

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VIRUS CAUSANTES DE  
GASTROENTERITIS EN NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS DE  
DIFERENTES MUNICIPIOS DEL SUR DE SONORA.**

**POR**

**QBC. GUADALUPE DE JESÚS QUINTERO OCHOA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**MAYO, 2017**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VIRUS CAUSANTES DE  
GASTROENTERITIS EN NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS DE  
DIFERENTES MUNICIPIOS DEL SUR DE SONORA.**

COMITÉ DE TESIS

---

Dra. Patricia Tamez Guerra

PRESIDENTE

---

Dr. Ricardo A. Gómez Flores

SECRETARIO

---

Dra. Laura Trejo Ávila

Primer VOCAL

---

Dr. José Alberto Valadez Lira

Segundo VOCAL

---

Dra. María Julissa Ek Ramos

Tercer VOCAL

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VIRUS CAUSANTES DE  
GASTROENTERITIS EN NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS DE  
DIFERENTES MUNICIPIOS DEL SUR DE SONORA.**

DIRECCIÓN DE TESIS

---

Dra. Patricia Tamez Guerra

DIRECTORA

---

Dra. Guadalupe González Ochoa

CO-DIRECTORA

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo de investigación se realizó en la Unidad de Formulación de Biológicos del Laboratorio de Inmunología y virología, FCB-UANL, así como en el Laboratorio de Biología Molecular y Fisiología y el Laboratorio de Microbiología e Inmunología, Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur, bajo la dirección de la Dra. Patricia Tamez Guerra y la co-dirección de la Dra. Guadalupe González Ochoa.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme cumplir con una meta profesional más y por todas las bendiciones que me ha dado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como a la Subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme formar parte de su programa académico.

A la Dra. Patricia Tamez y Dra. Guadalupe González, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por la confianza depositada en mí y por la motivación brindada a lo largo de estos dos años.

A los integrantes de mi comité de tesis por su apoyo y colaboración para la culminación de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

Al Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez y al Dr. José Guadalupe Soñanez Organis por el espacio brindado y el apoyo recibido para la elaboración del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio de la UANL Oziel, Alonso, Karina, Víctor, Noé, Nora, Queta, Vero, señora Rosy y Adán gracias por su apoyo.

A mis compañeros de laboratorio en la UNISON: Armando Avilés, Ricardo Romero, Michel Cejudo, gracias chamaquitos por su apoyo y las largas jornadas de trabajo compartidas, por los momentos de diversión y sus múltiples ocurrencias que me hicieron reír.

A mis amigos de antaño: Patricia Calleja, Polet Camacho, Berenice Torrecillas, Pedro Mendoza, Rodolfo Silva, por su apoyo incondicional durante todo este tiempo, por aguantarme (tarea nada fácil) y por siempre hacerme sonreír, muchas gracias. Gracias por siempre estar ahí para mí y por tantos años de amistad, que, a pesar de no vernos seguido, la comunicación continúa. Los quiero chicos.

Al QBC. Servando Cantú, que, a pesar de las diferencias, siempre me apoyo y estuvo ahí para mí cuando más lo necesite.

A los nuevos amigos que hice durante mi paso por la UANL de los cuales me llevo gratos recuerdos y nuevos aprendizajes, Dianelys Sotolongo, Mayra Meléndez, Carolina Gil, Alejandra Cantú, Mariana Cuesy, Rosana Gamiño, Hugo Sánchez, muchísimas gracias por su apoyo y muestras de cariño, por sus palabras de aliento en esos momentos en los que sentía que no podía más y por hacerme sonreír aún en contra de mi voluntad.

Agradezco a todas y cada una de las personas que se han cruzado en mi vida, porque cada una de ellas me aportó una nueva experiencia, un nuevo conocimiento, una nueva perspectiva y me han enriquecido como persona. Un agradecimiento especial a la señora Marisela Madrigal de Sepúlveda por mostrarme que no existe ninguna adversidad que no se pueda vencer, por ser un ejemplo de vida.

## DEDICATORIAS

A mis padres: **Sr. J. Trinidad Quintero Partida** y **Sra. Ana Alicia Ochoa Félix**. Ustedes personas humildes, trabajadoras, de bases sólidas y principios inquebrantables, mis maestros de vida, mis mejores amigos, las personas a quienes más admiro, son lo máximo mis viejos, los AMO muchísimo, esto es por ustedes y para ustedes, no me alcanzara la vida para agradecer todo lo que han hecho por mí, gracias por su infinito apoyo y por siempre alentarme a perseguir mis sueños.

A mi hermana **Natalia Carolina** y a mi sobrina **Camila Guadalupe**, las amo mucho, gracias por su apoyo, por ser los copilotos de vida más divertidas que puedo tener, gracias a las dos por sus ocurrencias, el montón de carcajadas compartidas y acompañarme durante esta experiencia.

A mi prima **Erika Cecilia**, gracias por siempre estar ahí para mí, por apoyarme, por escucharme, por ser mi amiga, confidente, cómplice, gracias por todo Kika, te quiero mucho.

A **Víctor Manuel**, gracias por tú cariño, paciencia y apoyo a lo largo de estos años, por hacerme sonreír aun cuando quería golpearte, por estar ahí cuando más te he necesitado. Te quiero.

A mi **FAMILIA**, a todos ustedes les agradezco el apoyo, motivación, consejos, las pláticas en el patio o en la sala mientras tomábamos café, que muchas veces sirvieron de distracción después de una larga jornada de trabajo, gracias por ser parte de este sueño, aunque algunos aún no entienden lo que hago.

## TABLA DE CONTENIDO

LUGAR DE TRABAJO.....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
DEDICATORIAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
2.1 Rotavirus .....	2
2.1.1. Patogénesis .....	4
2.2 Norovirus .....	7
2.2.1 Patogénesis .....	8
2.3 Sapovirus.....	10
2.3.2 Patogénesis .....	13
2.4 Astrovirus.....	13
2.4.1. Patogénesis .....	15
2.5 Adenovirus .....	16
2.5.1. Patogénesis .....	19
3. JUSTIFICACIÓN .....	22
4. HIPÓTESIS .....	23
5. OBJETIVO GENERAL.....	24
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	25
6.1 Lugar de estudio .....	25
6.2 Muestreo .....	25
6.3 Pruebas rápidas.....	25
6.4 Extracción de ácidos nucleicos .....	26
6.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	27
6.6.1 Amplificación del gen de la cápside de Norovirus.....	27

6.6.3 Amplificación de la región conservada ORF1b de Astrovirus .....	29
6.6.5 Amplificación del gen hexón de Adenovirus .....	30
6.7 Purificación del producto de PCR .....	32
6.8 Secuenciación.....	32
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
7.1 Detección de rotavirus y adenovirus entéricos mediante pruebas rápidas.....	34
7.2 Detección del genoma de rotavirus por PAGE. ....	34
7.3 Amplificación de los genes VP7 y VP4 de rotavirus .....	35
7.4 Amplificación del gen de la cápside de Norovirus.....	40
7.5 Amplificación del gen de la cápside de Sapovirus.....	44
7.6 Amplificación del gen hexón de Adenovirus.....	48
7.7 Amplificación de la región conservada ORF1b de Astrovirus .....	51
8. CONCLUSIÓN .....	55
9. PERSPECTIVAS.....	56
10. LITERATURA CITADA.....	57
RESUMEN BIOGRÁFICO .....	71
ANEXOS.....	72



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estructura de rotavirus	6
<b>Figura 2</b>	Genoma de norovirus humano	11
<b>Figura 3</b>	Estructura de la partícula viral y estructura del genoma de sapovirus	11
<b>Figura 4</b>	Organización del genoma de astrovirus humano	17
<b>Figura 5</b>	Estructura y componentes de adenovirus	21
<b>Figura 6</b>	Pruebas rápidas de detección de rotavirus	34
<b>Figura 7</b>	Corrimiento electroforético de las muestras positivas de rotavirus que muestran el genoma segmentado característico del grupo A.	35
<b>Figura 8</b>	Amplificación del gen que codifica para el gen completo de VP7	36
<b>Figura 9</b>	Amplificación del gen que codifica para VP4	36
<b>Figura 10</b>	Análisis filogenético del gen VP7 genotipo G12	38
<b>Figura 11</b>	Análisis filogenético del gen VP4 genotipo P [8]	39
<b>Figura 12</b>	a) Amplificación del segmento de 380 pb correspondiente al genogrupo GI de norovirus. b) Amplificación del segmento de 340 pb correspondiente al genogrupo GII de norovirus.	40
<b>Figura 13</b>	Análisis filogenético del genogrupo GI.8 de norovirus	42
<b>Figura 14</b>	Análisis filogenético del genogrupo GII.4 de norovirus.	43
<b>Figura 15</b>	Amplificación del gen de la cápside de sapovirus	44
<b>Figura 16</b>	Análisis filogenético del genogrupo GI. I de sapovirus.	46
<b>Figura 17</b>	Análisis filogenético del genogrupo GII.I de sapovirus.	47
<b>Figura 18</b>	Amplificación del gen hexón de Adenovirus	48
<b>Figura 19</b>	Análisis filogenético del Sub-género C tipo 6 de adenovirus	50
<b>Figura 20</b>	Amplificación del gen de la polimerasa (ORF1b) de astrovirus.	52
<b>Figura 21</b>	Análisis filogenético de astrovirus clásico serotipo 6	52
<b>Figura 22</b>	Análisis filogenético de astrovirus clásico serotipo 2 (ORF2).	53
<b>Figura 23</b>	Análisis molecular filogenético de astrovirus clásico serotipo 2 (ORF1b)	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Infecciones asociadas con sub-géneros y serotipos de adenovirus	20
<b>Tabla 2</b>	Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la amplificación del gen de la cápside de norovirus.	28
<b>Tabla 3</b>	Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la amplificación del gen de la cápside de sapovirus.	29
<b>Tabla 4</b>	Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la amplificación de ORF1b de astrovirus.	30
<b>Tabla 5</b>	Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la amplificación del gen de VP7 y VP4 de rotavirus.	31
<b>Tabla 6</b>	Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la detección de adenovirus.	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ssRNA</b>	Ácido Ribonucleico cadena sencilla
<b>cDNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico complementario
<b>VP</b>	Proteína viral
<b>NSP</b>	Proteína no estructural
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion Calcio
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>VPg</b>	Proteína viral unida al genoma
<b>sgRNA</b>	Ácido Ribonucleico subgenómico
<b>UTR</b>	Regiones no traducibles
<b>HAdV</b>	Adenovirus humano
<b>min</b>	Minuto
<b>seg</b>	Segundo
<b>µl</b>	Micro litro
<b>mg</b>	Miligramo
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>M</b>	Concentración Molar
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Magnesio
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>µM</b>	Micromolar
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>Pmol</b>	Picomolar
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>Mpb</b>	Marcador de bases en peso molecular
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida

## RESUMEN

La gastroenteritis viral afecta principalmente a niños menores de cinco años y se considera la segunda causa de muerte a nivel mundial. En el presente trabajo se detectaron y caracterizaron virus causantes de gastroenteritis en niños. El área de estudio incluyó la población infantil del Hospital General de Navojoa y del Hospital del Niño y la Mujer de Cd. Obregón, Sonora. Se analizaron 179 muestras de heces de niños por RT-PCR y análisis de secuencia, encontrándose 18 (10%) positivas para rotavirus, 8 (4.4%) para norovirus, 6 (3.3%) para astrovirus, 6 (3.3%) para sapovirus y 2 (1%) para adenovirus entéricos. De las 18 cepas positivas para rotavirus, la secuencia de los genes VP4 y VP7 indicó la presencia de 4 (22%) genotipo G12P[8], 3 (16.6%) genotipo G12P [no tipificado] y 2 (11%) genotipo GP[8] no-tipificado. De las 8 para norovirus, (25%) eran genotipo G1 y 6 (75%) G2, detectándose 2 (33%) genotipo GII.4 (variante Sydney 2012) y 1 (50%) genotipo GI.8. De las 6 cepas de astrovirus, 2 (33%) se caracterizaron como HAstV-2 y 1 (16%) como HAstV-6. De las 6 de sapovirus, 1 (16.6%) era genotipo GI. I, y otra (16.6%) GII.I. De las 2 cepas de adenovirus, una (50%) correspondió al subgénero C tipo 6. Este es el primer reporte en México de cepas emergentes: G12 de rotavirus, HAstV-6 de astrovirus, GII.1 de sapovirus y GI.8 de norovirus, por lo que se recomienda continuar con el monitoreo epidemiológico y molecular de enterovirus en niños.

## ABSTRACT

Viral gastroenteritis mainly affects children under five years old and is considered the second leading cause of death worldwide. This study area included the child population attended at the General Hospital of Navojoa and at the Hospital del Niño y la Mujer of Cd. Obregón, Sonora. A total of 179 stool samples were analyzed for virus detection and characterization by RT-PCR and sequence analysis. Results showed that 18 (10%) were positive for rotavirus, 8 (4.4%) for norovirus, 6 (3.3%) for astrovirus, 6 (3.3%) for sapovirus and 2 (1%) for enteric adenoviruses. Out of the 18 positive to rotavirus, VP4 and VP7 sequence analysis revealed that 4 (22%) were genotype G12P [8], 3 (16.6%) genotype G12P [non-typed] and 2 (11%) genotype GP[8] non typed. Out of the 8 positive to norovirus, 2 (25%) were genotype G1 and 6 (75%) G2, where sequence analysis revealed the presence of 2 (33%) genotype GII.4 (variant Sydney 2012) and 1 (50%) GI.8. Out of the 6 astrovirus analyzed samples, 2 (33%) were characterized as HAstV-2 and 1 (16%) as HAstV-6. The 6 sapovirus analyzed samples revealed 1 (16.6%) as genotype GI. I, and 1 (16.6%) as genotype GII.I. Sequence analysis of adenovirus revealed that one (50%) sample was subtype C6. This is the first report of emergent G12 rotavirus strains as well as astrovirus (HAstV- 6), sapovirus (GII.1) and norovirus (GI.8) in Mexico. Epidemiological and molecular monitoring of enteroviruses causing gastroenteritis in children is recommended.

## 1. INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis se define como una inflamación del revestimiento gástrico e intestinal, que puede ser ocasionada por agentes infecciosos o sus toxinas, generando pérdida de consistencia en las heces y un aumento en el número de deposiciones (Peña y Conejo, 2010; Riechmann *et al.*, 2014). Entre los síntomas que comúnmente se presentan están diarrea, vómito y fiebre (Hostetler, 2004). Las enfermedades gastrointestinales son un problema mundial, primordialmente en países en vías de desarrollo, en donde los índices de mortalidad son elevados. En Asia, África y Latinoamérica, se estima que aproximadamente el 50% de niños menores de cinco años fallece a causa de la gastroenteritis aguda. En la mayoría de los casos, los factores socioeconómicos y nutricionales influyen mucho en la mortandad infantil por gastroenteritis (Martínez, 2008).

En México, la salud pública se ve afectada por las enfermedades gastrointestinales, las cuales representan una de las principales causas de consulta médica, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), brindó 2 millones 188 consultas por enfermedades gastrointestinales, solo en 2008, y en 2003, un estudio gubernamental reportó 4,556 decesos causados por infecciones intestinales (Hernández, 2011).

La gastroenteritis puede ser causada por agentes infecciosos como virus, bacterias y parásitos. De éstos, los virus se asocian con el 70% de los casos de diarrea y la población infantil es la más susceptible (Elliot, 2007; WHO, 2008). Se han identificado cerca de 20 diferentes tipos de virus como agentes etiológicos causantes de gastroenteritis aguda, pero los principales virus que infectan a niños se dividen en cuatro familias diferentes: *Reoviridae* (rotavirus), *Caliciviridae* (norovirus y sapovirus), *Astroviridae* (astrovirus) y *Adenoviridae* (adenovirus entéricos) (Raboni *et al.*, 2014). Debido a que los virus son capaces de presentar mutaciones y re-arreglos genéticos, que permiten su evolución y generación de cepas emergentes, es importante el monitoreo y caracterización de los virus causantes de gastroenteritis aguda.

## 2. ANTECEDENTES

La población infantil es más susceptible a presentar gastroenteritis aguda, la principal complicación es la deshidratación severa que trae como consecuencia la muerte del menor si éste no es atendido de forma adecuada y oportuna (WHO, 2008). Entre los agentes infecciosos causantes de gastroenteritis están Rotavirus, Norovirus, Saporovirus, Adenovirus entéricos y Astrovirus, de los cuales los Rotavirus y Norovirus se relacionan con 215,000 y 218,000 muertes de niños a nivel mundial, respectivamente (Koo *et al.*, 2010; Tate *et al.*, 2016). Por su parte, Adenovirus entéricos, Saporovirus y Astrovirus se relacionan a casos de gastroenteritis de severa a leve en niños menores de dos o cinco años de edad (Finkbeiner *et al.*, 2010; Sdiri-Loulizi *et al.*, 2011; Rezaei *et al.*, 2012).

### 2.1 Rotavirus

A nivel mundial, rotavirus es la principal causa de diarrea aguda en niños menores de cinco años. Su transmisión principalmente ocurre por la vía fecal-oral; probablemente el virus también se transmite por alimentos y agua contaminada, rotavirus es altamente contagioso, por lo que se requiere <100 partículas virales, un periodo de incubación que va de 24 a 48 horas para que la infección se manifieste, la cual puede presentar sintomatología muy severa o ser asintomática; la gastroenteritis por rotavirus se caracteriza por la presencia de diarrea acuosa, la cual puede ir acompañada por vómito, dolor abdominal y fiebre. La pérdida de líquidos y electrolitos a causa de la diarrea puede derivar en una deshidratación, que puede ocasionar la hospitalización o la muerte del menor si no es rehidratado a tiempo. Durante el invierno es cuando se presenta la mayor incidencia de brotes de gastroenteritis por rotavirus (Glass *et al.*, 2006; Diggle, 2007; Bernstein, 2009; Desselberger *et al.*, 2009; Desselberger, 2014).

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*, son virus no envueltos, con forma icosaédrica, los cuales se dividen en 8 grupos (de A-H), donde los grupos A-C afectan a humanos y animales; el grupo A el más representativo debido a su importancia médica (Diggle, 2007; Mukherjee y Chawla-Sarkar, 2011; Alam *et al.*, 2013; Kindler *et al.*,

2013; Desselberger, 2014). La partícula viral de rotavirus se caracteriza por presentar tres capas proteicas concéntricas que envuelven el genoma segmentado de RNA de doble cadena, el genoma de rotavirus es de 18,522 pares de bases, el cual codifica para 6 proteínas estructurales (Fig. 1a), denominadas con el sufijo “VP” (*viral protein*, por sus siglas en inglés) y van de VP1-VP7, además de 6 proteínas no estructurales denominadas con el sufijo “NSP” (del inglés *non-structural protein*) y van de NSP1-NSP6 (Estes y Cohen, 1989). A excepción del gen 11 que tiene dos marcos de lectura y codifica para dos de las proteínas no estructurales (NSP5 y NSP6), el resto del genoma codifica solo para un gen (López y Arias, 2001).

