conclusiones.	26
9.2. Recomendaciones.	26
10. Bibliografía.	28
11. Figuras.	30
12. Tablas	38

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Rotavirus

1.1.1. Familia Reoviridae

El rotavirus pertenece a la familia Reoviridae, la cual presenta una morfología y propiedades físicas comunes como: el tamaño de las partículas virales miden aproximadamente de 65 a 75 nm de diámetro (Figura 1); posee una estructura icosaédrica con 3 capas proteicas que forman una cápside compuesta. Estas capas se denominan capa externa, intermedia e interna, respectivamente. Además poseen 60 peptómeros que se extienden 120 Å a partir de la superficie lisa de la capa externa. Esta familia contiene la ARN Polimerasa dependiente de ARN y otras enzimas que producen los transcritos de ARN con “casquete de adenina”. Adicionalmente el genoma de esta familia contiene 11 segmentos de ARN de doble cadena (dsARN). Todos los géneros de esta familia son capaces de producir recombinación genética y la replicación del mismo ocurre en el citoplasma de las células infectadas. Para cultivar los géneros de la familia Reoviridae es necesario un tratamiento proteolítico de enzimas que potencia la capacidad de infección de los virus mediante la destrucción de la cápside externa polipeptídica. Los virus demuestran una única vía morfogenética. Esto significa que las partículas virales se forman mediante un encapsulamiento en el retículo endoplasmático mientras que estas son liberadas mediante lisis celular (Kapikia et al. 1996).

1.1.2. Estructura, Morfología y Morfogénesis del Rotavirus

Las partículas completas miden 70 nm aproximadamente. Estas poseen una cápside icosaédrica distintiva, compuesta por una capa interna y una intermedia que a su vez están

constituidas por proteínas estructurales. Hacia el interior de estas capas se encuentra una tercera, donde permanece el núcleo del virus, el cual está compuesto por 11 segmentos de ARN de doble cadena (Merry et al. 1996).

Las partículas rotavirales que no poseen la capa externa miden aproximadamente 55 nm de diámetro y poseen una superficie rugosa debido a que los capsómeros triméricos de la membrana interna se proyectan hacia la periferia. Algunos autores han descrito la existencia de 132 capsómeros arreglados simétricamente. También han demostrado que la capa externa contiene pequeños huecos que corresponden a los respectivos extremos distales de los capsómeros triméricos de la membrana interna (Merry et al. 1996). Estudios más recientes han corroborado y establecido una superficie icosaédrica con 13 aristas y la presencia de 132 canales que unen la superficie externa con el núcleo interno. Ciento veinte canales están a lo largo de los 6 centros del icosaedro y 12 canales a lo largo de los otros 5 centros (Gentsch, et al. 2005), (Figura 2).

La cápside tiene una apariencia hexagonal y posee aproximadamente 37 nm de diámetro. Los 11 segmentos de doble cadena de ARN codifican tanto proteínas estructurales (VP) como no estructurales (NSP)

El género del rotavirus se diferencia de los demás géneros de la familia *Reoviridae* por poseer 3 partículas distintivas, VP4, VP6 y VP7 que pertenecen a la parte superficial de la capa externa tal como lo muestra la Figura 2.

1.1. 3. Estructura Genómica del Rotavirus

El genoma del rotavirus contiene 11 segmentos de doble cadena de ARN, su peso molecular puede variar de 2×10^5 a 2.2×10^6 daltons equivalentes a 0.6 - 3.3 pares de kilobases. Los 11 segmentos de ARN se clasifican dentro de 4 grupos basados en su longitud y análisis de secuencia. La distribución de los 11 segmentos es también evidente en el orden de migración de la electroforesis de poliacrilamida libre de ARNsas (Figura 3). Para el serogrupo A de los rotavirus hay 4 segmentos largos, 2 segmentos medianos, 3 segmentos pequeños y 2 aun más pequeños. Este patrón contrasta con la mayoría de los reovirus los cuales contienen 3 grupos principales (Merry et al. 1996).

La Tabla 2 resume las propiedades de cada segmento de ARN de una cepa de rotavirus humana. Las secuencias de las diferentes cepas de rotavirus presentan características generales acerca de su estructura. Cada segmento de ARN empieza con extremo 5' guanilato seguido por un set de secuencias conservadas que son parte de las series no codificantes del extremo 5'. Adicionalmente cada segmento posee una secuencia de marco de lectura abierto (ORF) y su respectivo codón de paro de transcripción. Se encuentra también otro segmento no codificante que contiene un subset de terminales 3' conservados. Cada segmento finaliza con el extremo terminal 3' de citidina. La longitud de las secuencias no codificantes de los extremos 3' y 5' pueden variar de acuerdo a cada gen, en este caso particular no hay señal de poliadenilación (Kapikian et al. 1996).

Algunos estudios demuestran que todos los genes son monocistrónicos con excepción de los genes 9 y 11 (Sardi et al. 2005). Adicionalmente, la Tabla 3 y la Figura 2 muestran las proteínas codificadas por cada uno de los 11 segmentos, su localización, su tamaño y función.

La nomenclatura de las proteínas virales fue designada a partir de la cepa SA11 determinando las siglas VP como símbolo de las proteínas estructurales seguidas por un número que se refiere al peso molecular de cada proteína. Un análisis de los 11 segmentos codificantes estableció que hay 6 proteínas estructurales y 5 no estructurales. Los segmentos de ARN 1, 2 o 3 del rotavirus codifican las proteínas estructurales del núcleo y del sub-núcleo designadas como VP1, VP2 o VP3, mientras que el segmento 6 codifica para la proteína interna de la cápside VP6. Los segmentos 4 y 9 codifican para las proteínas de la membrana externa de la cápside VP4 y VP7 respectivamente, tal como lo muestra la Figura 2.

La proteína VP4 es multifuncional gracias a que es responsable de la actividad de hemoaglutinación lo cual fue confirmado por un estudio que utilizó anticuerpos monoclonales anti-VP4. Adicionalmente juega un rol importante en la virulencia e induce anticuerpos neutralizantes, los anticuerpos que protegen al hospedador del rotavirus. Se piensa también que es la responsable del anclaje del virus de la célula. La denaturación proteolítica de VP4, genera las proteínas VP5 y VP8 que están directamente involucradas en el grado de inefectividad viral. Esta proteína está presente en la membrana externa en series de 60 picos cortos, aproximadamente de entre 10 y 12 nm de longitud. La proteína VP4 no es glucosilada y tiene un peso molecular de 88000 y constituye el 1.5% de la proteína del virión (Kapikian 1996), (Figura 4).

La proteína VP7 es glucosilada y es la que presenta mayores rangos de neutralización antigénica detectados por suero hiper-inmune. Adicionalmente ha servido como base para la identificación de los serotipos rotavirales. Su peso molecular es de 34000 daltons y está localizada en la capa externa de la cápside formando una superficie lisa la cual constituye un 30% de la proteína del virión. Este hecho la constituye en la segunda proteína más abundante

del rotavirus así como también en el mayor constituyente de la cápside (Figura 4). Esta proteína es codificada por los segmentos 7, 8 o 9 dependiendo de la cepa de rotavirus. Se han descrito 14 serotipos distintos para la proteína VP7 del grupo A. La secuencia de aminoácidos de la proteína VP7 pertenecientes a los 14 serotipos ha sido deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del gen VP7. La Figura 4, por otro lado, muestra que existen 9 regiones lineales de aminoácidos de la secuencia de VP7 que son altamente divergentes.

Existen 5 proteínas no estructurales (NS) codificadas por los segmentos 5,7,8,10 y 11, que han sido nombradas de acuerdo a sus pesos moleculares. Estas proteínas, fueron encontradas en células infectadas. Los nombres de estas proteínas son: NS53 , NS35, NS34 , NS28 y NSS26.

1.1.4. Clasificación Serológica del Rotavirus

Los rotavirus son clasificados serológicamente mediante un esquema que establece varios serogrupos y múltiples serotipos, dentro de cada serogrupo. Los serotipos de cada serogrupo comparten reacciones antigénicas cruzadas que son detectadas por distintas pruebas serológicas como la inmunofluorescencia, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) y microscopia electrónica inmunológica (IEM).

Los rotavirus comprenden 6 serogrupos distintos (A hasta F). Los serogrupos A, B y C son frecuentemente encontrados en humanos y animales mientras que los virus de los grupos D, E y F han sido encontrados únicamente en animales. Los virus de cada grupo son capaces de recombinarse e intercambiar segmentos genómicos pero esta re-arreglos no ocurren entre los virus de diferentes grupos. Los determinantes antigénicos o antígenos comunes, son

encontrados en la mayoría de las proteínas estructurales y probablemente en las no estructurales (Merry et al. 1996).

Se ha establecido que los rotavirus del grupo A, son causa de diarrea en infantes, mientras que los rotavirus del grupo B han sido asociados con epidemias anuales de diarreas severas principalmente con adultos en China. Los rotavirus del grupo C, han sido reportados esporádicamente en muestras fecales de niños con diarrea en distintos picos epidemiológicos (Campos et al. 2005).

Dentro de cada serogrupo, los rotavirus son clasificados en distintos serotipos definidos por la reactividad del virus en reducción de placa (fluorescent foci production) y ensayos de neutralización con sueros hiper-inmunes. Estos ensayos han identificado 14 serotipos para la glucoproteína de superficie de la capa externa VP7 y 19 para VP4. Adicionalmente se han definido epitopos específicos tipo G para VP7 y epitopos específicos tipo P para VP4. Es por eso que la clasificación de los serotipos de rotavirus se la realiza mediante un sistema binario usando la combinación de los epitopos tipo P y G de las proteínas VP4 y VP7 respectivamente (Kapikian et al. 1996).

1.2.Ciclo de Replicación del Rotavirus

1.2.1. Absorción, Penetración y Desmembramiento

Los mecanismos iniciales del ciclo del rotavirus no se han definido por completo. Algunos investigadores sostienen que es posible que el anclaje del rotavirus ocurra inicialmente por la interacción con los receptores específicos para ácido siálico, seguido por una segunda interacción paralela y cambios conformacionales de las proteínas virales de anclaje. Después del anclaje, la partícula viral se internaliza en células activas, alrededor de

60 a 90 minutos después. El mecanismo de internalización no se ha descrito aún. Los últimos estudios han sugerido que la entrada del rotavirus ocurre por endocitosis mediada por receptores y que las partículas entrantes son rápidamente transportadas a los lisosomas; se sugiere que el desmembramiento puede ser efecto de las enzimas lisosómicas (Merry et al. 1996).

1.2.2. Transcripción y Replicación

La síntesis de transcriptos virales es mediado por la ARN polimerasa dependiente de ARN endógena, componente del virión. Se presume que las partículas rotavirales contienen la misma actividad enzimática de los reovirus lo que incluye la transcriptasa, una fosfohidrolasa guanidil transferasa y dos metilasas. La transcripción de rotavirus requiere ATP hidrolizable para la polimerización. Esta molécula puede ser usada para la inicialización o elongación de las moléculas de ARN en el citoplasma celular (Kapikian et al. 1996).

1.2.3. Ensamblaje

Una característica distintiva de la morfogénesis del rotavirus es que las partículas virales que se ensamblan en los viroplasmáticos se encapsulan a través de la membrana del retículo endoplasmático (ER por sus siglas en inglés) y las partículas maduras son, en consecuencia envueltas en el ER hasta que es reemplazada por una fina capa de proteína que posteriormente formará la cápside externa, de donde saldrán partículas virales completas. Es importante recalcar que no todos los viriones pueden acceder a este encapsulamiento por lo que algunos de ellos solo tendrán 2 capas en su cápside. La mayoría de las proteínas estructurales y no estructurales son sintetizadas en ribosomas libres. Las

proteínas VP7 y NSP4 son sintetizadas en ribosomas asociados con la membrana del retículo endoplasmático las mismas que son insertadas en la membrana del organelo debido a la secuencia de aminoácidos en sus extremos de amino terminal (Kapikian et al. 1996).

1.2.4. Liberación del Virus

La microscopía electrónica demuestra que el ciclo del rotavirus termina cuando la progenie del virus es liberada por el hospedador mediante lisis celular. Se ha observado citólisis extensiva durante la infección y alteraciones drásticas en la permeabilidad del plasma de membrana de células infectadas. Se ha observado también que a pesar de la lisis celular quedan partículas virales asociadas con restos celulares sugiriendo que las partículas virales interactúan con estructuras celulares (Estes, et al. 1996).

A nivel general se necesitan requisitos básicos para la replicación del rotavirus. Estos requisitos se han formado en base a estudios en cultivos con células de riñón de monos (Kapikian et al. 1996):

1. El cultivo de la mayoría de cepas de rotavirus requiere proteasas exógenas en el medio de cultivo. Lo que asegura la activación de la infectividad viral por denaturación de la proteína VP4 de la cápside externa.
2. La replicación es totalmente citoplasmática
3. La células no contienen enzimas que replican dsARN por lo tanto los virus deben proveer las enzimas necesarias.
4. La función de los transcritos es producir proteínas y servir como plantilla para la producción de cadenas de ARN de sentido negativo. Una vez que (-) ARN ha sido polimerizado permanece como complemento de la cadena (+)

5. Los segmentos de dsARN son formados conjuntamente con las partículas virales por lo que moléculas (-) ARN o ssARN nunca son encontradas en células infectadas
6. Las partículas subvirales forman asociación con los viroplasmas y estas partículas maduran mediante el encapsulamiento a través de la membrana del retículo endoplasmático. En este proceso las partículas virales adquieren su capa externa de la cápside.
7. La lisis celular libera partículas virales.

1.3. Efectos en las Células del Hospedador

Los rotavirus poseen una capacidad limitada de tropismo en el tejido del hospedador. En la mayoría de los casos solo infectan el epitelio vellosos del intestino delgado. El virus generalmente demuestra una restricción sustancial hacia el hospedador, y las infecciones sintomáticas son usualmente restringidas a los infantes de cada especie. Se cree que la diarrea es el resultado de una infección vírica. En células permisivas el efecto citopático es generalmente evidente mientras que la muerte celular es precedida por la inactivación del ARN, ADN y síntesis proteica del hospedador. Es probable que la muerte celular sea el resultado de la función de los genes virales sobre un target específico que superan a los efectos acumulativos sobre el metabolismo del hospedador (Merry et al. 1996).

Los Rotavirus tienen la posibilidad de establecer infecciones persistentes en cultivos celulares y en ratones, combinadas con el síndrome de inmunodeficiencia severa (SCID) que normalmente son controladas por mecanismos inmunológicos (Campos et al. 2005)

La eliminación o liberación prolongada de rotavirus y el esparcimiento ocasional extraintestinal en niños inmunosuprimidos indican que la inmunidad mediada por células es importante para limitar las infecciones (Merry et al. 1996).

Se han realizado estudios infectando células humanas intestinales polarizadas (CaCO-2) las cuales han sido infectadas asimétricamente desde las membranas apicales o vaso laterales. Por lo que se han identificado lesiones en la mucosa del yeyuno de infantes y niños hospitalizados con infecciones por rotavirus, mostrando infiltración de células vellosas mononucleares atrofiadas en la lámina propia, retículos endoplásmicos distendidos, ensanchamiento mitocondrial y micro vellosidad irregular. Se han observado partículas virales en retículos endoplásmicos dilatados y en lisosomas de células epiteliales columnares y partículas virales en fagocitos de la lámina propia. Adicionalmente se ha detectado absorción de D-xylosa así como también función motora gastrointestinal anormal como consecuencia del retraso del vaciado de líquido. Algunos pacientes han mostrado bajo niveles de disacáridos (Kapikian, et al. 1996).

El período de incubación es de 1 a 4 días. Después de la replicación vírica en las células epiteliales intestinales se produce un cuadro inicial agudo con vómitos que a veces son en proyectil y diarrea. Al repicarse, los virus dañan los mecanismos de transporte del intestino y la pérdida de agua, sal y glucosa (Figura 5). Las células infectadas se destruyen, pero no hay infecciones ni hemorragias. En las heces aparece un número enorme de partículas víricas (10^{10} - 10^{11} /g). Por razones desconocidas son muy frecuentes los síntomas respiratorios (Kapikian, et al. 1996).

Los rotavirus son parásitos bien adaptados al medio intestinal. Es por eso que la ingestión de tan solo 10 partículas puede causar infección y generar una diarrea cargada con

enormes cantidades de partículas infecciosas. La deshidratación es rápida en los lactantes y la reposición de líquidos y sal por vía oral o intravenosa puede salvar la vida del paciente (Mims et al. 2000).

Las infecciones por rotavirus son frecuentes especialmente en niños menores de 2 años y en los meses más fríos del año. Los anticuerpos IgA presentes en el calostro protegen durante los primeros meses de vida. De cuando en cuando se producen epidemias en las guarderías. Los niños mayores, son menos sensibles ya que casi todos han desarrollado anticuerpos, pero incluso en adultos se producen infecciones ocasionalmente (Campos et al. 2005).

1.4. Transmisión

Los rotavirus son transmitidos por vía fecal oral, aunque algunos autores especulan que algunos rotavirus pueden ser transmitidos por vía respiratoria gracias a 3 factores: (1) la adquisición rápida de anticuerpos contra rotavirus en los primeros años de vida en todos los extractos sociales. (2) Picos de infecciones largos en las que el esparcimiento fecal no pudo ser documentado y (3) la frecuencia de molestias respiratorias en pacientes con gastroenteritis por rotavirus. Adicionalmente se han reportado la detección de rotavirus en el tracto respiratorio superior (Ramig 2005). Sin embargo la predominancia de otros factores sugiere que éste no es un modo usual de transmisión.

Desafortunadamente la fuente de infección de niños que normalmente no están en contacto con otros infantes con gastroenteritis, no ha sido reportada. Es probable que las infecciones sean adquiridas por personas o familiares mayores que contienen infecciones asintomáticas (Campos et al. 2005).

Se piensa que la resistencia a la activación física (casos en los que el número de partículas virales son grandes) puede contribuir a la transmisión del rotavirus humano (Ramig 2005). Otras investigaciones sugieren que la contaminación ambiental puede ser una fuente de infección así como la persistencia del rotavirus en determinadas salas de maternidades y la alta frecuencia de infecciones nosocomiales por rotavirus en los hospitales (Campos et al. 2005).

A pesar de que la transmisión entre especies distintas es un evento raro; algunos autores especulan sobre el rol de los animales como fuente de infección de rotavirus. Esta afirmación se basa en las siguientes observaciones: (1) ciertas cepas de rotavirus de animales presentan reacciones cruzadas con cepas de rotavirus de humanos y (2) ciertas cepas de rotavirus de animales pueden infectar humanos (Kapikian et al. 1996).

Algunas medidas importantes para evitar el esparcimiento y la infección del rotavirus son la desinfección del material contaminado y estricta higiene de las manos, especialmente en hospitales o maternidades

1.5. Epidemiología

Los rotavirus son ubicuos, el 95% de los niños entre 3 y 5 años son infectados a nivel mundial. La prevalencia de la infección por rotavirus en los neonatos ha sido extensamente documentada. Estudios han demostrado infecciones asintomáticas que fueron causadas por cepas inusuales de rotavirus. El rango de edad mayormente afectado por rotavirus son los neonatos de 4 a 36 meses quienes adicionalmente poseen el mayor riesgo de ser hospitalizados. Por lo general las infecciones de rotavirus en adultos son subclínicas pero ocasionalmente causan enfermedad en los padres de los niños con diarrea por rotavirus. En los

lugares en donde los climas son templados la diarrea rotaviral ocurre predominantemente durante el otoño y el invierno mientras que en países tropicales y en vías de desarrollo la estacionalidad es menos marcada (Gentsch et al. 2005).

Veinte y siete estudios realizados en 20 países entre 1990 y el 2000 estimaron una incidencia de diarrea de 3.8 episodios por niño por año entre infantes menores de 11 meses y 2.1 episodios por niño por año en infantes de 1 a 4 años de edad. Se estima que hay 125 millones de infantes de 0 a 11 meses de edad y 450 millones de niños entre 1 y 4 años que residen en países en vías de desarrollo. Por tanto se puede estimar que hay 1.4 billones de episodios de diarrea en niños menores de 5 años. De los cuales aproximadamente 130 millones de casos se deben a infecciones por rotavirus. De esta cifra 104 millones de episodios de diarrea pueden ser solucionados con atenciones domésticas, 23 millones con visitas clínicas y 1.9 con hospitalizaciones (Parashar et al. 2003).

1.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa

1.6.1. RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

RT-PCR es una modificación de PCR para amplificar la información contenida en ARN. En primer lugar, esta técnica transcribe la información de una molécula de ARN a una molécula de ADN mediante la acción de una enzima conocida como Transcriptasa inversa, proveniente de retrovirus. El resultado de esta reacción es del ADN complementario (cADN) el cual puede ser amplificado usando la técnica de PCR (Chanock et al. 1999).