Las proteínas VP1 (RdRp), VP2 y VP3 (*capping enzyme*) se encuentran en el núcleo y están involucradas en la replicación viral; en la cápside intermedia se encuentra VP6 (Fig. 1b), la cual presenta características antigénicas que permiten clasificar a rotavirus en grupos (Matthijnssens *et al.*, 2011; Hoshino y Kapikian, 2000; Desselberger, 2014). En la cápside externa se encuentran las proteínas VP4, sensible a proteasa (P) y VP7, una glicoproteína (G); ambas son muy importantes para el ingreso del virus a las células. A su vez, se les asocia con la estimulación de una respuesta inmune específica contra rotavirus (Estes, 2001).

En conjunto, las proteínas VP4 y VP7 han sido utilizadas como la base para la clasificación de rotavirus por serotipos y genotipos (G y P). A la fecha, rotavirus se ha clasificado en por lo menos 27 genotipos G y 37 genotipos P (Matthijnssens *et al.*, 2011; Desselberger, 2014; Ide *et al.*, 2015; Yarkın *et al.*, 2016). Entre los genotipos comúnmente reportados a nivel mundial están los G1P[8], G4P[8], G2P[4], G3P[8] y recientemente G9; éstas combinaciones son responsables del 90% de las infecciones por rotavirus (Arista *et al.*, 1997; Ramachandran *et al.*, 1998; Argüelles *et al.*, 2000; O’Halloran *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2005, Iturriza-Gómara *et al.*, 2000). Las cepas circulantes G1, G3, G2, G4 y G9 son las que se aíslan con mayor frecuencia en México (Esparza-Aguilar *et al.*, 2009).

Variaciones en las proteínas VP4 y VP7 derivadas de mutaciones puntuales o rearrreglos en el genoma pueden traer como consecuencia variaciones en las cepas circulantes de rotavirus en una misma región entre un brote epidémico y otro. En un estudio realizado



en América Latina se observó un cambio de cepas predominantes de G1P[8] a G9P[8], así como un incremento en G2P[4] entre un periodo de estudio y otro (Linhares *et al.*, 2008). Sin embargo, en la última década a nivel mundial han emergido cepas inusuales, como G12, la cual es un motivo de preocupación, ya que se ha convertido en el sexto genotipo más frecuente. A este respecto, hasta el momento se han reportado 4 cepas de G12 que han emergido en varios lugares del mundo, a saber: G12P[6], G12P[8], G12P[9] y G12P[4], las dos últimas con menor frecuencia (Mijatovic-Rustempasic *et al.*, 2014; Ide *et al.*, 2015).

En México a partir del año 2006 se adicionó al programa de vacunación la vacuna contra rotavirus. Existen dos tipos de vacunas, la vacuna Rotarix está basada en una cepa de rotavirus atenuada del genotipo G1P[8], se aplica vía oral y en dos dosis, a los dos y cuatro meses de edad y la vacuna RotaTeq, que es una vacuna pentavalente, recombinante, humana-bovina, esta vacuna se aplica en tres dosis por vía oral, dos, cuatro y seis meses de edad (World Health Organization, 2007; Dennehy, 2008). Estudios recientes han probado que son seguras, eficientes e infieren protección contra distintos genotipos (no G1) a excepción de genotipos G2P[4] (Dennehy, 2008; Snelling *et al.*, 2011). No obstante, parece disminuir la severidad de la gastroenteritis independientemente del genotipo, esto se refleja en la disminución del número de menores hospitalizados debido a la gastroenteritis por rotavirus (Ruíz-Palacios *et al.*, 2006).

### **2.1.1. Patogénesis**

La patogénesis de rotavirus es multifactorial, y la edad del huésped es uno de los principales factores para que suceda la infección, los niños de entre 3 meses y 2 años resultan ser los más susceptibles. Los adultos también son susceptibles a la infección por rotavirus, pero es inusual que se genere un cuadro clínico severo (Greenberg y Estes, 2009; Desselberger, 2014).

La infección por rotavirus puede ser a nivel intestinal o sistémico. La diarrea generada por rotavirus es la manifestación clínica más evidente de la infección y se atribuye a

distintos mecanismos entre los que incluyen, malabsorción seguida de la destrucción del epitelio, la acción de la enterotoxina, NSP4, codificada por el virus, estimulación del sistema nervioso entérico (ENS) y la isquemia de las vellosidades (Ramig, 2004; Greenberg y Estes, 2009). El proceso que conduce a la diarrea se inicia cuando rotavirus infecta los enterocitos maduros que se encuentran en la parte superior de las vellosidades del intestino delgado, disminuyendo la absorción de los disacáridos, sodio (Na<sup>+</sup>) y agua (Estes *et al.*, 2001; Ramig, 2004; Ramig, 2007).

La primer enterotoxina codificada por un virus, fue la proteína NSP4, la cual resulto de gran interés por sus propiedades pleiotrópicas, además de su papel en la replicación viral y morfogénesis; estudios sobre los efectos de esta enterotoxina utilizando cultivo celular y modelos animales, han indicado que la diarrea inducida por rotavirus es producto de un aumento de Ca<sup>2+</sup>, que genera la secreción trans-epitelial de cloro, ocasionando un desequilibrio en la homeostasis celular generando la salida de agua (Ramig, 2007; Greenberg y Estes, 2009; Desselberger *et al.*, 2009).

Estudios sugieren que la infección por rotavirus no se limita solo al área intestinal, sino que puede diseminarse a otros órganos, como se encontró en varios casos clínicos de niños inmunocomprometidos, donde el virus fue encontrado en hígado, sistema biliar, páncreas, riñones, aunque las consecuencias clínicas por la infección sistémica son poco claras (Ramig, 2004; Ramig, 2007; Greenberg y Estes, 2009; Desselberger *et al.*, 2009).

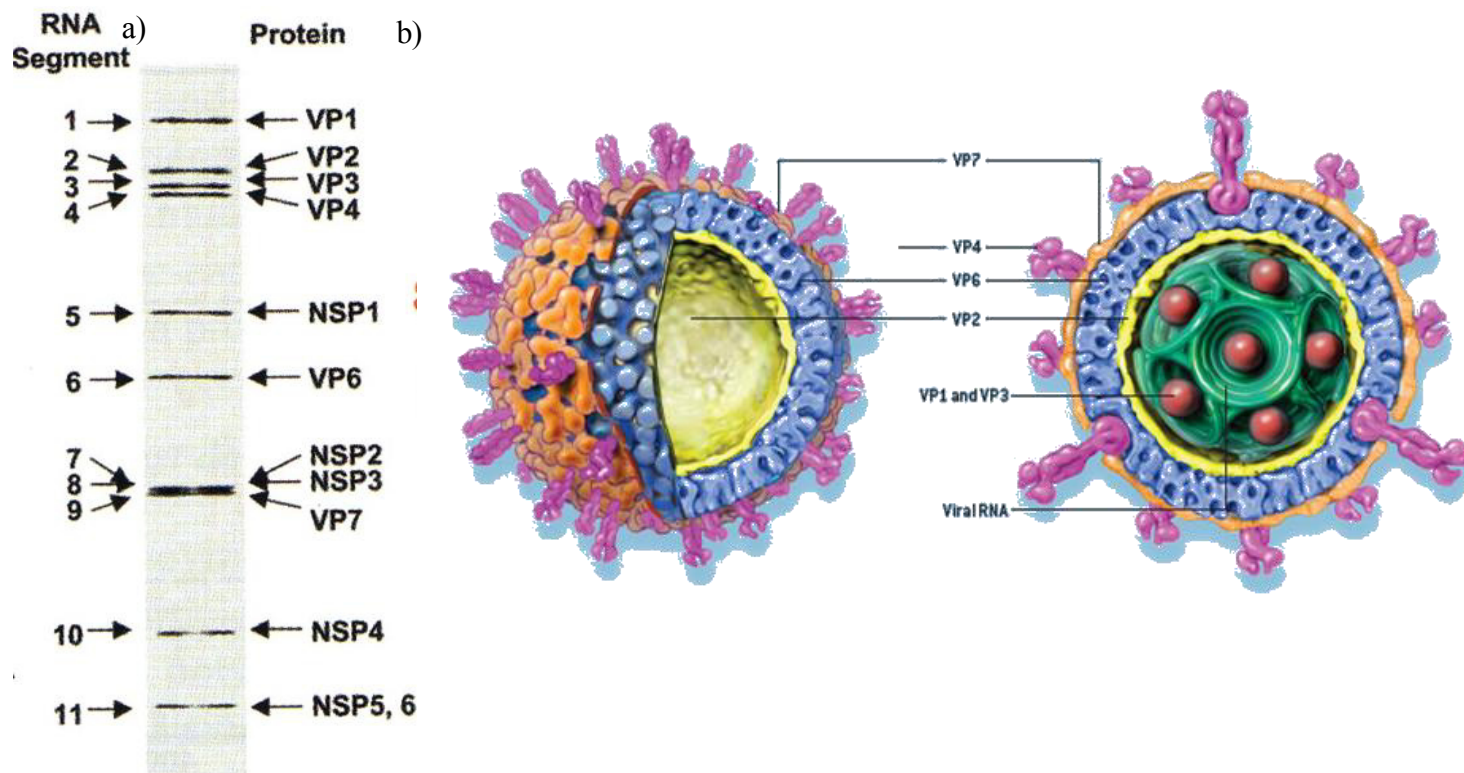


Figura 1. (a) Gel de poliacrilamida en el que se muestran los 11 segmentos del genoma de rotavirus; en el lado izquierdo se observa la numeración del segmento que codifica para una proteína determinada (derecha). (b) Estructura de rotavirus, que muestra las capas que lo conforman y las proteínas que se encuentran en cada una de ellas (Tomado y modificado de, Jayaram *et al.*, 2004).

## 2.2 Norovirus

Después de rotavirus, norovirus es el agente etiológico más importante de brotes de gastroenteritis aguda no bacteriana que se transmite principalmente de persona a persona, por agua y alimentos contaminados (Costa-Amaral *et al.*, 2015). El rango de prevalencia de norovirus en niños menores de cinco años con gastroenteritis aguda oscila entre el 6-48% (Xue *et al.*, 2015). Para que la infección por norovirus se desarrolle, se necesita de una cantidad muy baja de partículas virales <10 viriones por individuo. El periodo de incubación va de 27 a 48 horas, y entre los síntomas que comúnmente se presentan están náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal y fiebre; la gastroenteritis por norovirus es una enfermedad auto-limitada que raramente es fatal. En algunos casos la infección puede ser asintomática, como se demuestra en un estudio realizado en 2006 por García, *et al.*, en la zona periurbana de la Ciudad de México, donde el 29.8% de las muestras analizadas pertenecientes a niños asintomáticos presentaban norovirus (Atmar y Estes, 2006; Green, 2013).

Norovirus pertenece a la familia *Caliciviridae*, los cuales son virus pequeños, no envueltos, amorfos con un diámetro de 38 nm, cuyo genoma es de RNA de cadena sencilla en sentido (ssRNA). El genoma de norovirus humano es lineal (Fig. 2), en su extremo 5' se encuentra una proteína viral unida al genoma (VPg), mientras que en el extremo 3' se encuentra poliadenilado, posee tres marcos abiertos de lectura, denominadas con el sufijo "ORF" (*Open Reading Frames*, por sus siglas en inglés): ORF1, ORF2 y ORF3, los cuales codifican para 8 proteínas virales. El ORF1 codifica para una poliproteína, la cual por acción de la proteasa viral da lugar a seis proteínas no estructurales, denominadas con el sufijo "NS" (*non structural*, por sus siglas en inglés), y van de la NS1-NS7, donde se incluyen: RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), NTPasa y VPg. La proteína principal de la cápside (VP1) es codificada por ORF2, mientras que ORF3 codifica para VP2 (Atmar *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015; Robilotti *et al.*, 2015; Kulkarni *et al.*, 2016). La proteína viral VP1 se divide en dos dominios, el dominio Shell (S) y el dominio sobresaliente (P), el cual se divide en dos sub-dominios (P1 y P2). El dominio P tiene la característica de auto-ensamblarse, dando lugar a una partícula inmunogénica de aproximadamente 20 nm. El sub-dominio P2, además de ser

la región más variable del genoma, puede presentar interacción con anticuerpos y ligandos de unión celular, los antígenos del grupo histo-sanguíneo (HBGAs, del inglés histo-blood group antigens), ya que es la parte más expuesta a la superficie de la cápside (Zheng *et al.*, 2006; Green, 2013; Tran *et al.*, 2013; Kulkarni *et al.*, 2016).

De acuerdo al análisis de secuencia del gen de la cápside VP1, norovirus se ha clasificado en seis genogrupos (GI-GVI) y aproximadamente 40 genotipos, siendo los grupos GI, GII y GIV los que pueden afectar al ser humano. Actualmente la clasificación de norovirus también se basa en las diferencias de la proteína RdRp (polimerasa o genotipo P). El genogrupo II es el predominante en humanos y se le ha clasificado en 23 genotipos, siendo el genogrupo GII genotipo 4 (GII.4) el de mayor circulación a nivel mundial y el causante de los brotes más severos de gastroenteritis por norovirus. Seguido de GII, están los genogrupos GI y GIV (Wang *et al.*, 2012; Kroneman *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2015; Parra y Green, 2015). Estudios realizados utilizando anticuerpos contra GIII, detectaron norovirus de origen bovino en aproximadamente un 22% de los seres humanos (Robilotti *et al.*, 2015).

Norovirus presenta una variabilidad genética y antigénica, la cual es producto de la recombinación entre genogrupos, principalmente GI, GII y GIII, esto ha dado como resultado combinaciones entre distintas cepas recombinantes, como es el caso de: GII.P7/GII.6, GII.P7/GII.20, GII.P2/GII.3, GI. P2/GI.6 y GII.P4/GII.1, en América Latina. La recombinación tiene lugar cerca de la superposición de ORF1 y ORF2. En México entre las principales cepas que se encuentran en circulación están GI.1, GI.3, GI.5, GI.7, GI.14, GII.1, GII.2, GII.4, GII.7 y GII.17. Debido a los cambios evolutivos y aumento de virulencia que se genera por las recombinaciones en las cepas circulantes, el diseño de una vacuna como medida preventiva se ha visto afectado (Bull *et al.*, 2007; Atmar *et al.*, 2011; da Silva Poló *et al.*, 2016).

### **2.2.1 Patogénesis**

Usualmente la gastroenteritis a causa de norovirus es aguda y auto-limitada, pero en infantes, así como en ancianos e inmunocomprometidos tiende a ser más severa y

prolongada (Karst, 2010). La habilidad de norovirus de causar brotes de gastroenteritis aguda, principalmente se debe a dos factores, la baja cantidad de partículas virales que se necesitan para infectar a un individuo y la extremada estabilidad que presenta al medio ambiente, así como la resistencia a la congelación, calentamiento a 60°C, y desinfectantes como el cloro, el alcohol, etc. (Donaldson *et al.*, 2008).

Debido a que norovirus humano no ha podido cultivarse *in vitro*, ni aislarse, la comprensión de la patogénesis de este virus se ha visto limitada (Straub *et al.*, 2007; Karst, 2010; Robilotti *et al.*, 2015). El descubrimiento de norovirus murino, en 2003, facilitó el estudio de la patogénesis de norovirus en un modelo animal, ya que fue posible observar el desarrollo de la infección en su huésped natural (Karst y Tibbetts, 2016). Una característica de la patogénesis de norovirus, es que se presenta una interacción heterogénea entre el hospedero y el virus, por lo que las infecciones por norovirus no afectan a todos los individuos ya que no todos los genotipos igual virulencia (de Graaf *et al.*, 2016).

Estudios realizados en voluntarios adultos han permitido observar características importantes tanto de la gastroenteritis, patogénesis e inmunidad generada por norovirus. Entre los cambios observados en las biopsias, tomadas de la unión duodeno-jejuno de los voluntarios, se notaron cambios histológicos específicos, como el ensanchamiento y el embotellamiento de las vellosidades intestinales, hiperplasia de las células de la cripta, así como desorden de las células epiteliales, vacuolización citoplasmática (Atmar y Estes, 2006; Karst, 2010; Green, 2013). Cabe mencionar que estos cambios histológicos suceden a pocas horas de que se manifieste la enfermedad sintomática o asintomática; otra de las observaciones que se han hecho al trabajar con humanos voluntarios, es que entre el 13-40% de los voluntarios no adquieren la infección, mientras que el 50% si desarrollan la enfermedad, por lo que se cree que el desarrollo de la enfermedad depende de la susceptibilidad del individuo, el tejido y el tropismo celular de la cepa, la respuesta de la microbiota bacteriana del huésped a la infección (Atmar y Estes, 2006; Fernández y Gómez, 2010; de Graaf *et al.*, 2016).

Debido a las lesiones patológicas observadas a causa de norovirus humano, se pensaría que este se dirige a las células del intestino delgado, sin embargo, ha sido difícil establecer la especificidad de esta interacción (Green, 2013). Existe evidencia acerca del

tropismo de norovirus por los antígenos del grupo histo-sanguíneo (HBGAs), los cuales actúan como receptor natural o cofactor necesario para que se desarrolle la infección; aunque el mecanismo de entrada del virus aún se desconoce, se sugiere que la dinamina y el colesterol pueden estar involucradas en ese proceso, como se ha visto en norovirus murino (de Graaf *et al.*, 2016). La especificidad de unión a los HBGAs varía entre las diferentes cepas virales de norovirus, por lo tanto, la susceptibilidad a la infección y la enfermedad se correlaciona al patrón de unión de norovirus con los HBGAs (Atmar y Estes, 2006; Donaldson *et al.*, 2008; Atmar, 2010; de Graaf *et al.*, 2016).

Desde la perspectiva de estructura, evolución y restricción del huésped el papel del reconocimiento de HBGA por norovirus ha sido objeto de intenso estudio; se ha demostrado que la resistencia heredada a la infección de norovirus, radica en la variabilidad de los HBGA, así como en su expresión en la superficie epitelial de la mucosa del tracto gastrointestinal (Green, 2013; Robilotti *et al.*, 2015).