La retro transcriptasa posee un alto grado de error al transcribir ADN a partir de ARN, aproximadamente 1 en 2000 bases. Este error permite a los retrovirus mutar rápidamente (Chanock et al. 1999). La identificación de los genotipos correspondientes a los serotipos

rotavirales se basa en el peso molecular de los mencionados genes. Para esto es necesaria la retro-trascricpción del genoma viral, cuyo resultado es el cADN de rotavirus. Esta molécula se encuentra en la misma cantidad que las partículas virales en las muestras, es por eso que se hace necesaria una primera amplificación poco específica que tiene por objeto el incremento del número de copias de cADN rotaviral. Una vez concluido este proceso, se realiza una segunda amplificación específica que usa un conjunto de primers definidos para cada uno de los distintos serotipos, de los cuales solo un par de sondas se acoplará al genoma viral determinando el serotipo del virus (Figura 6). Las Tablas 3 y 4 presentan los tipos de primers que se utiliza para serotipificar las muestras con rotavirus G y P respectivamente (Vera, et al, 1985).

En este trabajo se usó la correlación entre genotipo y serotipo para determinar la clasificación del rotavirus presente en las muestras obtenidas de niños del hospital Baca Ortiz de la ciudad de Quito. La designación de un serotipo es el reflejo de la combinación de los distintos epitopos de VP4 y VP7, para esto, se utilizó RT-PCR y se obtuvo la amplificación los genes de las mencionadas proteínas a partir del ARN extraído de muestras infectadas con rotavirus.

2. OBJETIVO GENERAL

- Identificar las cepas circulantes de rotavirus en una muestra de 30 niños con diarrea, en el hospital Baca-Otriz, de la ciudad de Quito

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar la técnica de la retrotranscripción usando ARN extraído de rotavirus para la identificación de los serotipos rotavirales.

- Comparar los serotipos de rotavirus encontrados en Quito con las descritas en otras regiones del Ecuador y del mundo.

4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, entre 2.5 y 3.2 millones de niños mueren a nivel mundial con infecciones asociadas a la diarrea. De estas cifras, entre 440.000 (*Bréese, et al, 2005*) y 600.000 mueren a causa de infecciones con rotavirus del grupo A. Adicionalmente, estas mismas infecciones representan unos 25 millones de consultas médicas y 2 millones de hospitalizaciones. A pesar de que tanto los niños que viven en países desarrollados como los que viven en países en vías de desarrollo, tienen la misma probabilidad de contraer infecciones por rotavirus, desafortunadamente, el 82% de las muertes a causa de las infecciones rotavirales, ocurre en países en vías de desarrollo (*O'ryan, et al, 2005*). Esto se debe a la atención médica insuficiente de niños deshidratados y a la carencia de tratamiento (*Vargas, et al, 2006*).

La identificación de las distintas cepas de rotavirus en Ecuador, es el primer paso para desarrollar una vacuna local. Es por eso que es importante determinar las poblaciones y serotipos rotavirales en la ciudad de Quito y en un futuro determinar en las demás regiones del país.

5. ÁREA DE TRABAJO

Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología. Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad San Francisco de Quito. Cumbayá, Ecuador.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Materiales

Equipos

- Congelador de -80°C .
- Centrifuga
- Micropipetas
- Tubos Ependorff
- Termociclador
- Cámara de Electroforesis
- Cámara con lámpara UV

Reactivos

- Kit para detección de rotavirus Stick Rotavirus de Invitrogen
- Trizol
- Cloroformo
- Etanol
- Primers 9con1; 9con2; Con2; Con3
- Kit SuperScript III RT/Taq Platinum de Invitrogen
- Kit Ready to go de Invitrogen

6.2. Métodos

6.2.1. Colección de Muestras

Al personal del laboratorio clínico del hospital Baca Ortiz se le facilitó el kit para detección de rotavirus *Stick Rotavirus* de Invitrogen cuyo protocolo se detalla a continuación:

Protocolo para detección de rotavirus en heces:

- Se tomó 100 μ L de muestra líquida de heces o 30 mg de muestra sólida de heces y se colocó en un tubo de ensayo limpio. Luego se agregó 1000 μ L de la solución A del kit, al tubo con la muestra. Después de homogenizar y dejar en reposo por 5 minutos se insertó la tirilla de detección de rotavirus. Antes de extraer la misma, se esperó de 3 a 5 minutos. La Tabla 6 muestra el número de bandas que indican presencia o ausencia de rotavirus en la muestra.
- Se tomó únicamente las muestras positivas para rotavirus y se las almacenó a -80°C .
- En total se trabajó con 74 muestras

6.2.2. Procesamiento de Muestras

Se generaron 6 grupos de muestras llamados lotes, los mismos que fueron procesados conforme se obtuvieron del Hospital Baca Ortiz. La Tabla 1 muestra la distribución de los mismos. Cada muestra fue asignada con el código LXY donde L = lote; X= número de lote y Y= número de muestra del lote.

6.2.2.1. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN de virus en las heces, se elaboró un procedimiento a base de trizol, cloroformo y etanol, derivado de protocolos estándares el cual se detalla a continuación:

Protocolo para extracción de ARN

- Se tomó 250 μ L de muestra líquida o el equivalente a 300 mg de muestra sólida y se añadió 750 μ L de trizol (Invitrogen). Después de homogenizar la muestra con pipeteo e incubarla por 5 minutos se añadió 200 μ L de cloroformo.
- Luego de mezclar vigorosamente cada tubo durante 15 segundos, se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- Se transfirió estrictamente la fase acuosa a un tubo limpio. Luego se añadió 5 μ L de isopropanol. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- Se removió el sobrenadante y se añadió 100 μ L de etanol 75% a cada tubo. Después de centrifugar a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C se removió el sobrenadante y se secó al vacío de 5 a 10 minutos.
- Se resuspendió el extracto de ARN con 50 μ L de agua libre de ARNsas y se almacenó a -80°C.

6.2.2.2. RT-PCR y Primera amplificación para G y P

Una vez extraído el ARN rotaviral, se realizó una retrotranscripción para obtener cADN. Luego realizaron 2 amplificaciones del cADN obtenido. La primera tuvo por objeto aumentar el número de copias de cADN y la segunda, amplificar los segmentos específicos para G y P. Para la serotipificación de G se usó los primers 9con1 cuya secuencia es: *tag ctc ctt tta atg tat gg y* 9con2 cuya secuencia es *gta taa aat act tgc cac ca*, mientras que para la identificación de P se usó

los primers Con2 cuya secuencia es: *tgg ctt cgc tca ttt ata gac a* y Con3 secuencia es: *att tcg gac cat tta taa cc*.

Adicionalmente, se trabajó en dos áreas distintas. El área gris, lugar en donde se realizó las mezclas de primers y programa de denaturación de ARN y el área blanca, en donde se trabajó con ARN rotaviral.

Área Gris

- En primer lugar, se preparó una mezcla de primers consenso (MC1G). Para esto se tomó 0,5 µL del primer 9con1 20 µM, 0,5 µL del primer 9con2 20 µM y 1,5 µL de dH₂O por cada muestra y se mezcló con pipeteo.
- Se utilizó el mismo procedimiento y volúmenes de los primers 9con1 y 9con2 (específicos para la serotipificación de la proteína G) para preparar la mezcla de primers consenso Con2 y Con3 (MC1P) específicos para la serotipificación de la proteína P.
- Para permitir la acción de las enzimas RT y Taq es necesario denaturar el ARN rotaviral puesto que éste es de doble cadena. Para esto se tomó 5 µL del ARN extraído y 2,5 µL de la mezcla de primers consenso MC1G, en un recipiente nuevo por muestra. Luego se llevó al programa de denaturación previamente fijado en el termociclador, el cual se detalla en la Tabla 7.
- Se utilizó el mismo procedimiento y volúmenes de MC1G (específico para genotipificación del gen de la proteína G) para MC1P, específico para la serotipificación de la proteína P.

Área Blanca

- Se usó el kit *SuperScript III RT/Taq Platinum* de Invitrogen. Se realizó una mezcla madre (MC2G) para la cual se colocó 25 μL del reactivo 2X Reaction Mix que provee el kit, 2 μL de la mezcla de enzimas RT-Taq que provee el kit, 15,5 μL de dH_2O por muestra en un solo tubo.
- Para realizar la retrotranscripción y primera amplificación, se añadió 42,5 μL de la mezcla MC2G a los tubos que contienen 2,5 μL de la mezcla de primer consenso (MC1G) y los 5 μL de ARN extraído y que han sido sometidos previamente al programa de denaturación. Luego se los llevo al termociclador bajo el programa indicado en la Tabla 8.
- Se utilizó el mismo procedimiento y volúmenes de MC2G (específica para la genotipificación de la proteína G) para MC2P, específica para la genotipificación de la proteína P.

6.2.2.3. Segunda Amplificación para G y P

Para la genotipificación de G se usó los primers 9con2 y pool de primers G, mientras que para la identificación de P se usó los primers Con3 y pool de primers P bajo el mismo protocolo y volúmenes.

Área Blanca

- Para la segunda amplificación se usó los tubos para PCR *Ready to go* de InvitroGen. En cada uno se colocó 1 μL del pool de primers G, 1 μL de 9con2 μL del producto de la primera amplificación de G y 21 μL de dH_2O .
- Una vez preparados los tubos, se los llevó al termociclador bajo el programa descrito en la Tabla 9.

- Se utilizó el mismo procedimiento y volúmenes de 9con2 y el pool G (específica para la genotipificación de la proteína G) para Con3 y el pool P, específica para la genotipificación de la proteína P.
- Los productos obtenidos de la segunda amplificación, tanto de G como de P, se los almacenó a -20°C

6.2.2.4. Electroforesis

- Se prepararon 4 geles de agarosa al 1,8%. Cada gel fue preparado con buffer TBE 1X y de 0,2 a 1 µL de bromuro de etidio. Se colocó el gel en la cámara de electroforesis y una vez solidificado, se lo cubrió con buffer TBE 1X. Después de mezclar 10 µL del producto de la segunda amplificación de cada muestra con 2 µL de buffer de carga, se procedió a inocular 10 µL de la mezcla en las canaletas de los geles.
- Para cada gel, se dejó correr el campo electromagnético durante 4 horas con una intensidad de 50 V. Transcurrido ese tiempo, se transfirió el gel a la lámpara UV con el objeto de tomar una fotografía de cada gel y observar la migración del ARN rotaviral.

7. RESULTADOS

7.1. Número de Muestras Obtenidas

Después de tres semanas de colaboración con el hospital Baca Ortiz, y de procesar 74 muestras de heces, se obtuvieron 29 positivas para rotavirus usando 3 kits de detección rotaviral con una capacidad para procesar 25 muestras cada uno. La Tabla 10 muestra los detalles de la colección de muestras.

7.2. Procesamiento de Muestras en el Laboratorio de Microbiología de la USFQ

De las 74 muestras analizadas con el kit para detección rápida de rotavirus, en un periodo de tres semanas en el hospital Baca Ortiz de la ciudad de Quito, se obtuvieron 29 muestras positivas. De éstas, 27 pudieron ser tipificadas para G y P, mientras que solamente 1 para G y 1 no pudo ser tipificada ni para G o P. tal como lo muestran las Figuras 8, 9, 10 y 11. La Tabla 11 muestra los resultados del procesamiento de las muestras obtenidas. Estos datos demuestran que el 39% de las heces analizadas contenían rotavirus y el 96,5% de las muestras positivas pudieron ser procesadas exitosamente en el laboratorio de microbiología de la USFQ. Las Tablas 11, 12 y 13 detallan los serotipos correspondientes a las muestras analizadas de las mencionadas figuras.

8. DISCUSIÓN

La Tabla 16 muestra que el serotipo G fue exitosamente determinado en el 96,5% de las muestras para 3 cepas distintas: G9 con el 79,3% de las muestras procesadas; la cepa G2 con el 13,8% y el serotipo G1 con el 3,44%. En 3 muestras (10,3%) se observó la presencia de 1 banda de 110 bp y otra de 244 bp aproximadamente (muestras: L14, L15 y L18). Este hecho puede implicar falta de especificidad del primer o una coinfección de las cepas G2 y G9.

De la misma forma, la Tabla 16 señala que el serotipo P fue determinado en el 93,1 % de las muestras para 3 cepas distintas, P4, P6 y P8. La cepa P4 se presentó en asociación con la cepa P8 en el 10,3 % de las muestras. El serotipo P6 se presentó en asociación con la cepa P8 en el 3,4 % y sin asociación en un porcentaje similar. La cepa P8 demostró su presencia en el 75,8 % de las muestras.

Se logró reconocer 7 categorías para clasificar las muestras procesadas. Esta clasificación se derivó de la combinación de las cepas G9, G2, G1, P8, P6 y P4 anteriormente mencionadas con sus respectivos porcentajes. La Tabla 15 muestra las diferentes categorías y los porcentajes de agentes detectados para estas categorías.

Estos datos demuestran que el serotipo dominante en las muestras analizadas es G9-P8. Los serotipos que circulan con mayor frecuencia en 35 países son G1P8, G2P4, G4P8 y G3P8 (Gentsch et al. 2005) a pesar de que algunos autores han descrito las cepas P1 a P4 para la proteína VP4 y G1 a G4 para la proteína VP7 como las más frecuentes. Las combinaciones P1G1, P1G3, P2G2 y P1G4 son las más frecuentes en Israel, Japón, Estados Unidos y América del Sur (Kapikian et al. 1996). Sin embargo los estudios realizados por Parashar, et al mencionan que los serotipos P4 y P8 son los más frecuentes tal como lo muestra la Figura 7.

Otros estudios realizados en Brasil, India y Malawi demostraron que los serotipos predominantes fueron G5P8, G9P6, G8P6 y G8P4 respectivamente. La cepa G9P6 ha sido reportada en India por lo que a pesar de ser dominante en ese país, en un principio se la consideró común a nivel regional pero no mundial (Gentsch et al. 2005). Estudios más recientes han demostrado un aumento en la frecuencia de la cepa G9 entre 1993 (5,8 %) y 2001 (40%) colocándose como una cepa de importancia mundial para la elaboración de vacunas. La Figura 7 demuestra que el grado de incidencia de la cepa G9P8 figura dentro de las 5 más importantes a nivel mundial en un periodo de 6 años.

Se puede decir que los estudios realizados antes de 1990 sugirieron que solo había 4 serotipos comunes que circulaban virtualmente entre todos los infantes. Después, estudios más recientes que utilizaron técnicas de genotipificación con RT-PCR describieron o caracterizaron la identificación de por lo menos 42 combinaciones distintas entre P y G

representando una buena parte de las 110 combinaciones entre G y P teóricamente posibles. En la actualidad existen por lo menos 8 cepas globalmente distribuidas y las mas importantes son: G5, G8, G9 y P6. Esta lista tiende a crecer a medida de que continúan los estudios de serotipificación con RT-PCR. Al parecer algunas de las 42 cepas descritas en los últimos 11 años tienen importancia epidemiológica gracias a la recombinación genética, mientras que otras han infectado humanos a través de la transmisión interespecífica. (Asmah, et al, 2001)

Los resultados obtenidos en la ciudad de Quito a partir de las muestras colectadas, demuestran que el serotipo de mayor frecuencia de G es G9, correspondiente al grupo de cepas que han surgido a partir de 1995. Adicionalmente, se ha comprobado la presencia de las cepas G1 y G2, clásicamente descritas. Estos hechos comprueban que la prevalencia de las cepas nuevas va en crecimiento mientras que la prevalencia de las cepas clásicas va disminuyendo pero sin llegar a desaparecer. Dado que los rotavirus evolucionan mediante mutaciones puntuales, rearrreglos genéticos de genes no estructurales o eventos de recombinación, las recombinaciones entre los genes pertenecen a una constelación genómica es común. (Woods, et al, 1991).

La generación de nuevos genotipos P y G por la introducción de genes provenientes de serotipos nuevos representa otro mecanismo para el aumento de diversidad de rotavirus. Estudios de secuenciamiento del gen VP7 (Kapikian et al. 1996) sugiere que las cepas con el serotipo G9 detectadas en 1995 es distinta de las primeras cepas con serotipo G9 aisladas en los Estados Unidos una década atrás. Estos resultados indican que este linaje moderno no es descendiente directo del linaje original y puede ser el resultado de una introducción reciente entre los rotavirus humanos circulantes (Kapikian et al. 1996).

Por otro lado la gran diversidad del rotavirus principalmente en países en vías de desarrollo sugiere que las coinfecciones de 2 serotipos distintos de rotavirus pueden ser relativamente comunes. Los resultados de los estudios realizados por Parashar, et al, en el 2003, demuestran que existen 2 perfiles distintos de ARN en el mismo paciente. Los resultados de la genotipificación con RT-PCR de éste trabajo, han demostrado la presencia de más de un serotipo en la misma muestra (muestras L14 y L15). Se puede decir que la prevalencia de altos niveles de infecciones mixtas en países en vías de desarrollo desemboca en un mayor número de combinaciones entre G y P. En India se ha logrado identificar 9 combinaciones distintas de P y G en muestras colectadas en una sola ciudad, mientras que en estudios realizados en países desarrollados, se ha observado una menor incidencia de infecciones mixtas y menor diversidad de las cepas de rotavirus (Campos, et al. 2005)

Los datos de la Tabla 15 muestran una diversidad relativa al reportar cepas con combinaciones de G9, G2 y G1 con serotipos de P8, P4 y P6 en un número pequeño de muestras colectadas en la ciudad de Quito-Ecuador.

Las infecciones mixtas en neonatos pueden ser una importante fuente de serotipos nuevos de rotavirus. Se ha demostrado que en la década de los 70s las cepas con serotipos comunes de G y nuevos serotipos de P circulaban en la sala de maternidad de los hospitales sin producir síntomas de diarrea (Kapikian et al. 1996) lo que puede explicar en parte el apareamiento de las cepas G9/G2 – P8; G2 – P8/P4; G9/G2 – P8/P4; G1-P6; G9 – P8/P6 que muestra la Tabla 15 dado que las heces fueron colectadas en un hospital de niños de la ciudad cosmopolita en febrero, mes que se encasilla con el periodo de mayor infestación de rotavirus en varios países (de noviembre a marzo),(Parashar, et al. 1998).

La información obtenida del presente trabajo, engloba fundamentalmente tres aspectos: (1) La presencia de la cepa G9P8 en el 72,4 % de las muestras procesadas, que en la actualidad es uno de los serotipos de mayor distribución y prevalencia a nivel mundial, (2) la presencia de serotipos clásicos como G1, G2, P4 y P8 como rasgos de la prevalencia de estos serotipos en el pasado. (3) La presencia de combinaciones poco comunes como G1P6 y las coinfecciones de las muestras L14 y L15 que probablemente son el resultado de la convergencia de algunos factores como: la zona geográfica y realidad social que pertenece a un país en vías de desarrollo y finalmente, el periodo en el que se colectaron las muestras que coincide con uno de los picos de mayor infestación de rotavirus en varios países

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

9.1. Conclusiones

El periodo de colección de muestras en el hospital Baca Ortiz fue muy corto, por lo que se analizaron 74 muestras únicamente. Las 29 muestras positivas analizadas, fueron necesarias para determinar los serotipos circulantes en Quito, pero no suficientes para establecer la prevalencia de un serotipo en particular.

Las cepas identificadas coinciden con las más nuevas y de mayor prevalencia en países ubicados en zonas tropicales en el periodo entre enero 2006 y febrero 2006, lo que demuestra la gran facilidad de recombinación y ubicuidad del rotavirus.

9.2. Recomendaciones

El presente estudio evidenció la dominancia de una cepa relativamente nueva de rotavirus, rasgos prevalentes de cepas tradicionales y cepas aparentemente formadas por un

proceso de coinfección. Con el objeto de sensibilizar a mayor nivel la información obtenida, uno de los requisitos fundamentales para un próximo estudio radica en la necesidad de obtener un mayor número de muestras que abarquen un mayor rango de cobertura geográfica, en donde se representen significativamente variables como el lugar de colección de muestras; la zona geográfica y el periodo de recolección. Esto permitiría un análisis más completo y más exacto sobre la prevalencia de cepas de rotavirus en el Ecuador.