### **2.3 Sapovirus**

El primer brote de gastroenteritis por sapovirus ocurrió en Sapporo, Japón en octubre de 1977. Anteriormente, los casos de gastroenteritis por sapovirus se consideraban esporádicos, y en la mayoría de los casos los niños infectados presentaban un cuadro gastrointestinal leve. Sin embargo, recientemente se han reportado casos de niños hospitalizados con gastroenteritis severa por infección con sapovirus genotipo GGI/1 (Chiba *et al.*, 2000; Phan *et al.*, 2007; Sdiri-Loulizi *et al.*, 2011). En México se estima que sapovirus fue el causante de aproximadamente 40% de las infecciones gastrointestinales en niños menores de dos años, esto con respecto a los demás calicivirus humanos (Farkas *et al.*, 2000).

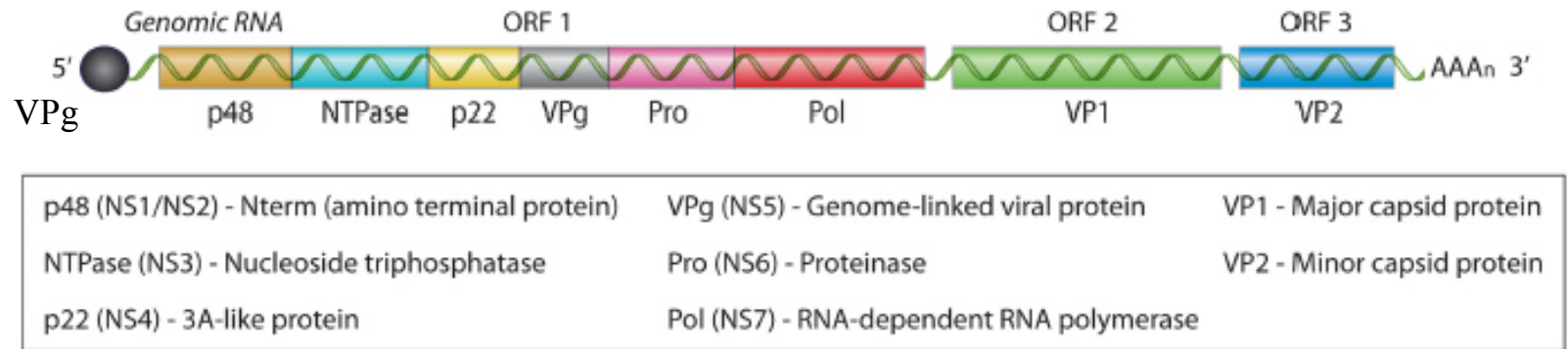


Figura 2. Genoma de norovirus Humano (Robilotti *et al.*, 2015).

### VIRION

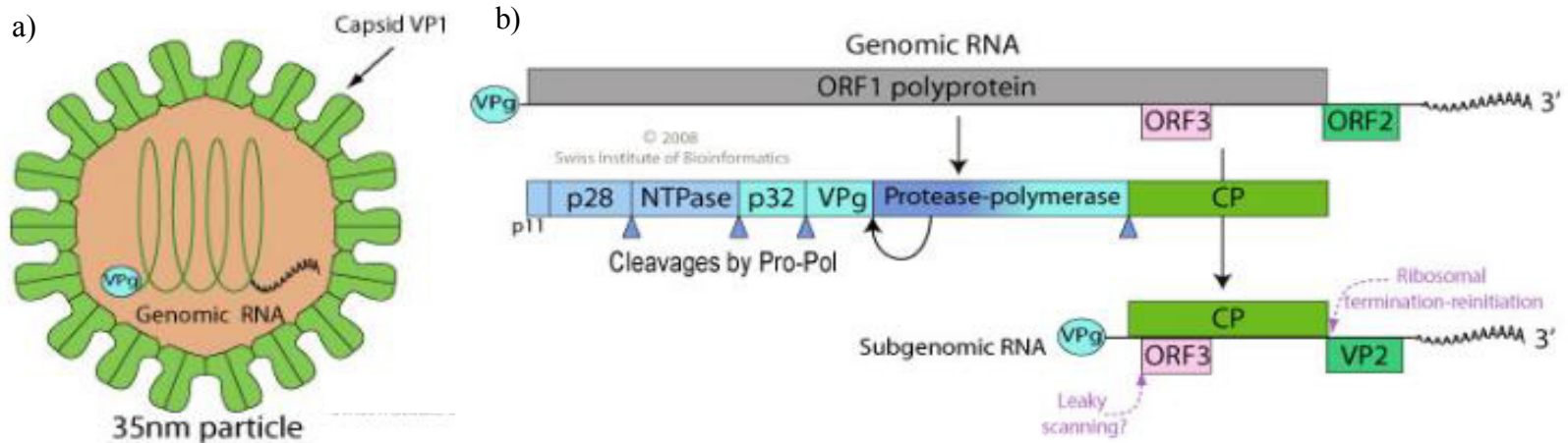


Figura 3. a) Estructura de la partícula viral y b) Estructura del genoma de sapovirus (ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 2008).



La principal forma de contagio de sapovirus es la vía fecal-oral, así como de persona-persona, y el consumo de alimentos o agua contaminados. El periodo de incubación de 12-48 horas para que la gastroenteritis por sapovirus se manifieste. El cuadro clínico de sapovirus se caracteriza principalmente por la presencia de diarrea y vómito, aunque pueden presentarse otros síntomas como fiebre, dolor abdominal, náuseas, dolor de cabeza, etc.; la enfermedad usualmente se resuelve en una semana, aunque ocasionalmente la infección por sapovirus es asintomática (Dos Anjos *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2013; Oka *et al.*, 2015).

Sapovirus, al igual que norovirus, pertenece a la familia *Caliciviridae*, son virus no envueltos, con un diámetro de 30-38 nm, presentan forma de estrella, su genoma es de RNA lineal de cadena sencilla en sentido (ssRNA) y su extremo 3' se encuentra poliadenilado (Fig. 3) (Oka *et al.*, 2012; Hall *et al.*, 2013; Varela *et al.*, 2016).

Sapovirus cuenta con dos o tres marcos abiertos de lectura (ORFs), las seis proteínas no estructurales (NS1-NS7) y la proteína principal de cápside (VP1) son codificadas por ORF1, mientras que ORF2 y ORF3 codifican para proteínas que aún no han sido claramente definidas (Svraka *et al.*, 2010; Oka *et al.*, 2012). ORF3, se encuentra superpuesto en ORF1 y sólo está presente en genogrupos seleccionados de sapovirus (Tse *et al.*, 2012).

La clasificación de sapovirus es con base a la secuencia del gen que codifica para la cápside. Actualmente se propone que sapovirus se divide en 14 genogrupos (GGI-GGXIV), de los cuales GGI, GGII, GGIV y GGV son lo que se asocian a infecciones en humanos (Farkas *et al.*, 2004; Sdiri-Loulizi *et al.*, 2011; Matussek *et al.*, 2015).

Los genotipos de sapovirus han sido caracterizados por medio de estudios filogenéticos, a la fecha se conocen 17; mismos que muestran aproximadamente un 20% o más de variaciones nucleotídicas en el gen de la cápside (Liu *et al.*, 2015; Matussek *et al.*, 2015). El genotipo comúnmente encontrado en humanos es GGI, siendo el genotipo GGI/1 el asociado a diarreas agudas en países como México, Tailandia, Japón y Pakistán (Sdiri-Loulizi *et al.*, 2011). Recientemente se han identificado varias cepas recombinantes de sapovirus, las cuales pueden generarse por tres formas de recombinación: intergenogrupo, intergenotipo e intragenogrupo (Phan *et al.*, 2007).

Dentro de los genogrupos GI, GII y GIII, se han identificado recombinaciones intragenogrupo (Hansman *et al.*, 2005; Hansman *et al.*, 2007; Oka *et al.*, 2015). Se sugiere que las recombinaciones se originan entre la unión de la proteína VP1 y la polimerasa en ORF1 (Hansman *et al.*, 2005; Phan *et al.*, 2007; Oka *et al.*, 2015).

### 2.3.2 Patogénesis

La gastroenteritis causada por sapovirus no difiere clínicamente de la gastroenteritis generada por otros virus, como rotavirus y norovirus, aunque suele ser menos severa. Sapovirus, al igual que norovirus, no puede ser cultivado *in vitro*, la cepa Cowden es la única cepa de las sapovirus entéricos porcinos que se ha podido cultivar (Buesa y Rodríguez, 2016). Los calicivirus entéricos humanos tienen a replicarse en el tracto gastrointestinal superior, lo que causa infecciones citolíticas en los enterocitos de las vellosidades intestinales, pero sin afectar a los enterocitos de la cripta del intestino delgado proximal. Para que la unión al receptor de la célula diana ocurra son necesarias moléculas de carbohidratos, pero en el caso de los genogrupos de sapovirus humano GI y GIV no se ha observado interacción con los HGBA, como en el caso de norovirus humano, por lo que tal vez exista la posibilidad de que los otros genogrupos puedan tener actividad de unión a ellos (Shirato-Horikoshi *et al.*, 2007; Buesa y Rodríguez, 2016).

## 2.4 Astrovirus

Los Astrovirus (AstV) son miembros de la familia *Astroviridae*, del género *Mamastrovirus*; su estructura es icosaédrica y no posee envoltura. Miden de 28 a 30 nm de diámetro, su morfología es en forma de estrella y su genoma es de RNA de cadena sencilla, el cual se encuentra flanqueado en sus extremos 3' y 5' por regiones sin traducir (UTRs, por sus siglas en inglés), así mismo el extremo 3' se encuentra poliadenilado, posee tres ORFs, ORF1a, ORF1b, y ORF2, los cuales se traslapan entre sí (Fig. 4). Las proteínas no estructurales, las cuales están involucradas en la transcripción

y replicación viral, son sintetizadas por ORF1a y ORF1b; ORF1a codifica para una serin-proteasa; ORF1b codifica a la RdRp (se necesita de una señal de *ribosomal frameshifting* (RFS) la cual se encuentra entre la superposición de ORF1a y ORF1b, dicha señal es importante para la traducción de RdRp); por su parte ORF2 da lugar a las proteínas virales, las cuales se expresan a partir de un RNA subgenómico (sgRNA) y son precursoras de la cápside; en el solapamiento que se genera entre ORF1b y ORF2 el cual resulta ser una región altamente conservada, se encuentra el promotor que dará lugar a la síntesis del sgRNA (Jonassen *et al.*, 2001; Finkbeiner *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2012; Bosch *et al.*, 2014; Munnink *et al.*, 2016).

Basado en el análisis de secuencia nucleotídica de una región de 348 pb de la cápside (ORF2), los astrovirus humanos, reconocidos como HAstV (*human astrovirus* por sus siglas en inglés) se clasifican en ocho genotipos (1-8) denominados “clásicos”, siendo el serotipo 1 la cepa predominante a nivel mundial; por su parte, los serotipos 6 y 7 son los menos reportados, ya que se atribuyen a casos raros (Mustafa *et al.*, 2000; Giux *et al.*, 2002; Gabbay *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2012; Krishnan, 2014). En México, HAstV-2 es la cepa de mayor prevalencia con un 42%, seguido de HAstV-4 con un 23%, mientras que HAstV-1 solo representa el 10%, siendo HAstV-5 y HAstV-7 las cepas de menor prevalencia, ambos con el 6% (Jeong *et al.*, 2012; Krishnan, 2014).

Hasta el 2008, las infecciones gastrointestinales causadas por HAstV solo se asociaban a los genotipos clásicos, cuando se describieron siete nuevas especies de astrovirus, a los cuales se les denominó MLB1, MLB2, MLB3, VA1, VA2, VA3 y VA4. Aunque hasta el momento existen pocos estudios sobre su prevalencia, estas nuevas cepas se han detectado en niños con gastroenteritis en distintos países, pero no se ha demostrado claramente su papel patogénico en la salud humana (Finkbeiner *et al.*, 2009; Bosch *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2015).

Astrovirus es uno de los principales agentes causales de gastroenteritis, las infecciones generadas por HAstV representan a nivel mundial hasta el 10% de los casos esporádicos de diarrea en niños. Así mismo, se ha reportado que de las infecciones por HAstV, el porcentaje de niños con diarrea que se hospitalizaron fueron del 2 al 16%, el grupo de niños menores de dos años el más afectado (Jeong *et al.*, 2012; Munnink *et al.*, 2016).

Los brotes de gastroenteritis por astrovirus humanos son más comunes durante el invierno, aunque esto puede variar de acuerdo a la región geográfica; la principal ruta de transmisión es la vía oral-fecal. La enfermedad por astrovirus se caracteriza por diarrea acuosa (2-3 días), la cual puede ir acompañada por fiebre, vomito, dolor abdominal y dolor de cabeza (Giux *et al.*, 2002; Walter y Mitchell, 2003; Soares *et al.*, 2008; Kapoor *et al.*, 2009).

Estudios epidemiológicos, han reportado que un solo niño ha presentado co-infección con distintos serotipos de HAstV, lo que proporciona la oportunidad para que ocurra una recombinación (Walter *et al.*, 2001). Se han observado eventos de recombinación entre AstV que infectan a humanos y animales, después de una co-infección al mismo huésped, siendo este uno de los principales mecanismos en la evolución de AstV y en la generación de nuevas cepas (Bosch *et al.*, 2014; Krishnan, 2014). La recombinación también ocurre de manera natural, debido a la naturaleza de la polimerasa, la cual es propensa a cometer errores (Walter *et al.*, 2001).

#### **2.4.1. Patogénesis**

La gastroenteritis por astrovirus humano afecta principalmente a niños, pero ancianos y personas inmunocomprometidas también se ven afectadas a causa de este virus. Usualmente la gastroenteritis por astrovirus es menos severa, que la gastroenteritis generada por rotavirus y norovirus, y se resuelve de manera espontánea, por lo que en la mayoría de los casos no se requiere hospitalización (Moser y Schultz-Cherry, 2005; Xavier *et al.*, 2015).

Astrovirus, afecta principalmente a las células epiteliales que se encuentran cerca de las puntas de las microvellosidades del tracto gastrointestinal, y la infección se limita solo al intestino delgado. Los cambios morfológicos en el intestino, a pesar de la severidad de la gastroenteritis, sugieren que no se genera una respuesta inflamatoria en la infección por astrovirus (Moser y Schultz-Cherry, 2005; Méndez y Arias, 2013; Bosch *et al.*, 2014).

Se sugiere que astrovirus no utiliza los mecanismos comunes para generar diarrea, sino que puede utilizar otros mecanismos como, la modulación de canales iónicos o

disacaridasa intestinal, lo que ocasiona la mala absorción, o el aumento de la permeabilidad de la barrera epitelial intestinal, provocando un desequilibrio que genera la pérdida de agua y electrolitos (Moser y Schultz-Cherry, 2005; Moser *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2014).

## **2.5 Adenovirus**

Dentro del grupo de Adenovirus que afectan a humanos (HAdVs), se encuentran virus que causan gastroenteritis, enfermedades respiratorias, conjuntivitis, cistitis hemorrágica, exantemas, así como infecciones de tracto urinario. Los Adenovirus entéricos son la tercera causa de diarrea no bacteriana en niños menores de cinco años, y se relacionan con entre el 1-31% de casos de gastroenteritis aguda, principalmente en guarderías, hospitales y jardín de niños (Pereira Filho *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2009; Rezaei *et al.*, 2012; La Rosa *et al.*, 2015). Se estima que, a la edad de 5 años, entre el 70-80% de los niños ya adquirió anticuerpos contra alguno de los serotipos de adenovirus (Moon, 1999). En México la prevalencia de adenovirus entéricos es de aproximadamente el 12% (Akhtar *et al.*, 1995).

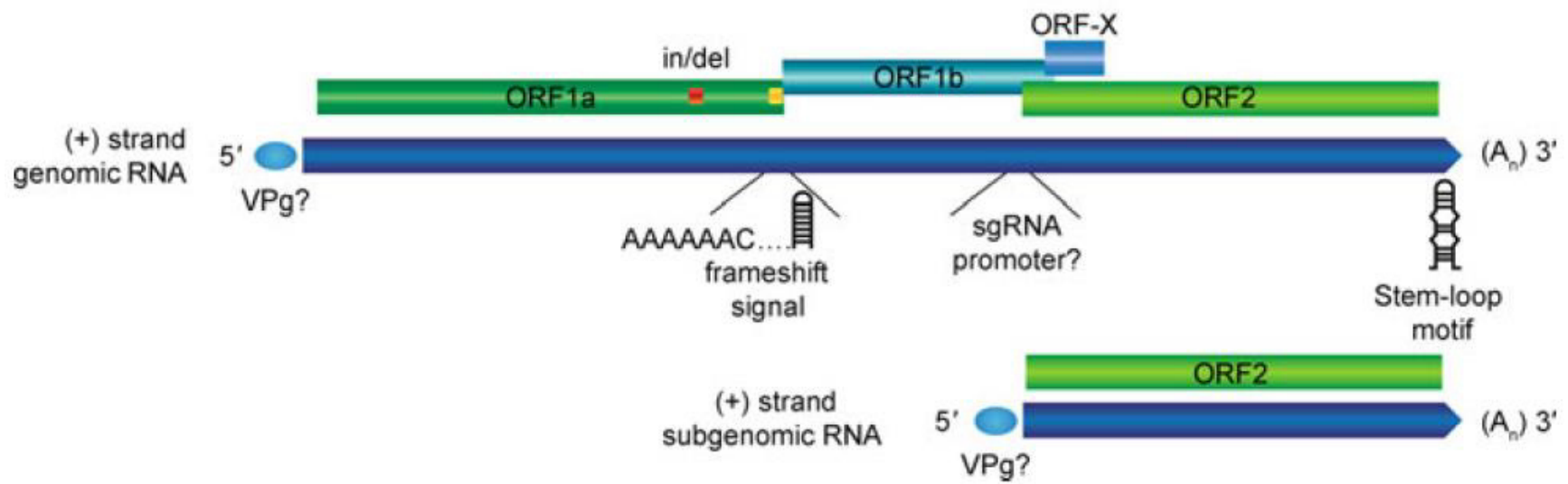


Figura 4. Organización del genoma de astrovirus humano (Méndez *et al.*, 2012).

Los brotes de gastroenteritis no presentan predominio estacional, la principal ruta de contagio es la vía fecal-oral, mientras que el periodo de incubación va de 3 a 10 días; dentro de los síntomas característicos se encuentra diarrea, vómito y fiebre (Moon, 1999).