Por otro lado, una posible opción para completar los resultados de este estudio sería incluir la secuenciación de los genes y poder determinar una mejor caracterización molecular entre las diferentes serotipos rotavirales.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Jimena Peores-Vargas,1 Pavel Isa,1 Susana López, and Carlos F. Arias. Rotavirus Vaccine: Early Introduction in Latin America—Risks and Benefits. *Archives of medical Research*, 37 (2006) 1-10
2. Joseph S. Bresee, MD, FAAP, Umesh D. Parashar, MBBS, MPH,*\ Marc-Alain Widdowson, VetMB, MSc, Jon R. Gentsch, PhD, A. Duncan Steele, PhD,† and Roger I. Glass, MD, PhD. Update on Rotavirus Vaccines. *The Pediatric Infectious Disease Journal* Volume 24, Number 11, November 2005
3. Miguel O'ryan G. Vacunas anti-rotavirus: Al fin una realidad. *Rev Chil Infect* 2005; 22 (4): 345-354
4. Suzuki H, Sato T, Kitaoka S, Tazawa F, Konno T, Amano Y, Alprecht AA, Vera EG, Villalta JL, Numazaki Y, et al. A human atypical rotavirus found in an Ecuador infant with diarrhea 1985 Aug;146(4):481-2.
5. Rotavirus, enteric adenoviruses, caliciviruses, astroviruses, and other viruses causing gastroenteritis. In *Clinical Virology Manual*, 3rd Edition. S Spector, RL Hodinka, SA Young, Editors. Washington DC; ASM Press, 2000, pp. 270-294.
6. Estes M K. Rotaviruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 3rd ed. vol 2. New York: Raven Press, 1996, pp 1625-5573.
7. Sócrates Herrera, M.D.1, Leonardo Victoria, M.D.2, Olga Fernández, B.Sc.2, Anilza Bonelo, Ph.D.3, Blanca Liliana Perlaza, Ph.D.2, Proceso para el desarrollo de una vacuna Vol. 36 N° 1, 2005 (Enero-Marzo)
8. Acta del Sexto Simposio Internacional sobre el Rotavirus Instituto de Vacunas Albert B. Sabin
9. Distefano DJ, Kraiouchkine N, Mallette L, Maliga M, Kulnis G, Keller PM, Clark HF, Shaw AR., Novel rotavirus VP7 typing assay using a one-step reverse transcriptase PCR protocol and product sequencing and utility of the assay for epidemiological studies and strain characterization, including serotype subgroup análisis. *J Clin Microbiol*. 2005 Dec; 43(12):5876-80.
10. Jimena Peores-Vargas, 1 Pavel Isa, 1 Susana López, and Carlos F. Arias. Rotavirus Vaccine: Early Introduction in Latin America—Risks and Benefits. *Archives of medical Research*, 37 (2006) 1-10
11. Joseph S. Bresee, MD, FAAP, Umesh D. Parashar, MBBS, MPH,*\ Marc-Alain Widdowson, VetMB, MSc, Jon R. Gentsch, PhD, A. Duncan Steele, PhD,† and Roger I. Glass, MD, PhD. Update on Rotavirus Vaccines. *The Pediatric Infectious Disease Journal* Volume 24, Number 11, November 2005
12. Miguel O'ryan G. Vacunas anti-rotavirus: Al fin una realidad. *Rev Chil Infect* 2005; 22 (4): 345-354
13. Suzuki H, Sato T, Kitaoka S, Tazawa F, Konno T, Amano Y, Alprecht AA, Vera EG, Villalta JL, Numazaki Y, et al. A human atypical rotavirus found in an Ecuador infant with diarrhea 1985 Aug;146(4):481-2.
14. Rotavirus, enteric adenoviruses, caliciviruses, astroviruses, and other viruses causing gastroenteritis. In *Clinical Virology Manual*, 3rd Edition. S Spector, RL Hodinka, SA Young, Editors. Washington DC; ASM Press, 2000, pp. 270-294.

15. Estes M K. Rotaviruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 3rd ed. vol 2. New York: Raven Press, 1996, pp 1625-5573.
16. Sócrates Herrera, M.D.1, Leonardo Victoria, M.D.2, Olga Fernández, B.Sc.2, Anilza Bonelo, Ph.D.3, Blanca Liliana Perlaza, Ph.D.2, Proceso para el desarrollo de una vacuna Vol. 36 N° 1, 2005 (Enero-Marzo)
17. Acta del Sexto Simposio Internacional sobre el Rotavirus Instituto de Vacunas Albert B. Sabin
18. Distefano DJ, Kraiouchkine N, Mallette L, Maliga M, Kulnis G, Keller PM, Clark HF, Shaw AR., Novel rotavirus VP7 typing assay using a one-step reverse transcriptase PCR protocol and product sequencing and utility of the assay for epidemiological studies and strain characterization, including serotype subgroup análisis. *J Clin Microbiol*. 2005 Dec; 43(12):5876-80.
19. Gentsh JR, Laird AR, Griffin DD, et al., Serotype Diversity and Reassortment between Human and Animal Strains: Implications for Rotavirus Vaccine Programs, *The Journal of Infectious Diseases*; 192:2146-59, 2005
20. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI, Global Illness and Deaths Caused by Rotavirus Disease in Children, *Emerging Infectious Diseases*, vol.9, No. 5, May 2003
21. Santos N, Volotao EM, Soares CC, Campos GS, Sardi SI, Hoshibo Y, Predominance of Rotavirus Genotype G9 during the 1999, 2000 and 2002 Seasons among Hospitalized Children in the City of Salvador, Bahia, Brazil: Implications for Future Vaccine Strategies, *Journal of Clinical Microbiology*, Aug. 2005, p. 4064-4069
22. Castillo AR, Villa AV, Ramirez JE, Pimentel EM, Munguia MM, VP4 and VP7 Genotyping by Reverse Transcription of Human Rotavirus in Mexican Children with Acute Diarrhea, *Journal of Clinical Microbiology*, Oct. 2000, p. 3876-3878.
23. Woods P, Gentsh J, Gouvea V, et al., Distribution of Serotypes of Human Rotavirus in Different Populations, *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 1992, p. 781-785
24. Two Amplification Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Typing Protocol For Rotavirus Gene 4 (P Genotyping)
25. Two Amplification Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Typing Protocol For Rotavirus Gene 9 (G Genotyping)
26. Parashar UD, Bresee JS, Gentsh JR, Glass RI, Rotavirus, *Emerging Infectious Diseases*, vol. 4, No. 4, October-December 1998
27. Asmah RH, Grenn J, Armah GE, et al., Rotavirus G and P Genotypes in Rural Ghana, *Journal of Clinical Microbiology*, May 2001, p. 1981-1984.
28. Ramig RF, Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection, *Journal of Virology*, Oct. 2004, p. 10213-10220
29. Desselberger U, Rotavirus Infections Guidelines for Treatment and Prevention, *Drugs*, 1999, Sep: 58 (3): 447-452
30. Estes MK, *Fields of Virology*, Third Edition, B.N. Fields Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996.
31. Kapikian AZ, Chanock RM, *Fields of Virology*, Third Edition, B.N. Fields Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996.

11. FIGURAS

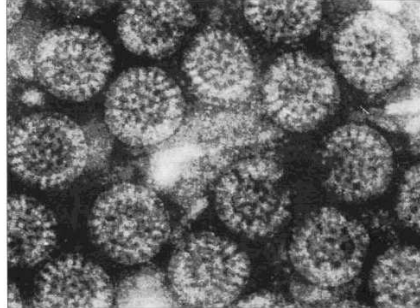


Figura 1: Fotografía electrónica de rotavirus. (Mims, 2000)

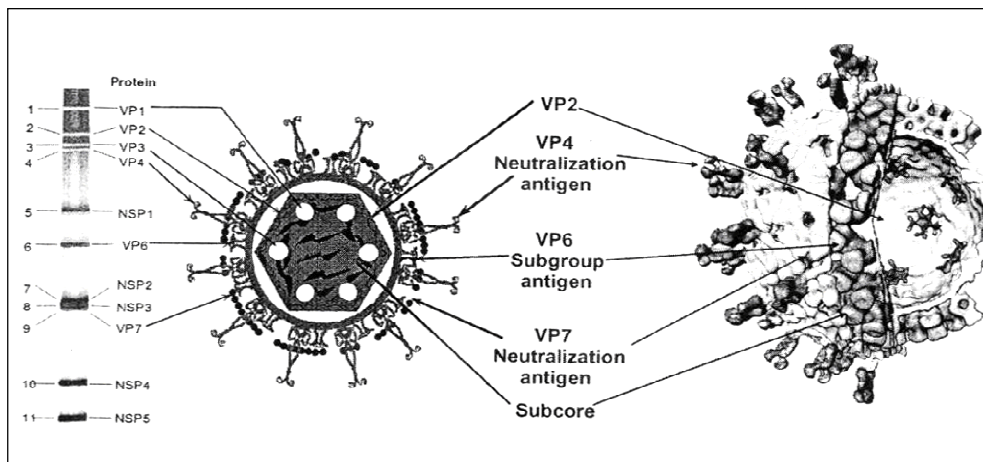


Figura 2: Estructura del rotavirus. Diagrama esquemático y crioelectrónico de un virión donde se muestra la localización de la mayoría de las proteínas estructurales. (Gentsch, 2005)

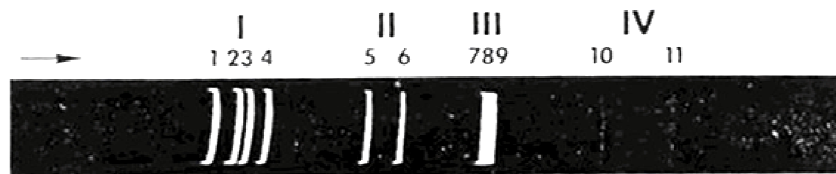


Figura 3: Electroforesis en gel de poliacrilamida de un patrón de rotavirus humano de la sepa A. Las bandas señalan los 11 segmentos de dsRNA que componen el genoma característico del Rotavirus (Kalica et. al., 1983)

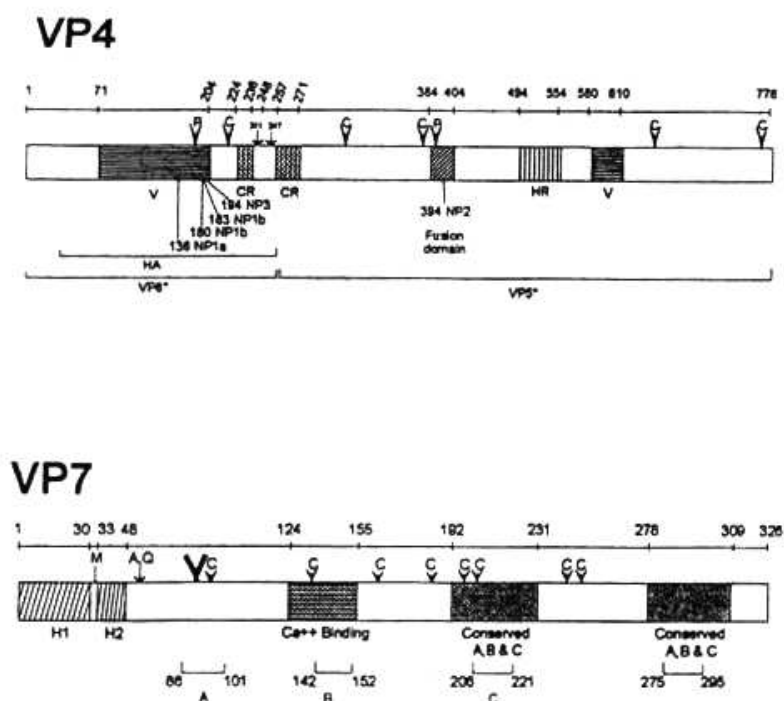


Figura 4: Diagrama esquemático de la estructura de los genes de las proteínas VP4 y VP7. En la parte superior se muestra el sitio de anclaje de la tripsina SA11 (↓), región variable (V), región conservada (CR) cisteínas conservadas (C) y prolina (P), la neutralización positiva (NP) NP1a (aminoácido 136) NP1b (aminoácidos 180 y 183), NP2 (aminoácido 394) y NP3 (aminoácido 194). La numeración mostrada para VP4 está basada en una proteína de 776 aminoácidos determinada por SA11fM, *Rhesus rotavirus* MMU18006 y rotavirus bovino C486. En la parte inferior del esquema, se muestra, para la VP7 dos dominios hidrofóbicos H1 y H2 (aminoácidos 6 al 23 y aminoácidos del 33 al 44), secuencias conservadas de los grupos de rotavirus A, B y C. Un sitio de unión con Ca^{2+} , cisteínas conservadas (C), señales de sitios anclaje (↓), el segunda metionina dentro del marco con un codón de iniciación (M), sitios de glicosilación (Y) y epítopos de neutralización para A, B y C. (Kapikian, 1996)

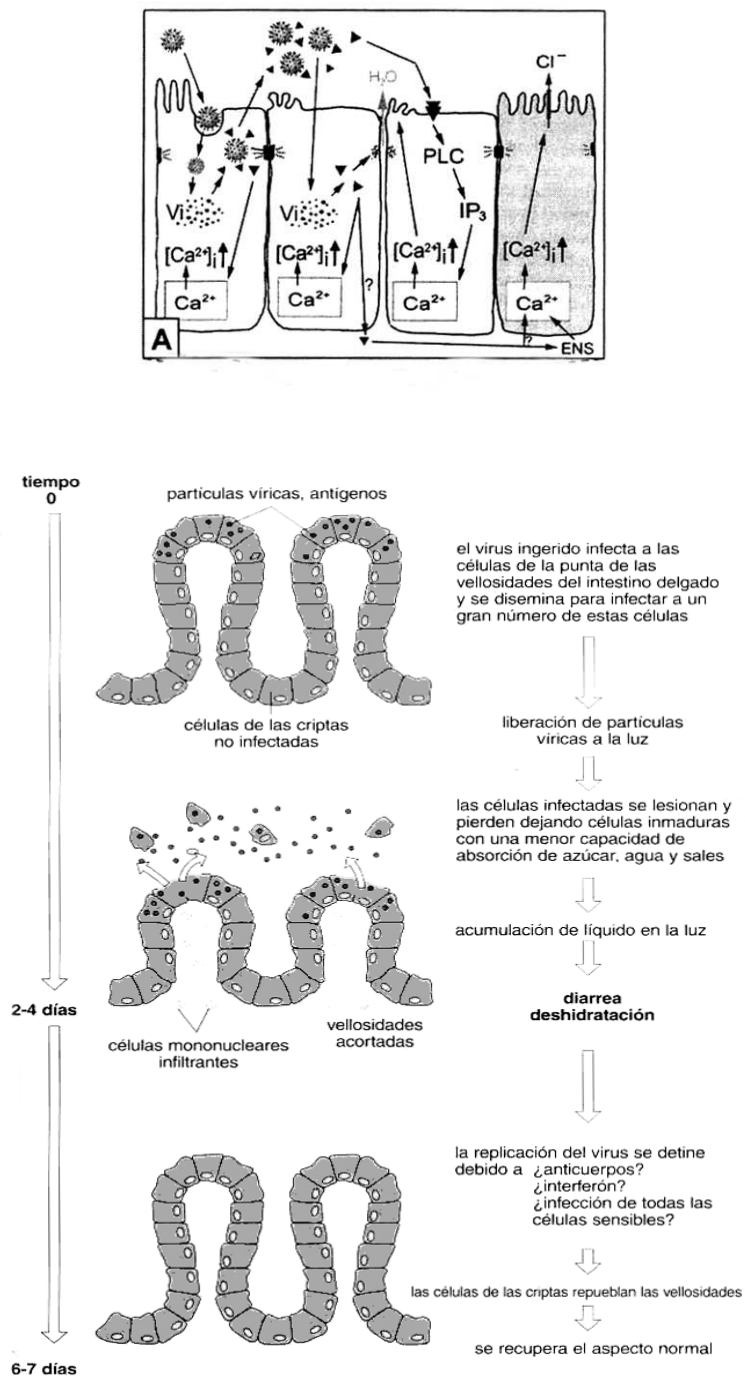


Figura 5: (A) Modelo de la inducción de diarrea por rotavirus, se puede observar la alteración del equilibrio iónico en las membranas celulares (Ramig, 2005). (B) Diagrama esquemático sobre el proceso general de inducción de diarrea por rotavirus (Mims, et. al., 2000).

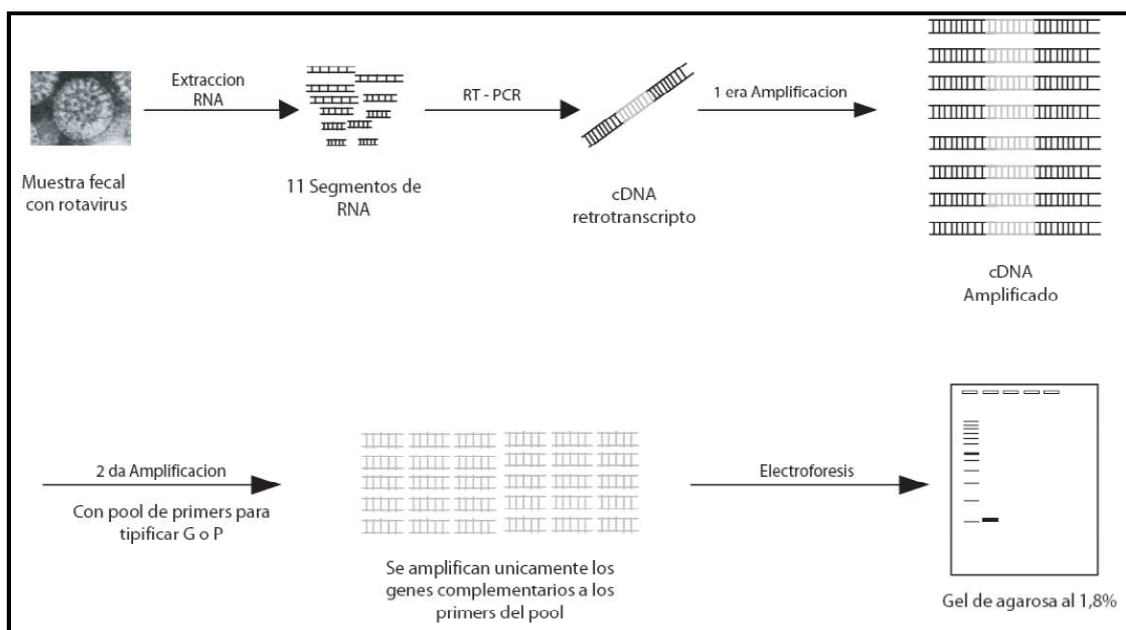


Figura 6: Diagrama que demuestra los pasos de extracción, retrotranscripción, PCR y electroforesis en la investigación.

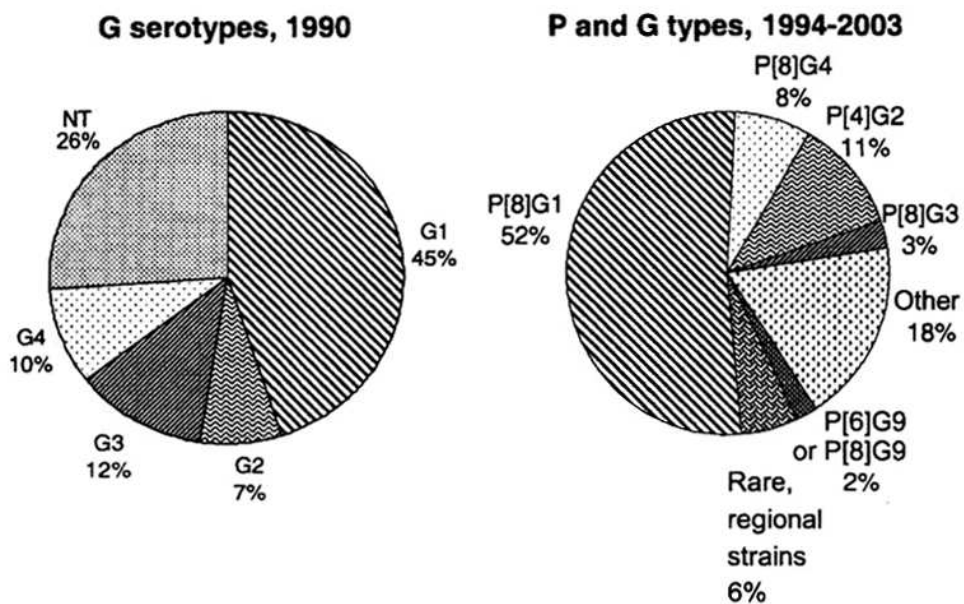


Figura 7 Prevalencia de las distintas cepas de rotavirus. (Parashar, et. al., 2003)