Los adenovirus son virus icosaédricos de 70-90 nm de diámetro, pertenecen a la familia *Adenoviridae* (La Rosa et al., 2015). Su genoma es de DNA lineal de doble cadena; su cápside se compone de tres proteínas principales (Fig. 5), el hexón es la proteína más abundante, se encuentra dispuesto en 240 trímeros, los cuales conforman los lados de la superficie icosaédrica. El hexón más largo conocido, es el hexón polipéptido Ad2. La base de pentón y la fibra (compuesta por 3 regiones distintas; N-terminal, eje central y C-terminal) dan lugar al complejo pentón el cual sella la cápside en cada uno de los 12 vértices de virión; así mismo estas proteínas están involucradas tanto en el reconocimiento como en la entrada del virus a las células hospederas (Rux y Burnett, 2004; Ebner *et al.*, 2005; Russell, 2009; Liu *et al.*, 2010; Ziros *et al.*, 2015). Entre las proteínas de cápside que se encuentran en menor cantidad están las proteínas IIIa, VI, VIII y IX, su principal objetivo es dar estabilidad a la cápside, por lo que se conocen como proteínas cemento, también desempeñan otras funciones como la entrada del virus a la célula, pérdida de la cápside y el ensamble del virión (Rux y Burnett, 2004; Wiethoff *et al.*, 2005).

En el núcleo se encuentra el material genético y 5 proteínas V, VII, IVa2, X, la proteína terminal (TP) y proteasa; las proteínas V y VII se encargan de dar estabilidad al genoma, función similar al que realizan las histonas, la proteína principal en el core es VII; la proteína X (conocida como proteína Mu) es una proteína transactivadora, TP tiene la función de oligonucleótido por lo que se encuentra involucrada en la replicación, esta proteína se encuentra covalentemente unida al final del genoma. La proteína IVa2 tiene una función específica, de acuerdo al serotipo, la cual es el empaquetamiento del DNA viral, aunque también se ha relacionado como un activador transcripcional del principal promotor tardío (MLP). La proteasa se encarga de catalizar el proceso de maduración de seis proteínas estructurales, lo que resulta esencial para la producción de partículas virales (Zhang e Imperiale, 2003; Cusack, 2005; Gonçalves y Vries, 2006; Liu *et al.*, 2010).

Con base a sus propiedades de hemaglutinación y neutralización, así como oncogénicas, morfológicas y secuencias de DNA, se conocen hasta el momento siete sub-géneros (A-G) y 70 serotipos. Recientemente y usando datos genómicos, se han logrado identificar nuevos tipos de AdV, incluyendo cepas emergentes y recombinantes. Los genotipos 40 y 41 forman parte del sub-genero F y se asocian a casos de gastroenteritis, por tal motivo se les denomina adenovirus entéricos (Jones et al., 2007; Harrach et al., 2011; Hage *et al.*, 2015; La Rosa *et al.*, 2015). Otros genotipos se han relacionado con gastroenteritis, como es el caso del genotipo 52 (sub-genero G) que ha aislado de pacientes con gastroenteritis, mientras que el genotipo 38, perteneciente al sub-genero D, rara vez ha sido relacionado con gastroenteritis aguda (Wold y Horwitz, 2013; Raboni *et al.*, 2014). A excepción del sub-genero E serotipo 4, las infecciones del tracto gastrointestinal también pueden estar asociadas con adenovirus de otros sub-géneros y serotipos (Tabla 1) (Wold y Horwitz, 2013).

A pesar de la relación entre los serotipos de adenovirus entéricos, a nivel genómico presentan algunas diferencias, estudios realizados utilizando enzimas de restricción, 9 para HAdV 40 y 10 para HAdV 41, de acuerdo con la presencia o ausencia de los sitios para las enzimas de restricción, se logró agrupar 48 cepas en HAdV 40 y 128 cepas para HAdV 41; se han descrito variantes de DNA tanto para HAdV 40 como para HAdV 41, reportándose 11 variantes para HAdV 40 y 28 variantes para HAdV 41 (van der Avoort *et al.*, 1989; Uhnoo *et al.*, 1990).

### **2.5.1. Patogénesis**

A diferencia de los demás géneros de adenovirus, los genotipos 40 y 41 se caracterizan por solo infectar el tracto gastrointestinal, sin aparente diseminación a otros órganos; ya que han sido visualizadas dentro de las células del intestino delgado, sugiriendo, que su replicación está dentro del tracto gastrointestinal. Sin embargo, estos genotipos muestran la peculiaridad de presentar un crecimiento muy pobre en cultivo celular *in vitro* (Toogood y Hay, 1988; Favier *et al.*, 2002).



La duración de la diarrea difiere de acuerdo al genotipo, si el paciente fue infectado con HAdV 40 la infección dura alrededor de 8.6 días, mientras que 12.2 días es el promedio para las infecciones por HAdV 41 (Uhnnoo *et al.*, 1990).

**Tabla 1.** Infecciones asociadas con sub-géneros y serotipos de adenovirus (Wold y Horwitz, 2013).

Subgrupo	Serotipo	Sitio principal de infección
A	12, 18, 31	Vías respiratorias, vías urinarias y tracto gastrointestinal
B	3, 7, 11,14, 16,21,34, 50,55	Vías respiratorias, ojos, vías urinarias y tracto gastrointestinal
C	1, 2, 5, 6, 57	Vías respiratorias, vías urinarias y tracto gastrointestinal
D	8–10, 13, 15, 17, 19,20, 22-30, 32, 33,36–39, 42–49, 51,53, 54, 56	Ojos y tracto gastrointestinal
E	4	Ojos y vías respiratorias
F	40, 41	Tracto gastrointestinal
G	52	Tracto gastrointestinal

La infección viral inicia con la interacción de la fibra y base del pentón con la membrana celular; la fibra lleva a cabo el reconocimiento inicial con el receptor CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*), que es receptor para varios serotipos de adenovirus humanos, mientras que la internalización es mediada por integrinas  $\alpha_v$ , se ha demostrado que el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD) está involucrado en la entrada del virus a la célula por la interacción con las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ , las cuales se unirán a receptores primarios (Favier *et al.*, 2002; Zhang y Bergelson, 2005).

Sin embargo, el subgrupo F es el único que posee dos fibras, las cuales difieren entre sí tanto en longitud como en secuencia primaria, siendo la fibra de mayor tamaño la que interactúa con CAR, por lo que se podría pensar que la razón del tropismo de los adenovirus entéricos, se debe a la interacción de la fibra corta con algún receptor en el tracto gastrointestinal; otra variación en el subgrupo F, es que HAdV40/41 no utilizan las integrinas  $\alpha_v$  para entrar a la célula y a diferencia del resto de los serotipos que llevan en la base del pentón la secuencia RGD, HAdV40 lleva el dominio RGAD, mientras que HAdV41 presenta secuencias IGDD (Albinsson y Kidd; 1999; Favier *et al.*, 2002; Cusack, 2005; Zhang y Bergelson, 2005).

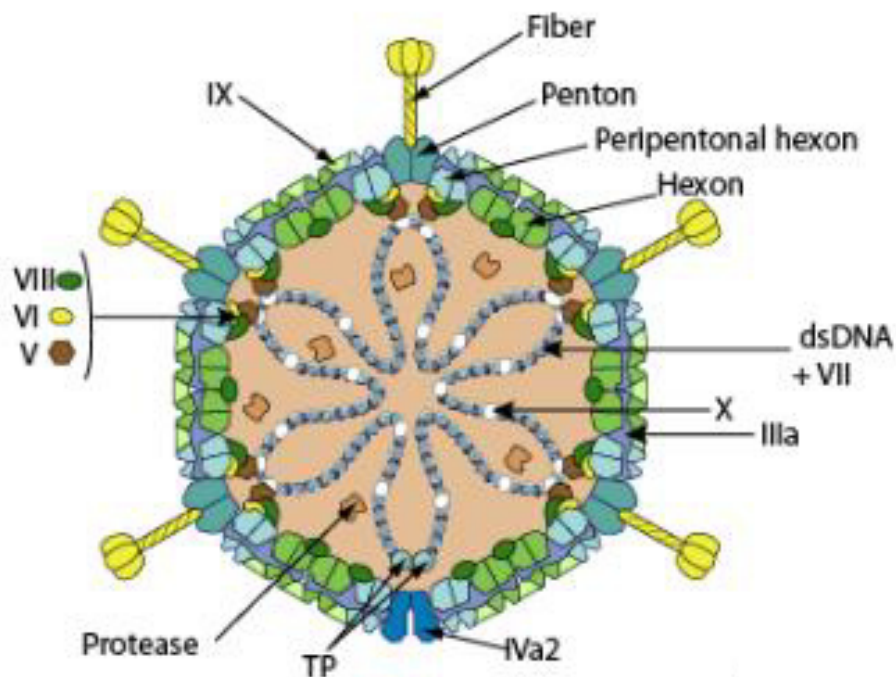


Figura 5. Estructura y componentes de adenovirus (ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 2015).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La gastroenteritis aguda es un problema a nivel mundial, que aqueja tanto a los países desarrollados, como en vías de desarrollo, siendo la población infantil la más afectada. En México, las enfermedades gastrointestinales de mayor prevalencia son las que generan los agentes virales y representan un grave problema para la salud pública debido a que son la quinta causa de mortalidad durante el primer año de vida del infante. Dentro de los principales patógenos se encuentran los rotavirus, seguidos de norovirus, adenovirus, astrovirus y sapovirus.

Los brotes de gastroenteritis aguda pueden variar de una región geográfica a otra, lo que podría generar la presencia de estos virus durante todo el año, pero con picos de mayor incidencia en determinados meses, como es el caso de rotavirus y astrovirus, cuya incidencia aumenta durante el invierno. Aunado a esto, los virus son capaces de presentar mutaciones y re-arreglos genéticos, que permiten su evolución y generación de cepas emergentes, por lo cual es importante el monitoreo y caracterización de los virus causantes de gastroenteritis aguda, así como sus variaciones, ya que esto podría contribuir a la creación de estrategias preventivas eficientes.

#### **4. HIPÓTESIS**

Es posible identificar las cepas circulantes de virus causantes de gastroenteritis en niños menores de 5 años en la región sur del estado de Sonora.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Identificar y caracterizar el genotipo de los agentes infecciosos virales causantes de gastroenteritis en niños menores de cinco años en la región del sur del Estado de Sonora, por medio de herramientas de biología molecular.

### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la incidencia de rotavirus, norovirus, adenovirus entéricos, saporovirus y astrovirus en niños con gastroenteritis en hospitales localizados al sur de Sonora.
2. Identificar los genotipos correspondientes a cada virus detectado durante el periodo de estudio.
3. Analizar la secuencia nucleotídica de los genes asociados a la clasificación genotípica de cada virus.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Lugar de estudio**

Las muestras de heces fecales se obtuvieron del Hospital Regional de Navojoa y el Hospital del Niño y la Mujer en Cd. Obregón, Sonora. Para el transporte de las muestras no se utilizaron preservadores, una vez en el laboratorio se refrigeraron a 4°C hasta su uso y posteriormente se almacenaron en un congelador a -20°C.

### **6.2 Muestreo**

Se recolectaron muestras de heces de niños con gastroenteritis. Para el criterio de inclusión se consideró la edad del menor, no mayor de 5 años, presentar 3 o más episodios diarreicos en un tiempo no mayor de 24 h, vómito, fiebre. Como criterios de exclusión se consideró que la gastroenteritis fuera de origen bacteriano o parasitario y que el infante tuviera más de 5 años. Las muestras obtenidas de niños con gastroenteritis se transportaron al laboratorio de Microbiología e Inmunología (JL203) de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

### **6.3 Pruebas rápidas**

Para determinar si una muestra era positiva para rotavirus o adenovirus entéricos, se utilizó el kit comercial *SD Rota/Adeno Rapid Test* (SD Biotec, Standard Diagnostic, Inc., Republic of Korea). El protocolo se describe brevemente a continuación: con un hisopo se recolectaron aproximadamente 50 mg de heces que se disolvieron en 4 ml de solución diluyente (*Assay Diluent, Rota/Adeno Rapid*), posteriormente se adicionaron de 3 a 4 gotas (120 a 150 µl) de esta mezcla al pocillo de la tira reactiva del kit comercial y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Para la interpretación de resultados se utilizó el inserto proporcionado por el fabricante, las muestras positivas mostraban dos bandas, la banda control y la banda correspondiente al virus que se detectó.

En el caso de muestras positivas para rotavirus, se analizó su genoma por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% para observar el corrimiento electroforético característico del genoma de rotavirus. El RNA de doble cadena se sometió a una electroforesis en un sistema continuo a 100 volts, por 3 horas con buffer de corrimiento Tris-Glicina 1X (Glicina, 150mM; Tris, 20 mM). Para visualizar los segmentos de RNA de rotavirus, el gel se retiró de la cámara de electroforesis después del tiempo de corrimiento establecido, posteriormente el gel se colocó en solución fijadora (etanol al 10%, ácido acético 0.5%) por 30 min, luego se transfirió a una solución de nitrato de plata (10 mM) por 30 min, en condiciones de oscuridad. Se lavó el gel dos veces consecutivas con agua tridestilada, se le adicionó una solución de revelado (formaldehído al 1.5%, NaOH 0.75 M) y se incubó a temperatura ambiente, mezclando constantemente por 15 min o hasta la aparición de las bandas. El gel se lavó con una solución de ácido acético al 5% por cinco min y posteriormente se colocó en agua tridestilada. El gel se expuso a luz blanca en el transiluminador y tomó fotografía (DNR miniBis Pro, Bio-Imaging Systems, Accesolab-accesorios para laboratorios S.A DE C.V., Ciudad de México, México), a fin de revelar el corrimiento electroforético del genoma de rotavirus.

#### **6.4 Extracción de ácidos nucleicos**

De muestras recolectadas se realizó una suspensión de heces al 20% en buffer de fosfatos (PBS), y posteriormente se realizó una extracción de RNA utilizando el kit comercial QIAamp® DSP Viral RNA Mini Kit 50 (QIAGEN Inc., Germantown, MD) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Para la extracción de DNA se utilizó el kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific Inc., Ciudad de México, México) siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### **6.5 Síntesis de cDNA**

El RNA viral de las muestras se sometió a una retro-transcripción. A continuación, se describe las condiciones de dicho procedimiento: para cada virus se utilizó un

oligonucleótido externo a 1 $\mu$ M, sapovirus (SLV5317), norovirus (G1SKR y G2SKR), astrovirus (SF0076) y rotavirus (VP7, End9; VP4, Con2 y VP4R) esto con el fin de obtener cDNA. Para la primera parte de la reacción de retrotranscripción, (mezcla 1) en un tubo de 0.2  $\mu$ l se adicionó un 1 $\mu$ l del oligonucleótido externo y 2  $\mu$ l de RNA purificado para un volumen parcial de 3  $\mu$ l. Una vez realizada la primera mezcla, se colocó en el termociclador (ProFlex PCR System, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific Inc.) a 95°C por 5 min, posteriormente se incubó en hielo. La segunda reacción (mezcla 2) se realizó utilizando 2  $\mu$ l de Buffer M-MLV RT 5X (PROMEGA®), 1.3  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 3.2  $\mu$ l de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y 2 U de RT M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, PROMEGA®, PROMEGA Corp., Madison, WI) para un volumen de 7  $\mu$ l. El contenido de la mezcla dos, se adicionó al volumen de la mezcla uno, dando así un volumen final aproximado de 10  $\mu$ l; una vez homogenizadas las mezclas, se llevó nuevamente al termociclador para continuar con la síntesis de cDNA en un ciclo de 42°C por 60 min, seguido de 10 min a 72°C. Una vez obtenido el cDNA, se almacenó a -20°C hasta su uso. Las condiciones de retro-transcripción fueron similares para los cuatro virus.

## **6.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

### **6.6.1 Amplificación del gen de la cápside de Norovirus**

Una vez que se obtuvo el cDNA, se sometió a una PCR con la finalidad de amplificar la región de la cápside, para esto se realizó una mezcla con un volumen final de 12.5  $\mu$ l, utilizando PCR Master Mix (2X) (50 U/ $\mu$ l de *Taq* polimerasa DNA, 400  $\mu$ M de dATP, 400  $\mu$ M de dGTP, 400  $\mu$ M de dCTP, 400  $\mu$ M de dTTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) (PROMEGA®) y oligonucleótidos específicos a 25  $\mu$ M para G1 y GII respectivamente (Tabla 2), posteriormente se colocó en el termociclador bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos de 3 etapas a 94°C por 1- min, 55°C por 30 seg y 72°C por 1min, finalmente un ciclo de 72°C por 7 min, estas condiciones fueron modificadas con referencia a las propuestas por Kojima *et al.*, (2002). Tras una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, en buffer Tris-Acetato-



EDTA (TAE) a 100 volts durante 35 min y tinción con bromuro de etidio, el producto de PCR obtenido se visualizó con exposición a luz ultravioleta en el transiluminador.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la amplificación del gen de la cápside de norovirus.

Oligo-nucleótido	Geno-grupo	Polaridad	Secuencia 5'-3'	Producto (pb)
G1SKF	G1	(F)	CTGCCCCGAATTYGTAAATGA	330
G1SKR		(R)	CCAACCCARCCATTRTACA	
COG1F	G1	(F)	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	380
G1SKR		(R)	CCAACCCARCCATTRTACA	
G2SKF	G2	(F)	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	340
G2SKR		(R)	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	
COG2F	G2	(F)	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	390
G2SKR		(R)	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	

F: forward; R: reverse

### 6.6.2 Amplificación del gen de la cápside de Sapovirus

Una vez que se obtuvo el cDNA, se sometió a una PCR con la finalidad de amplificar la región de la cápside, para esto se realizó una mezcla con un volumen final de 12.5 µl, utilizando PCR Master Mix (2X) (50 U/µl de *Taq* polimerasa DNA, 400 µM de dATP, 400 µM de dGTP, 400 µM de dCTP, 400 µM de dTTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) (PROMEGA®) y oligonucleótidos específicos sapovirus (Tabla 2), posteriormente se sometió en el termociclador a las siguientes condiciones: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 3 etapas a 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 1- min, finalmente un ciclo de 72°C por 7 min (Romani *et al.*, 2011). Tras una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 100 volts durante 35 min y tinción con bromuro de etidio, el producto de PCR obtenido se visualizó con exposición a luz ultravioleta en el transiluminador.

### 6.6.3 Amplificación de la región conservada ORF1b de Astrovirus

Con la finalidad de amplificar la región de la polimerasa (RdRp), el cDNA obtenido se sometió a una PCR, para esto se realizó una mezcla con un volumen final de 12.5  $\mu$ l, utilizando PCR Master Mix (2X) (50 U/ $\mu$ l de *Taq* polimerasa DNA, 400  $\mu$ M de dATP, 400  $\mu$ M de dGTP, 400  $\mu$ M de dCTP, 400  $\mu$ M de dTTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) (PROMEGA®) y oligonucleótidos específicos para ORF1b, así como para la región de la cápside (ORF2) (Tabla 3), posteriormente se sometió en el termociclador a las siguientes condiciones: 95°C por 5 min, 35 ciclos de 3 etapas a 95°C por 45 seg, 42°C por 30 seg y 72°C por 90 seg, finalmente un ciclo de 72°C por 10 min, las condiciones fueron modificadas a las propuestas por Finkbeiner *et al.*, (2009). El producto obtenido se visualizó en gel de agarosa al 1.5% tras una corrida electroforética, en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 100 volts durante 35 min, tinción con bromuro de etidio, exposición a luz ultravioleta en el transiluminador.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la amplificación del gen de la cápside de sapovirus.