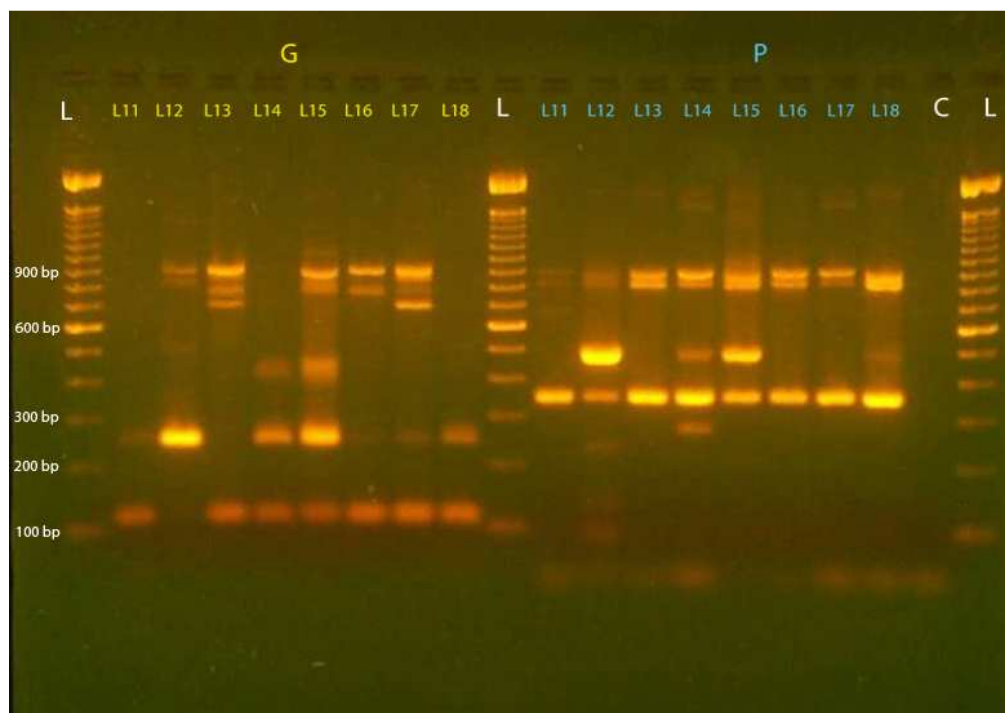


Figura 8: Electroforesis de la segunda amplificación de las muestras del lote 1. En la sección izquierda de la figura, aparecen las bandas que proporcionan la clasificación G de las muestras L11a L18 y lader (L). En la parte izquierda aparecen las bandas correspondientes a la clasificación P de las mismas muestras; control negativo (C). y lader (L) . Al combinar las clasificaciones G y P de una misma muestra, se obtiene el serotipo definitivo para cada una, siendo para las muestras L11, L13, L16 y L17 el serotipo G9-P8, resultado de la combinación de la banda de 110 bp (de la sección izquierda) y la banda de 330 bp (de la sección derecha. De igual forma se pudo obtener los serotipos G2-P8/P4 para la muestra L13, G9/G2-P4/P8 para L14 y L15, G2-P9/P4 para L12, G9/G2-P8 para L18.

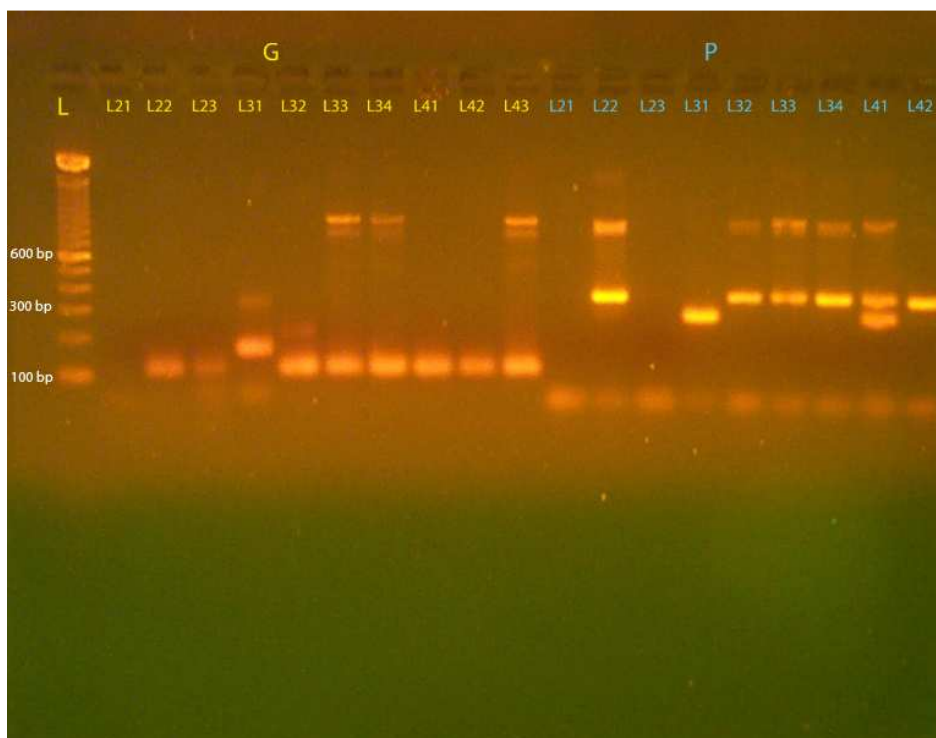


Figura 9: Electroforesis de la segunda amplificación de las muestras de los lotes 2,3 y 4. Aparecen las bandas que proporcionan la clasificación G y P de las muestras L21, L22, L23, L31, L32, L33, L34, L41, L42, L43 y lader (L). Al relacionar los serotipos G y P de una misma muestra, se obtiene el serotipo definitivo para cada una, siendo para las muestras L22, L32, L33, L34, L42 y L43 el serotipo G9-P8, resultado de la combinación de la banda de 110 bp, de la sección correspondiente al serotipo G y la banda de 330 bp de la sección correspondiente al serotipo P. De igual forma se pudo obtener los serotipos G9 para la muestra L23, G9-P8/P6 para L41; no existe serotipo definido para L21.

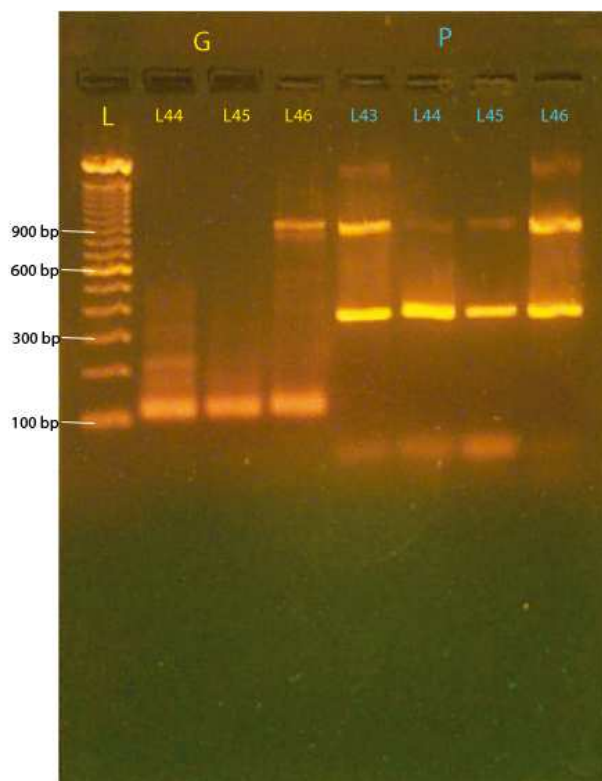


Figura 10: Electroforesis de la segunda amplificación de las muestras de los lotes 2,3 y 4, donde aparecen las bandas que proporcionan la clasificación G y P de las muestras L44, L45; L46 y lader (L). Al combinar los serotipos G y P de una misma muestra, se obtiene el serotipo definitivo para cada una. El serotipo G9-P8, resultado de la combinación de la banda de 110 bp, de la sección correspondiente al serotipo G y la banda de 330 bp de la sección correspondiente al serotipo P es común para todas las muestras de esta figura.

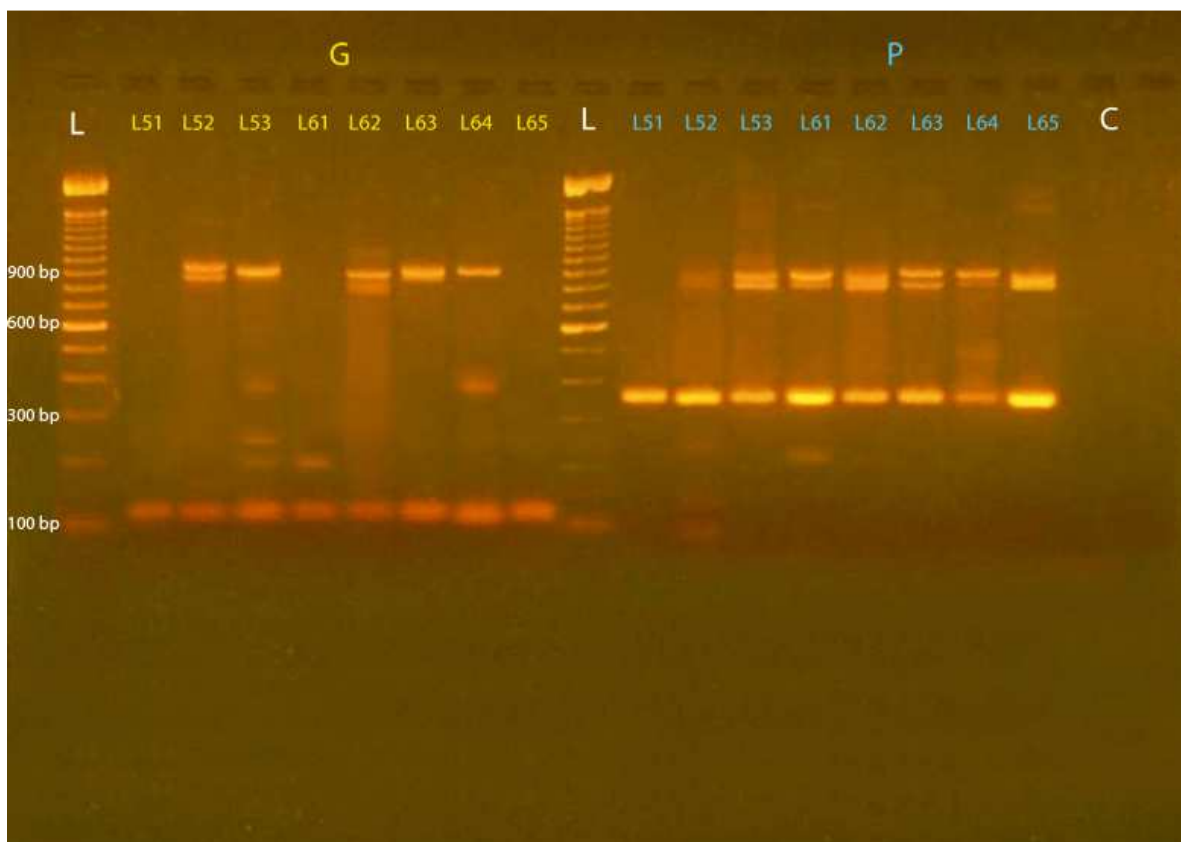


Figura 11: Electroforesis de la segunda amplificación de las muestras de los lotes 5 y 6. Aparecen las bandas que proporcionan la clasificación G y P de las muestras L51, L52, L53, L61, L62, L63, L64, L65, ladder (L) y control (C). Al relacionar los serotipos G y P de una misma muestra, se obtiene el serotipo definitivo para cada una. El serotipo G9-P8, resultado de la combinación de la banda de 110 bp, de la sección correspondiente al serotipo G y la banda de 330 bp de la sección correspondiente al serotipo P es común para todas las muestras.

12. TABLAS

Lote	# de Muestras	Códigos
1	8	L11, L12,L13,L14,L15,L16,L17,L18
2	3	L21,L22,L23
3	4	L31,L32,L33,L34
4	6	L41,L42,L43,L44,L45,L46
5	3	L51,L52,L53
6	5	L61,L62,L63,L64,L65

Tabla 1: Distribución de las muestras en lotes

Segmento	Pares/Base	G+C (%)	Sec. No codificantes		ORF	Aminoácidos
			5'	3'		
1	3.302	34.6	18	17	No	1.088
2	2.690	32.9	16	28	No	881
3	2.591	28.9	49	35	No	835
4	2.362	34.7	9	22	No	776
5	1.581	33.9	32	73	No	491
6	1.356	38.6	23	139	No	397
7	1.1104	33.5	25	131	Si (2-i)	315
8	1.059	35.5	46	59	No	317
9	1.062	35.9	48	33	Si (1-i)	326
10	751	40.2	41	182	Si (2-i)	175
11	667	38.6	21	49	Si (1-o)	198

Tabla 2: Nucleótidos de los genes de los 11 segmentos del rotavirus (Kapikian, et al. 1996)

Segmento del genoma	Tamaño (kD= kilodalton)	Producto Proteico	Localización	Función
1	125 kD	VP1	Capa interna	ARN polimerasa
2	94 kD	VP2	Capa interna	Ligada ARN
3	88 kD	VP3	Capa interna	Guanidiltransferasa
4	88 kD	VP4 (VP5+VP8)	Capa Externa	neutralización del antígeno, hemaglutinina, infectividad por medio de proteasa, virulencia, anclaje celular
5	-	NSP1 (No estructural	Levemente básica, posee dedo de zinc, ligada a ARN
6	-	VP6	Capa interna	Hidrofóbica, trimérica, subgrupo de antígeno
7	-	NSP3	No estructural	Ligeramente acidita ligada a ARN
8	-	NSP2	No estructural	Básica, ligada a ARN
9	-	VP7	Cápside externa	Glucoproteína de membrana de neutralización de antígeno integrada a la membrana de RER, dos terminales de NH ₂ hidrofóbicos
10	29 kD – 28 kD	NSP4	No estructural	Glucoproteína de transmembrana de RER, rol en morfogénesis, tres dominios NH ₂ hidrofóbicos
11	26 kD	NSP5	No estructural	Ligeramente básica, rica en serina y treonina ligada a ARN

Tabla 3: Proteínas de Rotavirus, provenientes de los 11 segmentos de ARN del virus. Los autores Mason, Liu y Maftion, propusieron designaron la nomenclatura para las proteínas VP (virion polypeptides). Los productos proteicos NS (nonstructural proteins) fueron renombrados para facilitar las comparaciones entre las diferentes cepas. El peso molecular fue calculado de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos de la cepa SA11 (Estes, et al. 1996)

Amplificación	Nombre del Primer	Secuencia (5' - 3')	Serotipo	Posición	Polaridad	Producto PCR (bp)
<u>Primers Consenso de la 1era amplificación</u>	9con1	tag ctc ctt tta atg tat gg	Wa/G1	37-56	pos	-
	9con2	gta taa aat act tgc cac ca	Wa/G1	922-941	neg	-
<u>Primers Consenso de la 2 da amplificación (9con1 incluido)</u>	9T-1	tct tgt caa agc aaa taa tg	Wa/G1	176-195	neg	158
	9T-2	gtt aga aat gat tct cca ct	S2/G2	262-281	neg	244
	9T-3P	gtc cag ttg cag tgt agc	107e1B/ G3	484-501	neg	464
	9T-4	ggg tcg atg gaa aat tct	ST3/G4	423-440	neg	403
	9T-9B	tat aaa gtc cat tgc ac	116E/G9	131-147	neg	110

Tabla 4: Conjunto de primers para la tipificación de G y P usados en el presente estudio.

Amplificación	Nombre del Primer	Secuencia (5' - 3')	Serotipo	Posición	Polaridad	Producto PCR (bp)
<u>Primers Consenso de la 1era amplificación</u>	con3	tgg ctt cgc tca ttt ata gac a	KU/P[8]	11-32	pos	-
	con2	att tcg gac cat tta taa cc	KU/P[8]	868-887	neg	-
<u>Primers Consenso de la 2 da amplificación (con3 incluido)</u>	1T-1	tct act tgg ata acg tgc	KU/P[8]	339-356	neg	328-324
	2T-1	cta ttg tta gag gtt aga gtc	RV-5/P[4]	474-494	neg	463-462
	3T-1	tgt tga tta gtt gga ttc aa	1076/P[6]	259-278	neg	248-246
	4T-1	tga gac atg caa ttg gac	K8/P[9]	385-402	neg	374-370
	5T-1	atc ata gtt agt cgg	69M/P[10]	575-594	neg	564-562
	ND2	agc gaa ctc acc aat ctc	116E/P[11]	116-133	neg	105-101

Tabla 5: Conjunto de primers usados en este estudio para la tipificación de P

No. Bandas	Resultado
2	Positivo
1 (control)	Negativo

Tabla 6: Parámetro para diagnóstico de rotavirus del kit *Stick Rotavirus* de Invitrogen

	Temperatura	Tiempo
1	97a.C.	5'
2	4a.C.	∞

Tabla 7: Programa de denaturación de ARN usados en este estudio.

	Temperatura	Tiempo	# de ciclos
1	42°C	45'	Retrotranscripción
2	96°C	2'	
3	94°C	30'	30 ciclos
4	50°C	30'	
5	72°C	1'	
6	4°C	∞	

Tabla 8: Programa para Retrotranscripción y Primera Amplificación

	Temperatura	Tiempo	# de ciclos
1	94°C	30''	30 ciclos
2	42°C	30''	
3	72°C	1'	
4	72°C	7'	
5	4°C	∞	

Tabla 9: Programa para segunda amplificación.

Periodo	Muestras analizadas	Muestras negativas	Muestras positivas
2006-02-04 a 2006-02-28	74	45	29

Tabla 10: Muestras de heces de infantes analizadas

Muestras Procesadas	Muestras Positivas	Amplificadas	No Amplificadas
74	29	28	1

Tabla 11: Resultados del procesamiento de las muestras obtenidas en el hospital Baca Ortiz

Muestra	Peso molecular G (aprox.)	Peso molecular P (aprox.)	Serotipo
L11	110	330	G9 - P8
L12	244	330 / 460	G2 - P8/P4
L13	110	330	G9 - P8
L14	110 / 244	330 / 460	G9/G2 - P4/P8
L15	110 / 244	330 / 460	G9/G2 - P4/P8
L16	110	330	G9 - P8
L17	110	330	G9 - P8
L18	110 / 244	330	G9/G2 - P8

Tabla 12: Serotipos correspondientes a las muestras detalladas en la Figura 8. El serotipo es el resultado de la relación del segundo producto de la amplificación de G y P cuyos pesos moleculares determinan el tipo de G y P a combinarse.

Muestra	Peso molecular G (aprox.)	Peso molecular P (aprox.)	Serotipo
L21	n.a.	n.a.	---
L22	110	330	G9 - P8
L23	110	n.a.	G9
L31	160	300	G1 - P6
L32	110	330	G9 - P8
L33	110	330	G9 - P8
L34	110	330	G9 - P8
L41	110	330 / 300	G9 - P8/P6
L42	110	330	G9 - P8
L43	110	330	G9 - P8
L44	110	330	G9 - P8
L45	110	330	G9 - P8
L46	110	330	G9 - P8

Tabla 13: Serotipos correspondientes a las muestras detalladas en la Figura 9 y 10. El serotipo es el resultado de la relación del segundo producto de la amplificación de G y P cuyos pesos moleculares determinan el tipo de G y P a combinarse.

Muestra	Peso molecular G (aprox.)	Peso molecular P (aprox.)	Serotipo
L51	110	330	G9 – P8
L52	110	330	G9 – P8
L53	110	330	G9 – P8
L61	110	330	G9 – P8
L62	110	330	G9 – P8
L63	110	330	G9 – P8
L64	110	330	G9 – P8
L65	110	330	G9 – P8

Tabla 14: Serotipos correspondientes a las muestras detalladas en la Figura 11. El serotipo es el resultado de la relación del segundo producto de la amplificación de G y P cuyos pesos moleculares determinan el tipo de G y P a combinarse.

Combinación G-P	Aislados detectados	
	Numero	%
G9 – P8	21	72,4
G9/G2 – P8	1	3,6
G2 – P8/P4	1	3,6
G9/G2 – P8/P4	2	7,2
G9	1	3,6
G1 – P6	1	3,6
G9 – P8/P6	1	3,6
No determinada	1	3,6

Tabla 15: Combinaciones genotípicas de G y P detectadas en 29 muestras procesadas provenientes de un hospital de niños de la ciudad de Quito durante noviembre 2005 y febrero 2006

Serotipos	%
G9	79.3
G2	13.8
G1	3.44
<i>Total G</i>	<i>96.5</i>
P4/P8	10.3
P6/P8	3.4
P6	3.4
P8	75.8
<i>Total P</i>	<i>93.1</i>

Tabla 16: Combinaciones genotípicas de G y P detectadas en 29 muestras procesadas provenientes de un hospital de niños de la ciudad de Quito durante noviembre 2005 y febrero