Oligonucleótido	Polaridad	Secuencia 5'-3'	Producto (pb)
SLV5749	(F)	CTCGCCACCTACRAWGCBTGGTT	434
SLV5317	(R)	CGGRCYTCAA AVSTACCBCCCCA	

F: forward; R: reverse

### 6.6.4 Amplificación de los genes que codifican para VP7 y VP4

Una vez que se obtuvo el cDNA, se sometió a una PCR con la finalidad de amplificar el gen completo de VP7 y el gen parcial de VP4, para esto se realizó una mezcla con un volumen final de 12.5  $\mu$ l utilizando PCR Master Mix (2X) (50 U/ $\mu$ l de *Taq* polimerasa

DNA, 400  $\mu$ M de dATP, 400  $\mu$ M de dGTP, 400  $\mu$ M de dCTP, 400  $\mu$ M de dTTP, 3 mM  $MgCl_2$ ) (PROMEGA®) y oligonucleótidos específicos para VP7 y VP4 respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la amplificación de ORF1b y ORF2 de astrovirus.

Oligonucleótido	Polaridad	Secuencia 5'-3'	Producto (pb)
SF0073	(F)	GATTGGACTCGATTTGATGG	409
SF0076	(R)	CTGGCTTAACCCACATTCC	
Mon269	(F)	CAACTCAGGAAACAGGGTGT	449
Mon270	(R)	TCAGATGCATTGTCATTGGT	

F: forward; R: reverse

Posteriormente se colocó en el termociclador; en el caso de VP7 las condiciones son las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos de 3 etapas a 95°C por 45 seg, 50°C por 30 seg y 72°C por 90 seg, finalmente un ciclo de 72°C por 10 min. Las condiciones para VP4 fueron similares a las de VP7, con excepción de la temperatura de alineación que fue de 42°C (Gentsch *et al.*, 1992; Gouvea *et al.*, 1990). El producto obtenido se visualizó en gel de agarosa al 1.5% tras una corrida electroforética, en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 100 volts durante 35 min, teñido con bromuro de etidio, con exposición a luz ultravioleta en el transiluminador.

### 6.6.5 Amplificación del gen hexón de Adenovirus

El DNA extraído de las muestras positivas se sometió a una PCR para amplificar el gen hexón de adenovirus, se realizó una mezcla con un volumen final de 12.5  $\mu$ l, utilizando PCR Master Mix (2X) (50 U/ $\mu$ l de *Taq* polimerasa DNA, 400  $\mu$ M de dATP, 400  $\mu$ M de dGTP, 400  $\mu$ M de dCTP, 400  $\mu$ M de dTTP, 3 mM  $MgCl_2$ ) (PROMEGA®) y oligonucleótidos específicos para genotipos 40 y 41 (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la amplificación del gen de VP7 y VP4 de rotavirus.

Oligo-nucleótido	Gen	Polaridad	Secuencia 5'-3'	Producto (pb)
Beg9	VP7	(F)	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1062
End9		(R)	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	
Con3	VP4	(F)	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	876
Con2		(R)	ATTCGGACCATTTATAACC	
VP4F	VP4	(F)	TATGCTCCAGTNAATTGG	663
VP4R		(R)	ATTGCATTTCTTCCATAATG	

F: forward; R: reverse

Posteriormente, se sometió en el termociclador a las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 3 etapas a 94°C por 1- min, 57°C por 1- min y 72°C por 2 min, finalmente un ciclo de 72°C por 7 min (Verma *et al.*, 2009). El producto obtenido se visualizó en gel de agarosa al 1.5%, tras una corrida electroforética en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 100 volts durante 35 min, tinción con bromuro de etidio y con exposición a luz ultravioleta en el transiluminador.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la detección de adenovirus.

Oligonucleótido	Polaridad	Secuencia 5'-3'	Producto (pb)
Ad1	(F)	TTCCCATGGCICAYAACAC	482
Ad2	(R)	CCCTGGTAKCCRATRRTTGTA	

F: forward; R: reverse

## **6.7 Purificación del producto de PCR**

Para realizar la purificación del producto de PCR de rotavirus, astrovirus, adenovirus, norovirus y sapovirus, se utilizó el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA®), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se detalla brevemente la metodología: se agregó en partes iguales la solución *Membrane Binding Solution* a la amplificación de PCR (gel). Después se realizó la purificación de DNA por centrifugación, donde se ensambló la mini-columna en el tubo colector, se le agregó el producto de PCR y se dejó incubar por 1 - min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó la mini-columna a 13,500 RPM por 1- min (centrífuga LabNet International Inc.®, Edison, NJ). Se descartó el líquido del tubo colector, para esto se removió la mini-columna, y se volvió a colocar en el tubo una vez descartado el sobrenadante. Se realizaron dos lavados a la mini-columna, en el primer lavado, se le adicionó 700µl de *Membrane Wash Solution* y se centrifugó a 13,500 rpm por 1- min, descartando el líquido resultante, el segundo lavado se realizó con 500µl de la solución previamente mencionada y se centrifugó a 13,500 rpm por 5 min. Por último, se transfirió la mini-columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml debidamente etiquetado, se le agregó 25 µl de *Nuclease-Free Water* y se dejó incubar a temperatura ambiente por 1- min. Finalmente se almacenó a -20°C hasta su uso.

Una vez realizada la purificación, a las muestras se les realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TrisAcetato-EDTA (TAE) a 100 volts durante 35 min, teñido con bromuro de etidio, con exposición a luz ultravioleta en el transluminador (Bio-Imaging Systems MiniBis Pro), con el fin de confirmar la pureza y buena calidad del DNA.

## **6.8 Secuenciación.**

Una vez realizada la purificación de los productos de PCR, se procedió medir la concentración de DNA, para ello se utilizó el NANODROP 2000 (Thermo Fischer

Scientific Inc.) con una absorbancia de 260/280 nm. La secuenciación se realizó directamente de los productos de PCR purificados y cuantificados, de acuerdo con las instrucciones de la solicitud de secuenciación, con un volumen final de 16  $\mu$ l; en un tubo eppendorf de 0.2 ml se agregaron 120 ng de cada DNA purificado, mezclado con 10 pmol del oligonucleótido correspondiente (sentido y anti-sentido). Dicha mezcla fue enviada a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. El análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa MEGA6.0.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Detección de rotavirus y adenovirus entéricos mediante pruebas rápidas.

Las 179 muestras obtenidas durante el periodo de muestreo en el Hospital Regional de Navojoa y Hospital del Niño y la Mujer de Cd. Obregón, fueron sometidas a las pruebas rápidas comerciales *SD Rota/Adeno Rapid Test* (SD Bioline, CTR, S.A. de C.V., Monterrey, N.L.). Para rotavirus se obtuvieron 18 muestras positivas (Figura 6), y 2 muestras positivas en el caso de adenovirus. Así mismo, se observó la presencia de ambos virus en una de las muestras, por lo que se determinó como co-infección.

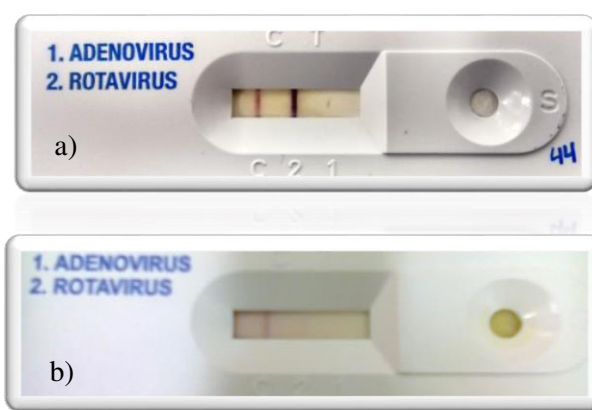


Figura 6. Pruebas rápidas de detección de rotavirus. a) Prueba *SD Rota/Adeno Rapid Test* (SD Bioline) positiva. b) Prueba *SD Rota/Adeno Rapid Test* (SD Bioline) negativa.

### 7.2 Detección del genoma de rotavirus por PAGE.

Las 18 muestras positivas para rotavirus fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida. Las muestras positivas para rotavirus mostraron un modelo de migración electroforético característico de rotavirus del grupo A (Fig. 7).

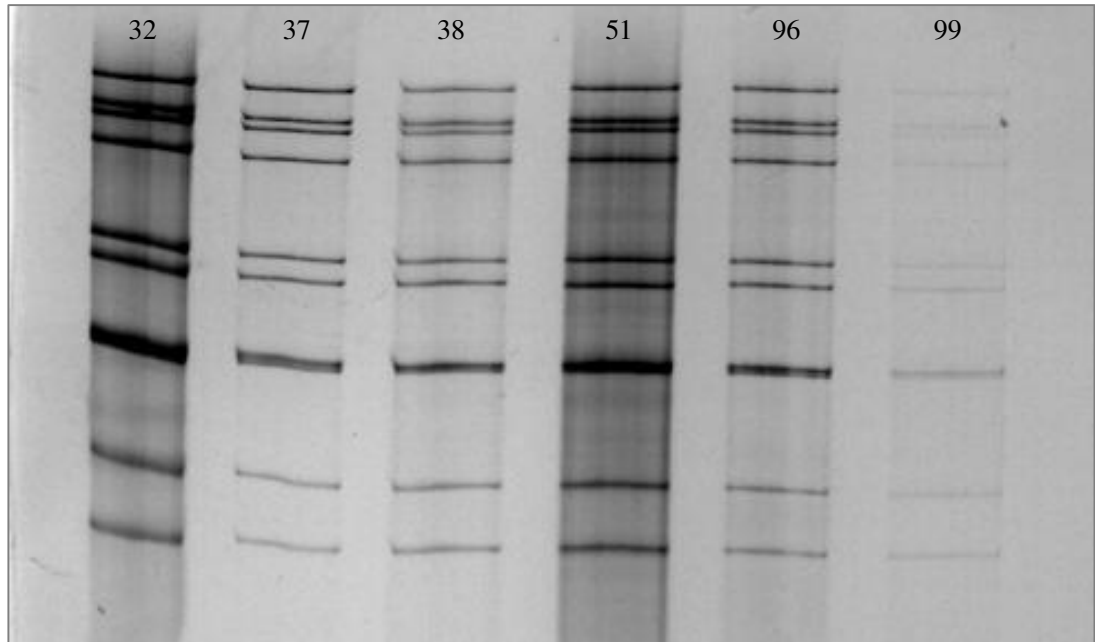


Figura 7. Corrimiento electroforético de las muestras positivas de rotavirus que muestran el genoma segmentado característico del grupo A.

### 7.3 Amplificación de los genes VP7 y VP4 de rotavirus

Para la amplificación del gen VP7 se utilizaron los oligonucleótidos Beg9/End9, ya que estos amplifican el gen completo de 1062 pb de VP7 (Fig. 3); se amplificaron 12 (66%) de las muestras positivas de rotavirus. En el caso de VP4, se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos Con2/Con3 y VP4F/VP4R, los cuales amplifican de manera parcial el gen de VP4 (Fig. 4); de las 11 (61%) fueron positivas a la amplificación del gen parcial de VP4.



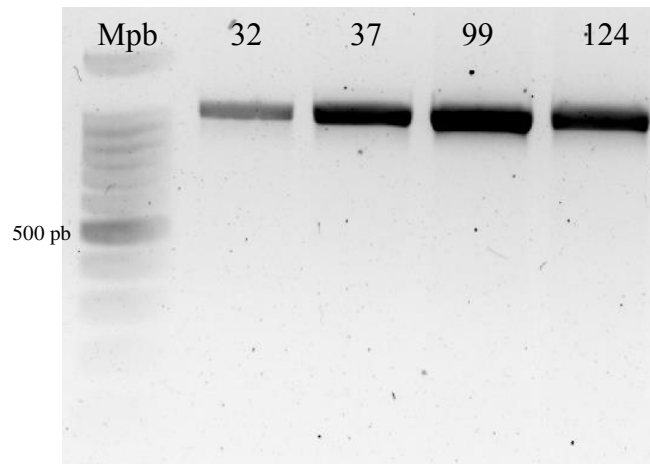


Figura 8. Amplificación del gen que codifica para el gen completo de VP7 (1062 pb), carril 1: Marcador de pares de bases; carril 2-5 muestras que resultaron positivas para rotavirus.

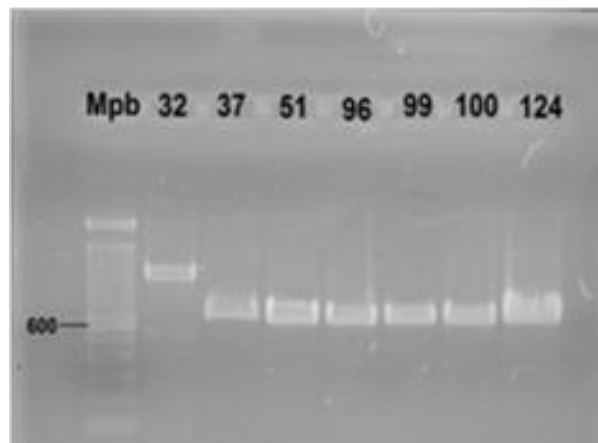


Figura 9. Amplificación del gen que codifica para VP4, carril 1: Marcador de pares de bases; carril 2: Amplificación del segmento de 1084 pb, carril 3-8: Amplificación del segmento de 664 pb.

Posteriormente, el producto de PCR que amplificó para el gen de VP7 y VP4 de rotavirus fue secuenciado por el método de Sanger. El análisis de secuencia reveló la presencia de rotavirus genotipo G12P [8] en 4 (22.2%) de las muestras, G12P[no genotificado] en 3 (16.6%) y G-no genotificadoP[8] en 2 (11.1%) de las muestras positivas para rotavirus. Las muestras secuenciadas se subieron a la página del Centro Nacional de Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés NCBI) y quedaron registradas con los siguientes códigos de acceso: SONMX-32 (KP119464), SONMX-37 (KP119465), SONMX-38 (KT852964), SONMX-51 (KT852965), SONMX-99 (KP119466), SONMX-124 (KP119467).

Por otra parte, el análisis de secuencia del gen de VP7 genotipo G12 reportado en este estudio mostró una identidad de secuencia de 98-99% de cepas de rotavirus G12 reportadas en Kenya (AB861961), India (EU016453), y Sri Lanka (AB306268) (Ahmed *et al.*, 2010; Komoto *et al.*, 2014). El análisis filogenético del gen VP7 mostró que el genotipo G12 se agrupa en el linaje III, mismo linaje en que se encuentran las muestras reportadas en este trabajo (Fig. 10). El genotipo G12 se reportó por vez primera en 1987, y no fue hasta 1998 cuando se volvió a reportar (Rahman *et al.*, 2007). Sin embargo, en la última década a nivel mundial, G12 es considerada como cepa emergente y es un motivo de preocupación, ya que se ha convertido en el sexto genotipo más frecuente (Mijatovic-Rustempasic *et al.*, 2014; Ide *et al.*, 2015).

El análisis de secuencia de la región VP8\* de la proteína VP4 demostró una identidad de 99% con cepas de rotavirus de Kenya (AB861959), Uganda (KJ753730), Sur Africa (KJ752364) y Buthan (AB905370). Por su parte el análisis filogenético de VP4 reveló la presencia de diferentes linajes del genotipo P [8] (Fig. 11). Las cepas aisladas en el presente estudio se agruparon en el linaje V, mientras que otras secuencias reportadas previamente en México (aisladas en 2005, 2007 y 2008) se agruparon en diferentes linajes.

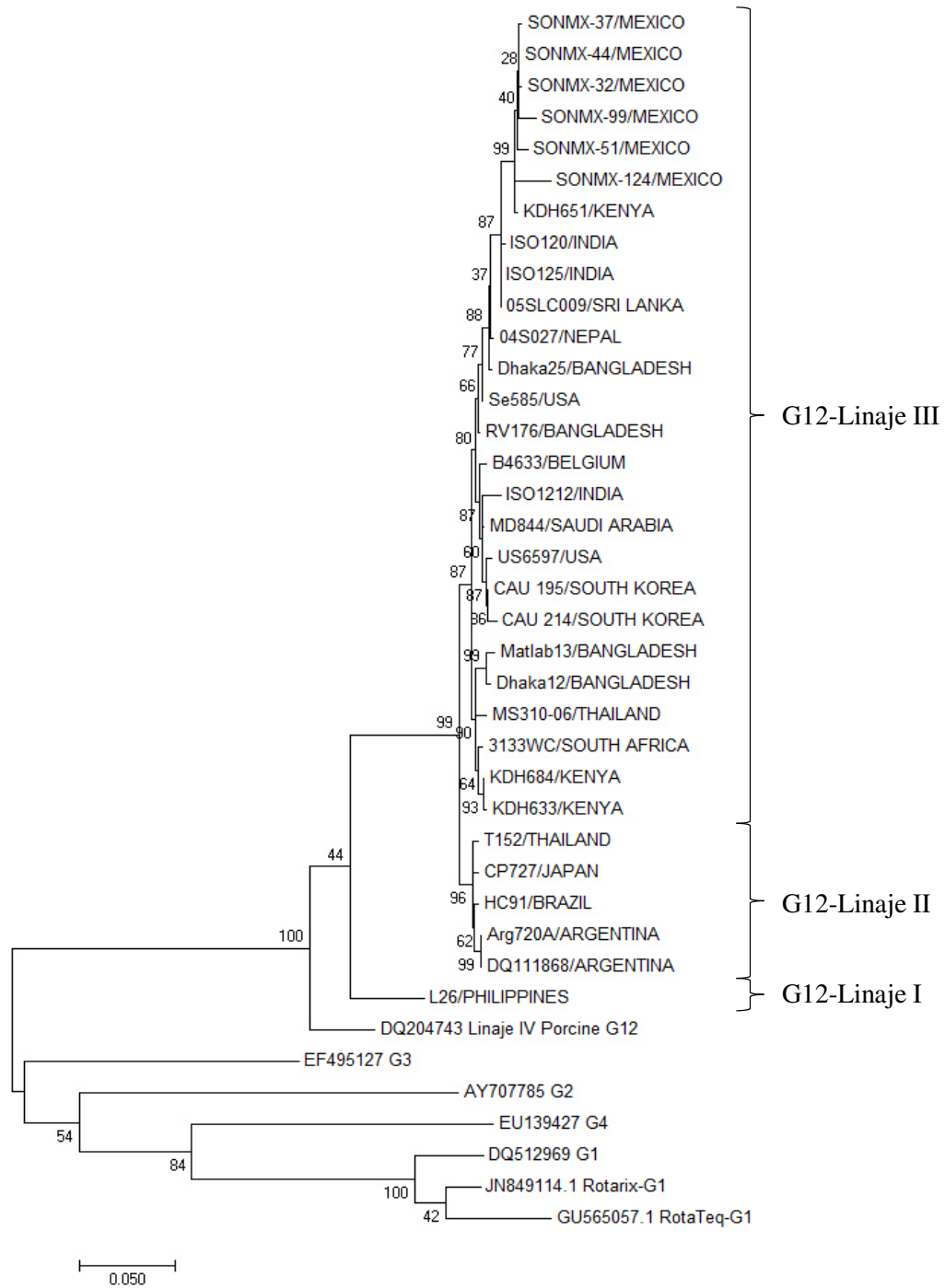


Figura 10. Análisis filogenético del gen VP7 de genotipo G12. Análisis filogenético de la secuencia de nucleótido del gen VP7 de cepas de rotavirus genotipo G12 reportadas en este estudio (SONMX-32, SONMX-37, SONMX-38, SONMX-62, SONMX-99, SONMX-124), junto con cepas de referencia descargados desde la base de datos GenBank (Anexo 1). El árbol filogenético se construyó con base al método de *-Maximum Likelihood* con base al modelo Tamura-Nei (1993). El valor estadístico se determinó mediante el método bootstrap (1000 repeticiones).

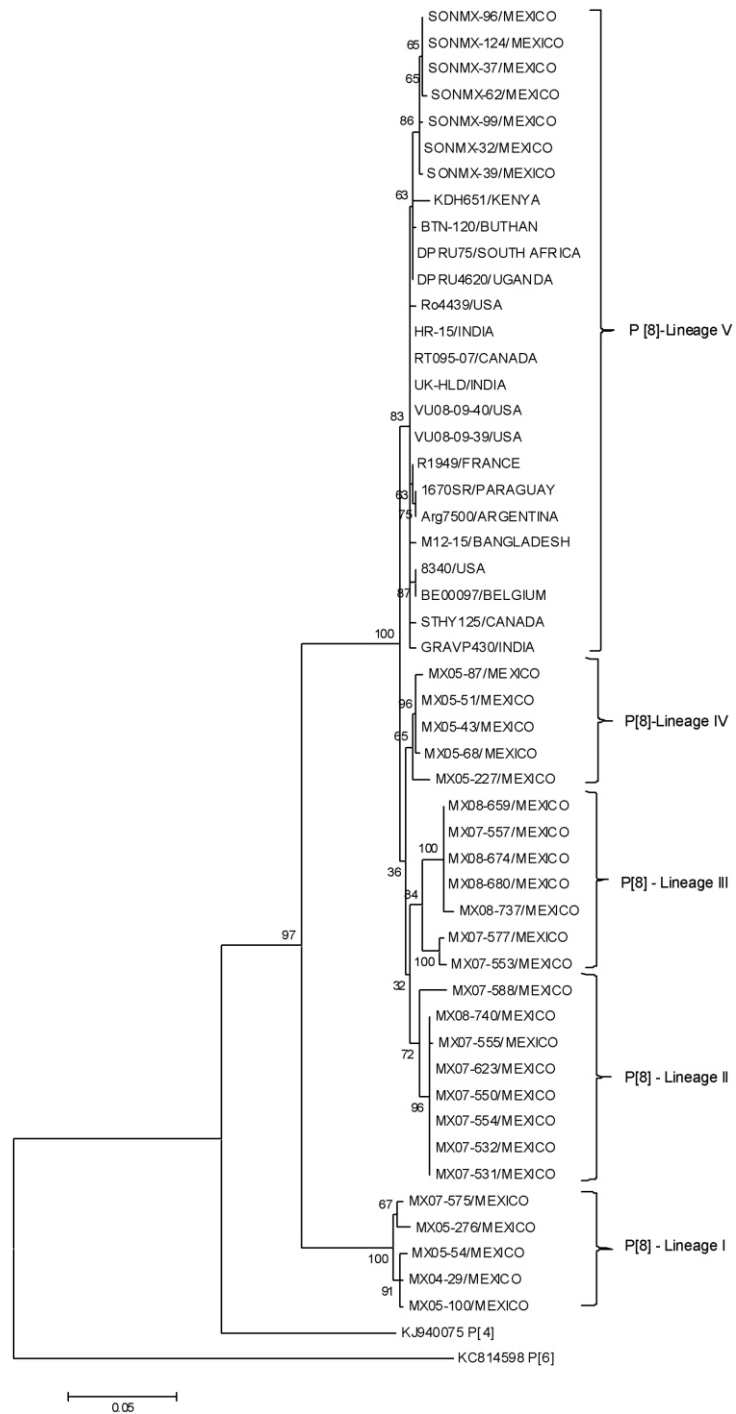


Figura 11. Análisis filogenético del gen VP4 de genotipo P [8]. Análisis filogenético de la secuencia de nucleótido del gen VP4 de cepas de rotavirus genotipo P [8] reportadas en este estudio (SONMX-32, SONMX-37, SONMX-38, SONMX-62, SONMX-99, SONMX-124), junto con cepas de referencia descargados desde la base de datos GenBank. El árbol filogenético se construyó en base al método de *Maximum Likelihood* con base al modelo Tamura-Nei (1993). El valor estadístico se determinó mediante el método bootstrap (1000 repeticiones).

## 7.4 Amplificación del gen de la cápside de Norovirus

Para determinar la presencia de los genotipos G1 y G2 de norovirus, se llevó a cabo una RT-PCR con el propósito de amplificar la región de la cápside, para ello se utilizaron 4 pares de oligonucleótidos dos de ellos en sentido y uno antisentido, esto para cada uno de los genotipos respectivamente. De las 179 muestras analizadas, 8 fueron positivas a norovirus, donde 2 muestras (25%) amplificaron un segmento de 380 pb con los primers COG1F/ G1SKR correspondiente al genogrupo GI (Fig. 12a) y 6 muestras (75%) amplificaron un segmento de 340 pb con los primers G2SKF/G2SKR correspondiente al genotipo G2 (Fig. 12b). De igual manera, se observó una co-infección de norovirus con astrovirus en una de las muestras analizadas.

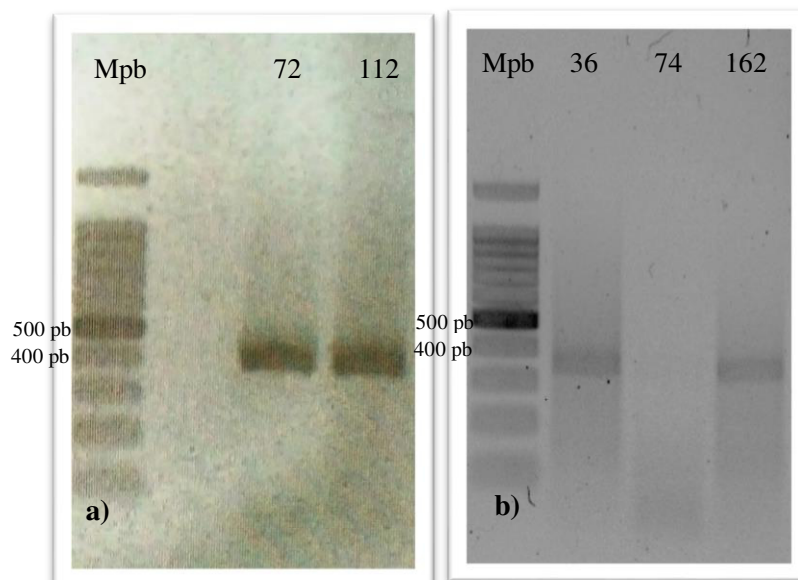


Figura 12. a) Amplificación del segmento de 380 pb correspondiente al genogrupo GI de norovirus. b) Amplificación del segmento de 340 pb correspondiente al genogrupo GII de norovirus.

Posteriormente, el producto de PCR que amplificó para el gen de la cápside de norovirus fue secuenciado por el método de Sanger. En el análisis de secuencias de una de las cepas de norovirus genogrupo GI se observó una homología del 98% con cepas de

norovirus GI.8 (Anexo 1). Por su parte, el análisis de dos de las cepas de norovirus GII reveló una homología de 98-99% con cepas GII.4 (Anexo 2).

El análisis filogenético de las secuencias de los genes de norovirus detectadas en este estudio, indicaron que las secuencias correspondientes al genogrupo GI.8 se ubicaron en el mismo grupo de cepas detectadas en Estados Unidos, Brazil y Japón (Fig. 13). Por su parte, las cepas genogrupo GII.4 detectadas en este estudio, se relacionaron con el cluster correspondiente a cepas de norovirus GII.4 de variante antigénica Sydney2012 (Fig. 14).

Los genogrupos de norovirus que se han reportado previamente en México son GI.1, GI.3, GI.5, GI.14, GII.1, GII.2, GII.4, GII.7 y GII.17 (da Silva Poló, 2016). En el presente estudio se detectaron los genogrupos GI.8 y GII.4 de norovirus como causantes de gastroenteritis en niños. El genogrupo GII.4 se relacionó con cepas Sydney 2012, esta cepa es una de las variantes de GII.4 más reportadas a nivel mundial relacionada con brotes agudos de gastroenteritis. Así mismo, las cepas GII.4 se han asociado a la transmisión de persona a persona; mientras que el genogrupo GI.8, que es un genotipo que no se ha reportado previamente en México, se asocia a infecciones adquiridas por consumir alimentos (mariscos) contaminados con norovirus; aunque las cepas GI se detectan con menos frecuencia presentan una amplia diversidad genética en América Latina (Atmar, 2010; da Silva Poló, 2016).

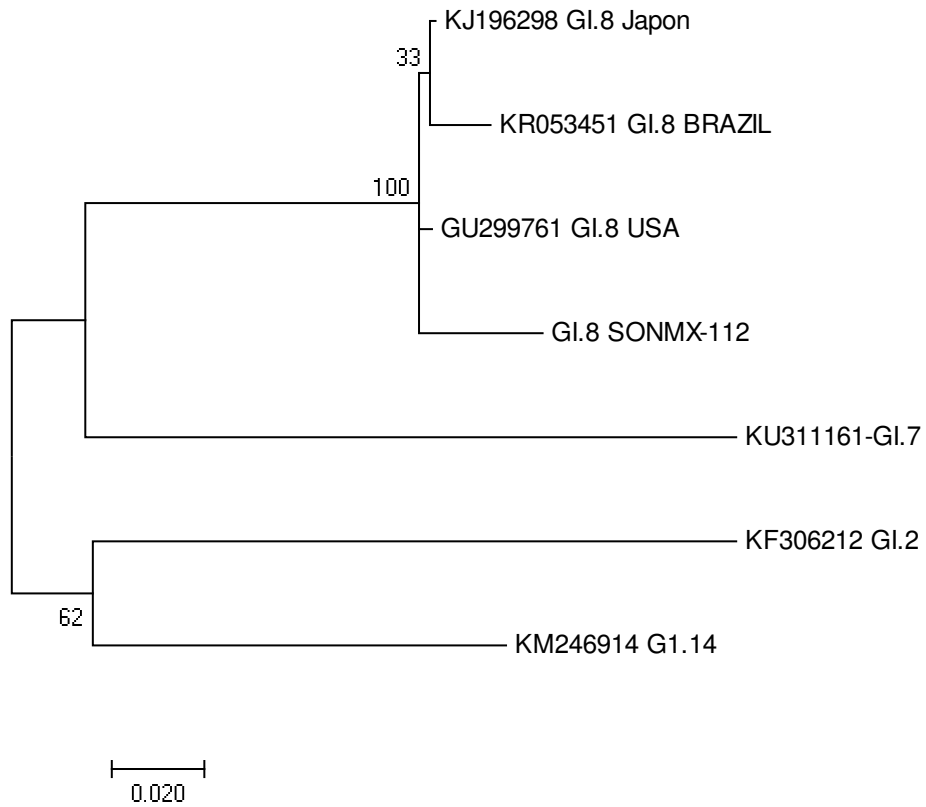


Figura 13. Análisis filogenético del genogrupo GI.8 de norovirus detectado (SONMX-112) en este estudio, comparado con secuencias previamente reportadas en el GenBank. Se utilizó el método Maximum likelihood con base al modelo Tamura-Nei (1993).

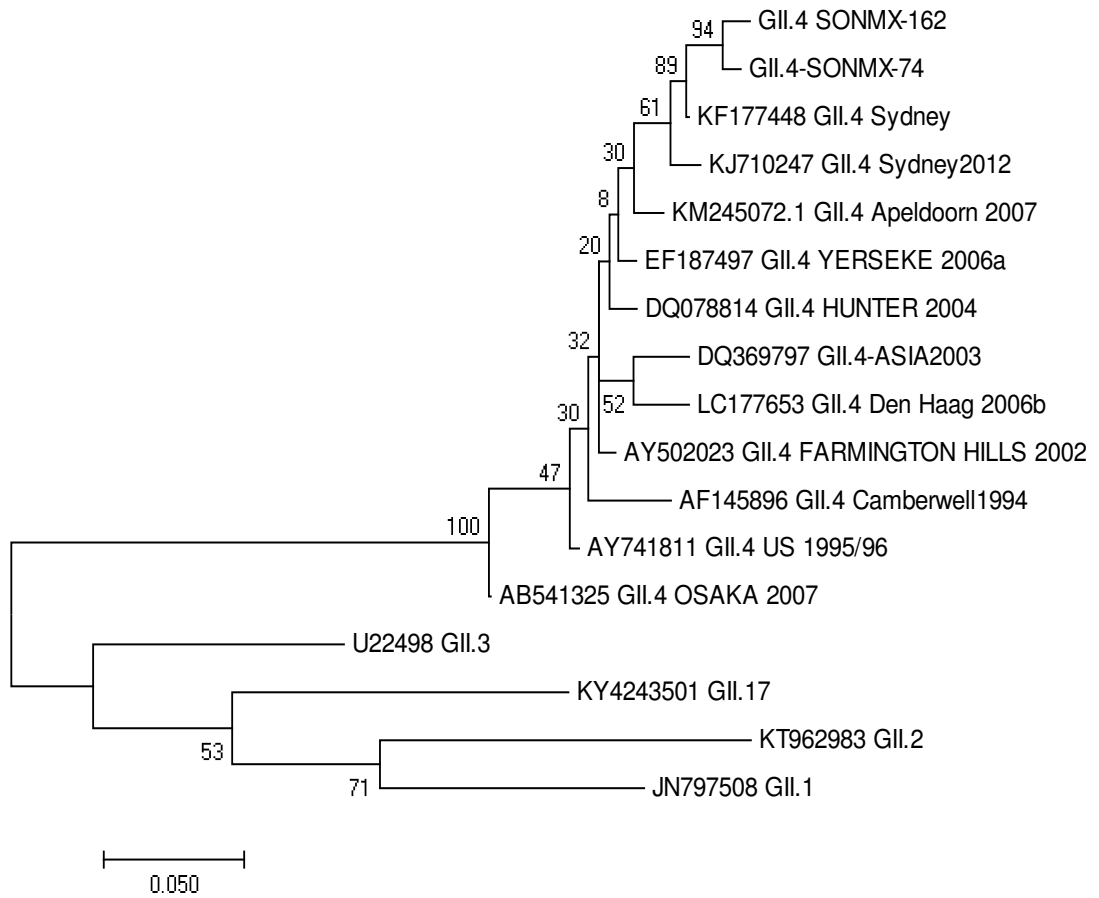


Figura 14. Análisis filogenético del genogrupo GII.4 de norovirus detectados (SONMX-74 y SONMX-162) en este estudio, comparado con secuencias previamente reportadas en el GenBank. Se utilizó el método *Maximum likelihood* con base al modelo Tamura-Nei (1993).



## 7.5 Amplificación del gen de la cápside de Sapovirus

La presencia de sapovirus fue determinada utilizando los oligonucleótidos SLV5749/SLV5317 que amplifican la región de la cápside (Fig. 17), el análisis de las 179 muestras indicó la presencia de sapovirus en 6 (3.3%) de las muestras.

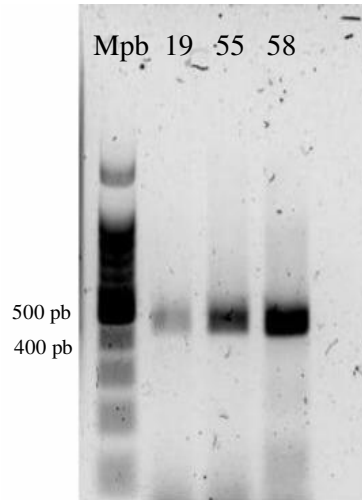


Figura 15. Amplificación del gen de la cápside de sapovirus, carril 1: Marcador de pares de bases; carril 2, 3 y 4 amplificaciones del segmento de la cápside (434 pb).

Posteriormente, el producto de PCR que amplificó para el gen de la cápside de sapovirus fue secuenciado por el método de Sanger. En el análisis de secuencias de una de las cepas de sapovirus genogrupo GI, se observó una homología del 98% con cepas de sapovirus GI. I (Anexo 3). Por su parte, el análisis de otra de las cepas de sapovirus reveló una homología de 97% con cepas GII.I (Anexo 4).

El análisis filogenético de las secuencias de los genes de sapovirus detectados en este estudio, indicaron que las secuencias correspondientes al genogrupo GI. I se ubicaron en el mismo grupo de cepas reportadas en Venezuela y Japón (Fig. 16). Por su parte, las cepas genogrupo GII.I detectadas en este estudio, se relacionaron con el *cluster* correspondiente a cepas de sapovirus GII.I reportadas en India, Filipinas y Japón (Fig. 17).

El genogrupo de mayor prevalencia es GGI, y el genotipo GGI/1 es asociado a diarreas agudas en países como México, Tailandia, Japón y Pakistán (Sdiri-Loulizi *et al.*, 2011). Aunque algunos estudios demuestran que las cepas GI. I y GI.2 de sapovirus son los principales genotipos asociados con brotes esporádicos de gastroenteritis (Fioretti *et al.*, 2016). Estudios realizados en China y Japón demuestran que GI.1 es la cepa predominante de sapovirus y seguida de esta se encuentran las cepas GI.2, GIV, GI.4, GI.8, GI. 6 y GII.I (Ren *et al.*, 2013; Thongprachum *et al.*, 2016). Por otra parte, estudios llevados a cabo en muestras de heces y aguas residuales en Brasil, revelaron la presencia de los genotipos GI.1, GI.2, GI.6, GII.1 y GV.1. En México en 2004 se identificaron cepas de sapovirus GII.2 y GI.3 (Farkas *et al.*, 2004). En este estudio se detectaron cepas GI.I y cepas GII.I, esta última no se había reportado previamente en nuestro país.

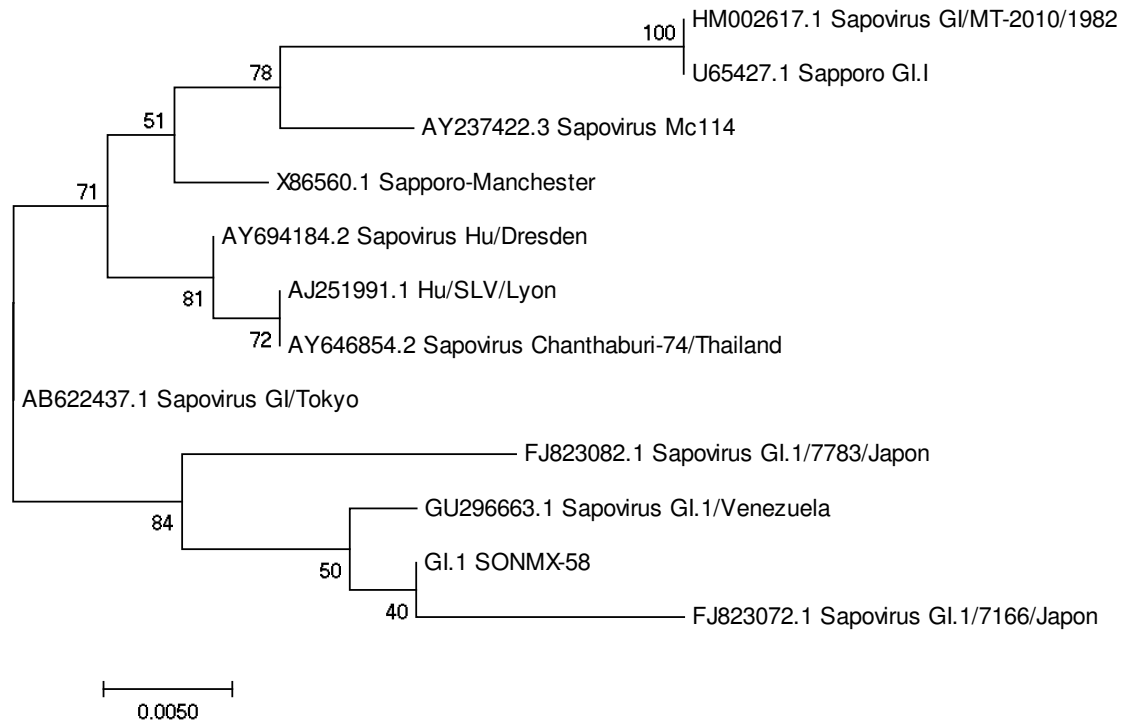


Figura 16. Análisis filogenético del genogrupo GI. I de sapovirus detectado en este estudio (SONMX-58), comparado con y secuencias previamente reportadas en el GenBank. Se utilizó el método *Maximum likelihood* con base al modelo Tamura-Nei (1993).

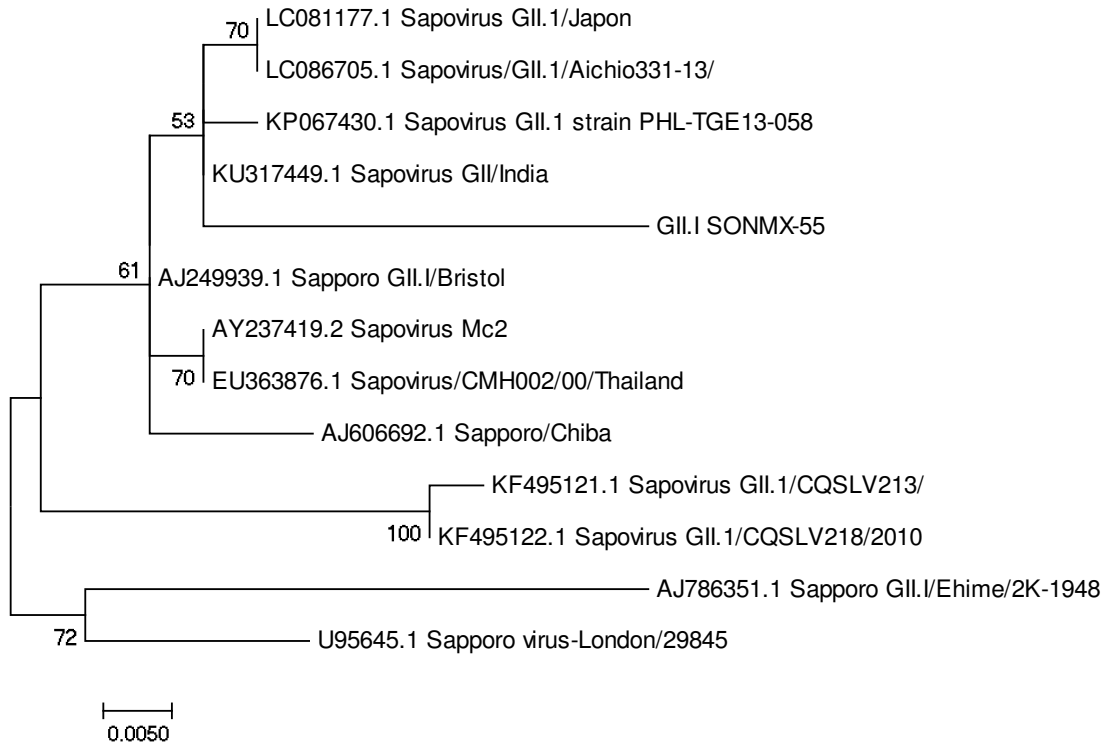


Figura 17. Análisis filogenético del genogrupo GII.I de sapovirus detectado en este estudio (SONMX-55), comparado con secuencias previamente reportadas en el GenBank. Se utilizó el método *Maximum likelihood* con base al modelo Tamura-Nei (1993).

## 7.6 Amplificación del gen hexón de Adenovirus

Las dos muestras positivas de adenovirus identificadas con las pruebas rápidas, fueron analizadas por PCR bajo las condiciones antes mencionadas, utilizando el juego de oligonucleótidos Ad1/Ad2 los cuales amplifican el gen del hexón, sólo una de las muestras amplificó el segmento de 482 pb (Fig. 18).

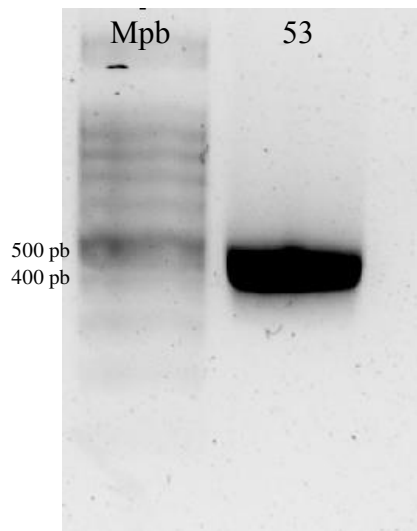


Figura 18. Amplificación del gen hexón de adenovirus carril 1: Marcador de pares de bases; carril 2 amplificaciones del segmento hexón (482 pb).

Una vez amplificado el segmento de interés, se procedió a purificar el producto de PCR, el cual fue secuenciado por el método de Sanger. En el análisis de secuencias de la muestra de adenovirus reveló una homología del 99% con adenovirus humano sub-género C tipo 6 (Anexo 5).

Por su parte, el análisis filogenético de las secuencias de los genes de adenovirus detectado en este estudio, indicó que las secuencias correspondientes sub-género C, se ubicaron en el mismo grupo de cepas reportadas en Japón, Estados Unidos, Argentina, China y Okinawa (Fig. 19).

Los adenovirus del sub-grupo, especies 40 y 41, así como el genogrupo A (particularmente serotipo 31), son los que se asocian principalmente con gastroenteritis

en niños; sin embargo, otros genogrupos como son, el genogrupo C, D y G han sido asociados con diarrea (Jones *et al.*, 2007; Ghebremedhin, 2014; Lu *et al.*, 2014; La Rosa *et al.*, 2015).

Cabe mencionar que el subgrupo C, comúnmente se encuentra más asociado con infecciones del tracto respiratorio, sin embargo, esta especie no entérica de HAdV, ha sido asociada con adenitis mesentérica, la cual puede imitar una apendicitis y ocasionalmente causar intususcepción en los lactantes y niños pequeños (Ghebremedhin, 2014; Lu *et al.*, 2014). Como muestra un estudio realizado en Tailandia, en el cual se determinó que la infección por HAdV-C era mayor en los niños con intususcepción en comparación con aquellos con gastroenteritis aguda (Ukarapol *et al.*, 2016).

Por tal motivo es importante continuar con los estudios genómicos, puesto que son importantes para la comprensión y evolución molecular entre los genotipos de HAdVs.

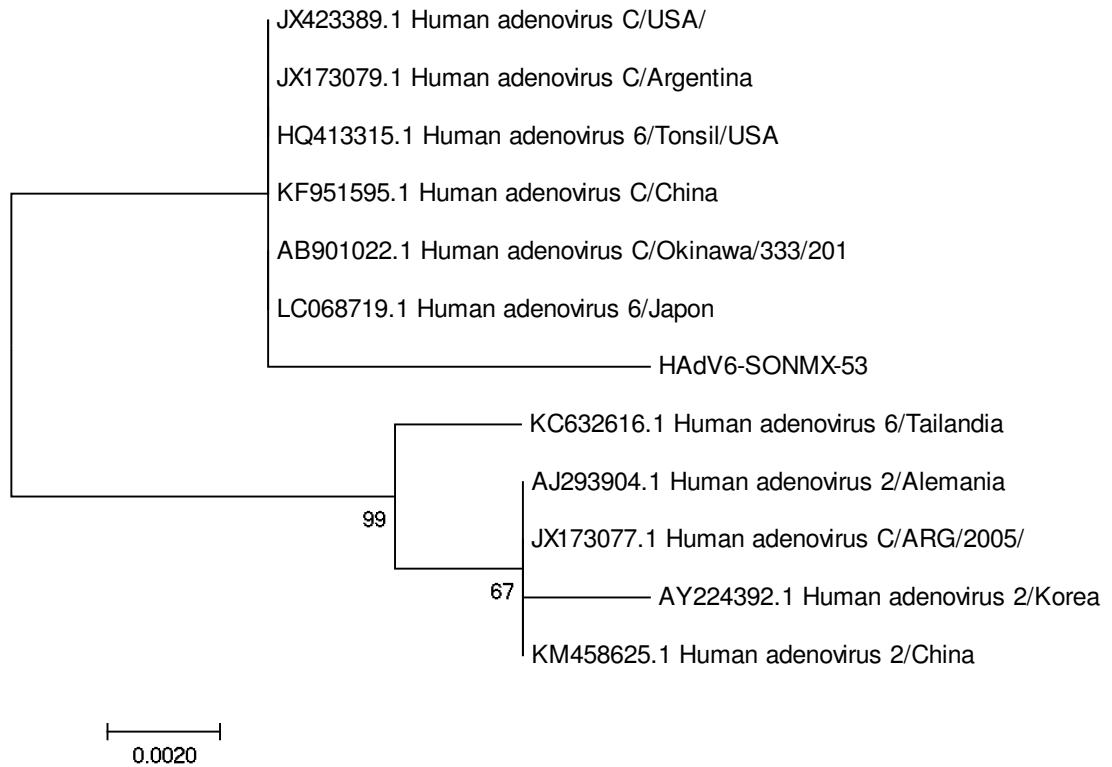


Figura 19. Análisis filogenético del Sub-género C tipo 6 de adenovirus detectado en este estudio (SONMX-53), comparado con secuencias previamente reportadas en el GenBank. Se utilizó el método *Maximum likelihood* con base al modelo Tamura-Nei (1993).

## 7.7 Amplificación de la región conservada ORF1b de Astrovirus

Utilizando los oligonucleótidos SF0073/SF0076 y Mon269/Mon270, los cuales amplifican la región de la polimerasa (ORF1b) y la región de la cápside (ORF2) respectivamente, por medio de RT-PCR se analizaron las 179 muestras, donde los resultados mostraron la presencia de 6 muestras positivas (3.3%) para astrovirus (Fig. 20). También se observó la co-infección de astrovirus con rotavirus, en una de las muestras analizadas.

Posteriormente, el producto de PCR que amplificó tanto para el gen de la polimerasa, como para el gen de la cápside, fue secuenciado por el método de Sanger. En el análisis de secuencias de una de las cepas de astrovirus, se observó una homología del 99% con cepas de astrovirus serotipo 6 (Anexo 6). Mientras que el análisis de las otras dos cepas de astrovirus, tanto la que amplificó el ORF2 (Anexo 7) como la que amplificó el ORF1b (Anexo 8), revelaron una homología de 98-99% con cepas de astrovirus clásico 2.

El análisis filogenético de las secuencias de los genes de astrovirus clásico detectados en este estudio, indicaron que la secuencia correspondiente al serotipo 6 se ubicó en el mismo grupo de cepas reportadas en Bangladesh, Tailandia y Rusia (Fig. 21). Por otra parte, las cepas del serotipo 2 detectadas en este estudio se relacionaron con la cepa ITA/2009/PR5142 (JX087964) aislada en Italia (Fig. 22; Fig. 23).

Los astrovirus humanos han ido ganando importancia como agentes causantes de gastroenteritis en niños menores de dos años; la cepa de mayor prevalencia en México es HAstV-2 con un 42%, mientras que, a nivel mundial, la cepa de mayor circulación es HAstV-1. Por su parte, los genotipos 6 y 7 son menos comunes, en México la prevalencia de las cepas HAstV 5 y 7 ocupan el 6% de prevalencia (Jeong *et al.*, 2012; Krishnan, 2014). HAstV-6 se ha identificado como causante de brotes esporádicos de gastroenteritis aguda a nivel mundial (Guo *et al.*, 2010).



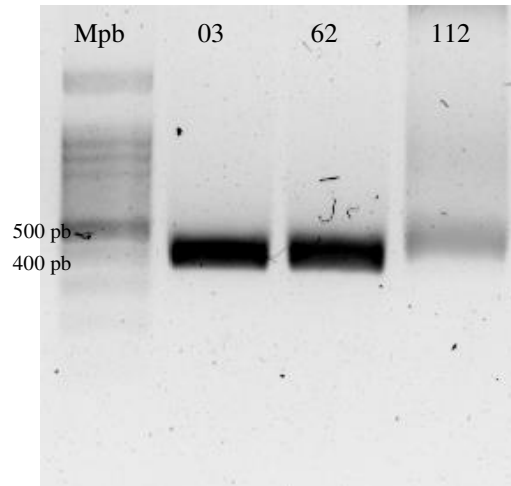


Figura 20. Amplificación del gen de la polimerasa (ORF1b) de astrovirus; carril 1: Marcador de pares de bases; carril 2, 3 y 4 amplificaciones del segmento de la polimerasa (409 pb).

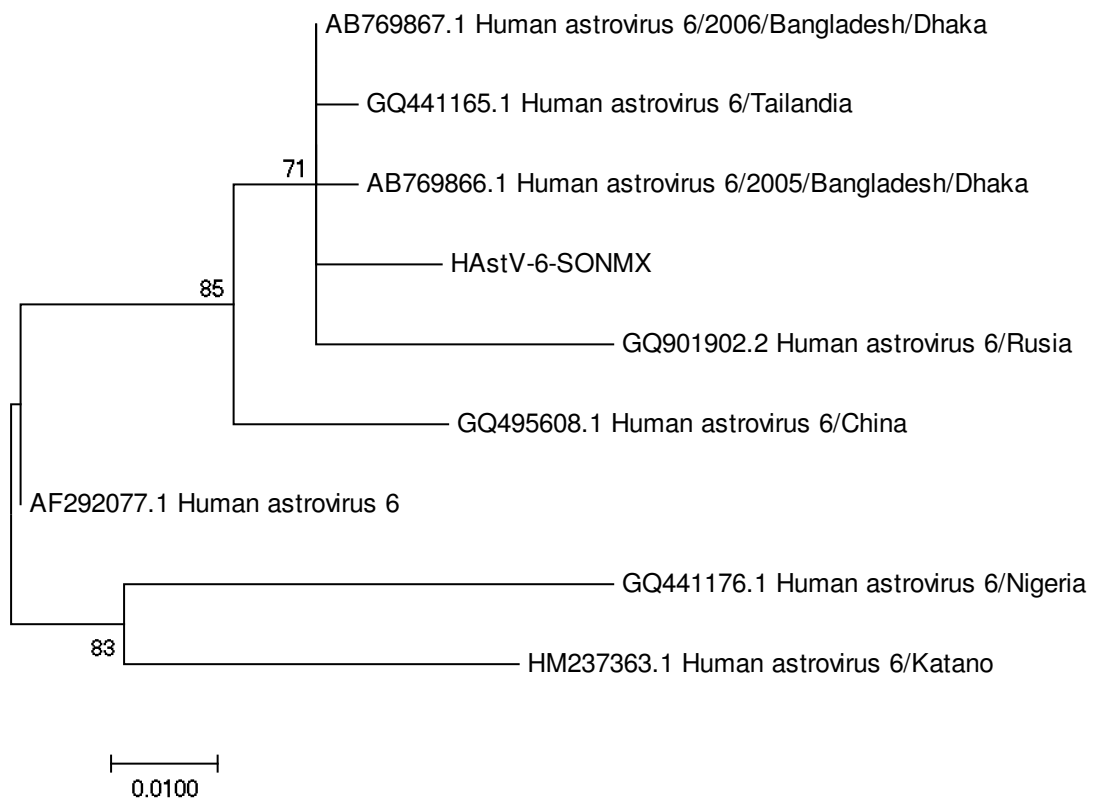


Figura 21. Análisis filogenético de astrovirus clásico serotipo 6 detectado en este estudio (SON-MX), comparado con secuencias previamente reportadas en el GenBank. Se utilizó el método *Maximum likelihood* con base al modelo Tamura-Nei (1993).

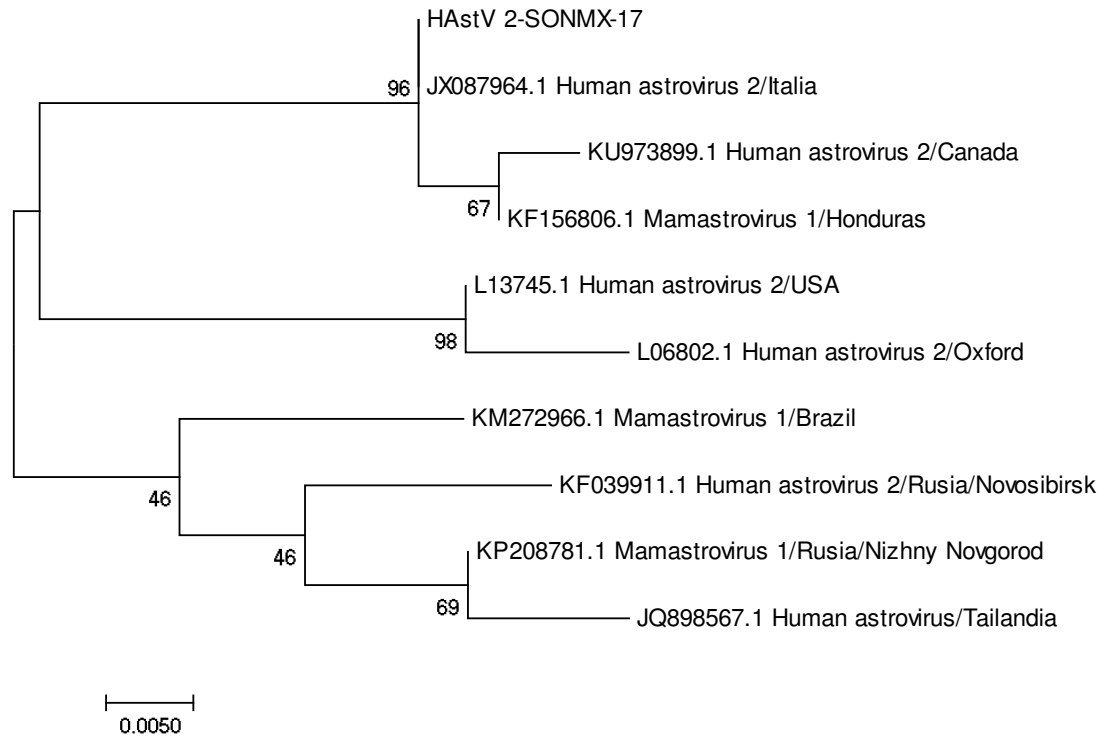


Figura 22. Análisis filogenético de astrovirus clásico serotipo 2 (ORF2) detectado en este estudio (SONMX-17), comparado con secuencias previamente reportadas en el GenBank. Se utilizó el método *Maximum likelihood* con base al modelo Tamura-Nei (1993).

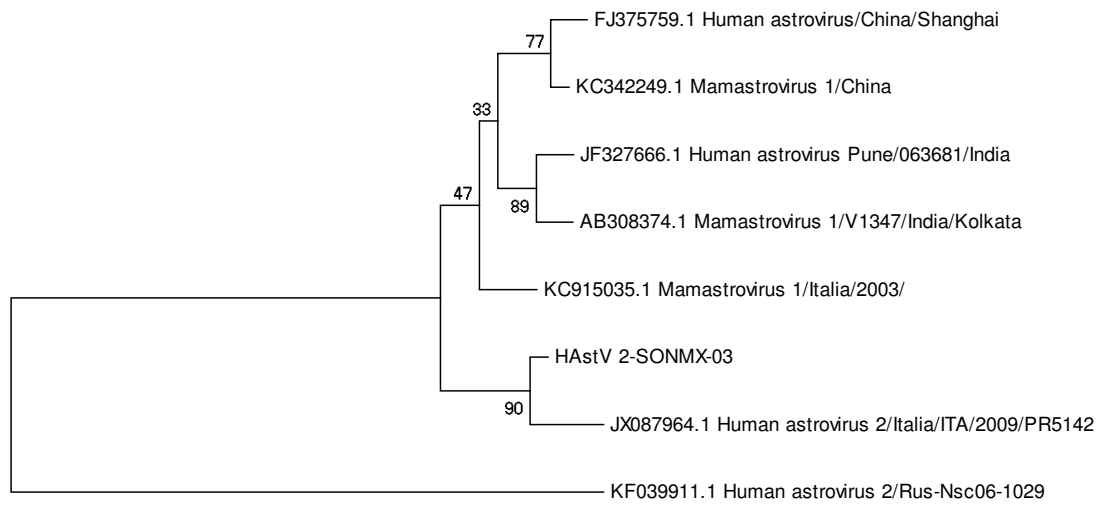


Figura 23. Análisis filogenético de astrovirus clásico serotipo 2 (ORF1b) detectado en este estudio (SONMX-03), comparado con secuencias de referencia reportadas previamente en el GenBank. Se utilizó el método *Maximum likelihood* con base al modelo Tamura-Nei (1993).

## 8. CONCLUSIÓN

El análisis de las 179 muestras, mostró la presencia de cepas emergentes de rotavirus G12 por primera vez en México.

La incidencia de astrovirus en los casos de niños con gastroenteritis fue del 3.3%, el análisis de secuencia reveló la presencia de HAstV-6, el cual es uno de los genotipos menos reportados, por lo que se considera un genotipo emergente asociado a gastroenteritis aguda en niños

Se detectó la presencia de norovirus en un 4.4% de las muestras analizadas, donde el análisis de genotipos demostró la presencia de la cepa GI.8 de norovirus, relacionada con casos esporádicos de gastroenteritis, la cual no había sido reportada anteriormente en México.

Se identificaron Sapovirus en 3.3% de las muestras y fue posible caracterizar la cepa GII.1, la cual es poco común. El análisis de secuencias de adenovirus mostró la presencia del sub-género C tipo 6, asociado a casos esporádicos de gastroenteritis.

## **9. PERSPECTIVAS**

La detección de cepas emergentes de virus causantes de gastroenteritis deja en claro la necesidad de realizar más estudios de monitoreo epidemiológico y su caracterización molecular, cuyos resultados podrán contribuir con el planteamiento de nuevas estrategias preventivas de enfermedades gastrointestinales de origen viral en México.

## 10.LITERATURA CITADA

- Ahmed K, Batuwanthudawe R, Chandrasena TN, Mitui MT, Rajindrajith S, Galagoda G, Abeysinghe N. 2010. Rotavirus infections with multiple emerging genotypes in Sri Lanka. *Archives of virology*, 155(1), 71-75.
- Akhtar J, Qadri SMH, Myint SH. 1995. Gastrointestinal adenovirus infections in a tertiary referral centre in Saudi Arabia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14(8), 707-710.
- Alam MM, Khurshid A, Shaukat S, Suleman RM, Sharif S, Angez M, Zaidi SS. 2013. Epidemiology and genetic diversity of rotavirus strains in children with acute gastroenteritis in Lahore, Pakistan. *PloS one*, 8(6), e67998.
- Albinsson B, Kidd AH. 1999. Adenovirus type 41 lacks an RGD  $\alpha$  v-integrin binding motif on the penton base and undergoes delayed uptake in A549 cells. *Virus research*, 64(2), 125-136.
- Arista S, Vizzi E, Ferraro D, Cascio A, Stefano R. 1997. Distribution of VP7 serotypes and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from Italian children with diarrhea. *Archives of virology* 142:2065-2071.
- Argüelles M, Villegas G, Castello A, Abrami A, Ghiringhelli P, Semorille L, Glikmann G. 2000. VP7 and VP4 of human group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina. *Journal of clinical microbiology* 38:252-259.
- Atmar RL, Estes MK. 2006. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterology Clinics of North America*, 35(2), 275-290.
- Atmar RL. 2010. Noroviruses: state of the art. *Food and environmental virology*, 2(3), 117-126.
- Atmar RL, Neill FH, Le Guyader FS. 2011. Detection of human Caliciviruses in fecal samples by RT-PCR. In: *Diagnostic Virology Protocols* (pp. 39-50). Humana Press. Totowa, NJ, USA.

- Bernstein DI. 2009. Rotavirus overview. *The Pediatric infectious disease journal*, 28(3), S50-S53.
- Bosch A, Pintó RM, Guix S. 2014. Human astroviruses. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), 1048-1074.
- Buesa J, Rodríguez-Díaz J. 2016. *The Molecular Virology of Enteric Viruses*. In *Viruses in Foods* (pp. 59-130). Springer International Publishing.
- Bull RA, Tanaka M M, White PA. 2007. Norovirus recombination. *Journal of General Virology*, 88(12), 3347-3359.
- Chan MC, Leung TF, Chung TW, Kwok AK, Nelson EAS, Lee N, Chan PK. 2015. Virus genotype distribution and virus burden in children and adults hospitalized for norovirus gastroenteritis, 2012–2014, Hong Kong. *Scientific reports*, 5.
- Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshita K, Honma S. 2000. Sapporo virus: history and recent findings. *Journal of Infectious Diseases*, 181(Supplement 2), S303-S308.
- Costa-Amaral MS, Estevam GK, Penatti M, Lafontaine R, Lima ICG, Spada PKP, Matos NB. 2015. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.
- Cusack S. 2005. Adenovirus complex structures. *Current opinion in structural biology*, 15(2), 237-243.
- da Silva Poló T, Peiró JR, Mendes LCN, Ludwig LF, de Oliveira-Filho EF, Bucardo F, Mauroy A. 2016. Human norovirus infection in Latin America. *Journal of Clinical Virology*, 78, 111-119.
- de Graaf M, van Beek J, Koopmans MP. 2016. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews Microbiology*, 14(7), 421-433.
- Dennehy PH. 2008. Rotavirus vaccines: an overview. *Clinical microbiology reviews*, 21(1), 198-208.

- Desselberger U, Manktelow E, Li W, Cheung W, Iturriza-Gómara M, Gray J. 2009. Rotaviruses and rotavirus vaccines. *British medical bulletin*.
- Desselberger U. 2014. Rotaviruses. *Virus research*, 190, 75-96
- Diggle L. 2007. Rotavirus diarrhoea and future prospects for prevention. *British Journal of Nursing*, 16(16).
- Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. 2008. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunological reviews*, 225(1), 190-211.
- Dos Anjos K, Lima LM, Silva PA, Inoue-Nagata AK, Nagata T. 2011. The possible molecular evolution of sapoviruses by inter-and intra-genogroup recombination. *Archives of virology*, 156(11), 1953-1959.
- Ebner K, Pinsker W, Lion T. 2005. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *Journal of virology*, 79(20), 12635-12642.
- Elliott EJ. 2007. Acute gastroenteritis in children. *BMJ: British Medical Journal*, 334(7583), 35.
- Esparza-Aguilar M, Bautista-Márquez A, González-Andrade MDC, & Richardson López-Collada VL. 2009. Mortalidad por enfermedad diarreica en menores, antes y después de la introducción de la vacuna contra el rotavirus. *Rev. Salud Pública de México*. 51(4), 285-290.
- Estes MK, Cohen J. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiological review* 53:410-49.
- Estes M. 2001. Rotaviruses and their replication. En: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Strais (ed.). *Fields virology*. 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. pp. 1747–1785.



- Estes MK, Kang G, Zeng CQY, Crawford SE, Ciarlet M. 2001. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. In Novartis Foundation Symposium (pp. 82-100). Chichester; New York; John Wiley; 1999.
- Farkas T, Zhong WM, Jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martinez N, Jiang, X. 2004. Genetic diversity among sapoviruses. Archives of virology 149, 1309-1323.
- Farkas T, Jiang X, Guerrero ML, ZhongW, Wilton N, BerkeT, Matson DO, Pickering LK, Ruiz-Palacios G. 2000. Prevalence and genetic diversity of human caliciviruses (HuCVs) in Mexican children. J Med Virol 62: 217–223
- Favier AL, Schoehn G, Jaquinod M, Harsi C, Chroboczek J. 2002. Structural studies of human enteric adenovirus type 41. Virology, 293(1), 75-85.
- Fernández JMR, Gómez JB. 2010. Infecciones por norovirus. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 28, 51-55.
- Finkbeiner SR, Holtz LR, Jiang Y, Rajendran P, Franz CJ, Zhao G, Wang D. 2009. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel Astroviruses. Virol. J. 6, 161.
- Fioretti JM, Rocha MS, Fumian TM, Ginuino A, Silva TD, Assis MR, Miagostovich MP. 2016. Occurrence of human sapoviruses in wastewater and stool samples in Rio De Janeiro, Brazil. Journal of applied microbiology, 121(3), 855-862.
- Gabbay YB, da Luz CRN, Costa IV, Cavalcante-Pepino EL, Sousa MS, Oliveira KK, Linhares AC. 2005. Prevalence and genetic diversity of astroviruses in children with and without diarrhea in São Luís, Maranhão, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100(7), 709-714.
- Gentsch J, Glass R, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das B, Bhan M. 1992. Identification of group rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology. 30:1365–1373.
- Ghebremedhin B. 2014. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. European Journal of Microbiology and Immunology, 4(1), 26-33.

- Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, Gentsch JR. 2006. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *The Lancet*, 368(9532), 323-332
- Gonçalves MA, de Vries AA. 2006. Adenovirus: from foe to friend. *Reviews in medical virology*, 16(3), 167-186.
- Gouvea V, Glass R, Woods P, Taniguchi K, Clark H, Forrester B, Fang Z. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 28:276–282.
- Guo L, Gonzalez R, Wang W, Li Y, Paranhos-Baccalà G, Vernet G, Wang J. 2010. Complete genome sequence of human astrovirus genotype 6. *Virology journal*, 7(1), 29.
- Green KY, 2013. Caliciviridae: the noroviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Cohen, J.I., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Racaniello, V.R., Roizman, B. (Eds.), *Fields Virology*, sixth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 582–608.
- Greenberg HB, Estes MK. 2009. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*, 136(6), 1939-1951.
- Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N, Pintó RM. 2002. Molecular epidemiology of Astrovirus infection in Barcelona, Spain. *Journal of clinical Microbiology*. 40: 133-139.
- Hage E, Liebert UG, Bergs S, Ganzenmueller T, Heim A. 2015. Human mastadenovirus type 70: a novel, multiple recombinant species D mastadenovirus isolated from diarrhoeal faeces of a haematopoietic stem cell transplantation recipient. *Journal of General Virology*, 96(9), 2734-2742.
- Hall AJ, Lopman BA, Vinjé J. 2013. *Foodborne Infections and Intoxications: Chapter 22. Sapovirus*. Elsevier Inc. Chapters.

- Hansman GS, Takeda N, Oka T, Oseto M, Hedlund KO, Katayama K. 2005. Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerging infectious diseases*, 11(12), 1916.
- Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N. 2007. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Reviews in medical virology*, 17(2), 133-141.
- Harrach B, Benkő M, Both GW, Brown M, Davison AJ, Echavarría M, Wadell G. 2011. Family Adenoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (Eds.), *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego pp 125-141.
- Hernández CC, Aguilera AMG, Castro EG. 2011 Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 31(4), 137.
- Hoshino Y, Kapikian AZ. 2000. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 5-14.
- Hostetler MA. 2004. Gastroenteritis: An Evidence-Based Approach to Typical Vomiting, Diarrhea and Dehydration. *Pediatric Emergency Medicine Practice*: 1-17.
- Ide T, Komoto S, Higo-Moriguchi K, Htun KW, Myint YY, Myat TW, Taniguchi K. 2015. Whole Genomic Analysis of Human G12P [6] and G12P [8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Myanmar. *PLoS One*.
- Iturriza-Gómara M, Green J, Brown D, Desselbeger U, Gray J. 2000. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription genotyping. *Journal of clinical microbiology*. 38:898-901.
- Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. 2004. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus research*, 101(1), 67-81.

- Jeong HS, Jeong A, Cheon DS. 2012. Epidemiology of astrovirus infection in children. *Korean journal of pediatrics*, 55(3), 77-82.
- Jonassen CM, Jonassen TO, Saif YM, Snodgrass DR, Ushijima H, Shimizu M, Grinde B. 2001. Comparison of capsid sequences from human and animal Astroviruses. *Journal of General Virology* 82: 1061-1067.
- Jones MS, Harrach B, Ganac RD, Gozum MM, Dela Cruz WP, Riedel B, Schnurr DP. 2007. New Adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *Journal of virology* 81: 5978-5984.
- Kapoor A, Li L, Victoria J, Oderinde B, Mason C, Pandey P, Delwart E. 2009. Multiple novel astrovirus species in human stool. *Journal of general Virology*, 90(12), 2965-2972.
- Karst SM. 2010. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses*, 2(3), 748-781.
- Karst SM, y Tibbetts SA. 2016. Recent advances in understanding norovirus pathogenesis. *Journal of medical virology*.
- Kim JS, Kim HS, Hyun J, Kim HS, Song W. 2015. Molecular epidemiology of human Norovirus in Korea in 2013. *BioMed research international*, 2015.
- Kindler E, Trojnar E, Heckel G, Otto PH, Johne R. 2013. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. *Infection, Genetics and Evolution*, 14, 58-67.
- Komoto S, Apondi EW, Shah M, Odoyo E, Nyangao J, Tomita M, Wakuda M, Maeno Y, Shirato H, Tsuji T. 2014. Whole genomic analysis of human G12P [6] and G12P [8] rotavirus strains that have emerged in Kenya: Identification of porcine-like NSP4 genes. *Infect. Genet. Evol.* 27, 277–293.
- Koo HL, Ajami N, Atmar RL, DuPont HL. 2010. Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discovery medicine* 10: 61-70.
- Krishnan T. 2014. Novel human astroviruses: challenges for developing countries. *VirusDisease*, 25(2), 208-214.

- Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M, 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* 158, 2059–2068.
- Kulkarni R, Patel A, Bhalla S, Chhabra P, Cherian S, Chitambar SD. 2016. Characterization of GII. 4 noroviruses circulating among children with acute gastroenteritis in Pune, India: 2005–2013. *Infection, Genetics and Evolution*, 37, 163-173.
- La Rosa G, Della Libera S, Petricca S, Iaconelli M, Donia D, Saccucci P, Divizia M. 2015. Genetic Diversity of Human Adenovirus in Children with Acute Gastroenteritis, Albania, 2013–2015. *BioMed research international*, 2015.
- Linhares A, Velázquez F, Pérez-Schael I, Sáez-Llorens X, Abate H, Espinoza F, Human Rotavirus Vaccine Study Group. 2008. Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *The Lancet.* 371, 1181 – 1189.
- Liu X, Yamamoto D, Saito M, Imagawa T, Ablola A, Tandoc AO, Saito M. 2015. Molecular detection and characterization of sapovirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in the Philippines. *Journal of Clinical Virology*, 68, 83-88.
- Liu H, Jin L, Koh SBS, Atanasov I, Schein S, Wu L, Zhou ZH. 2010. Atomic structure of human adenovirus by cryo-EM reveals interactions among protein networks. *Science*, 329(5995), 1038-1043.
- López S, Arias CF. 2001. Los rotavirus. *Microbios en línea*. Centro de Investigación sobre Fijación del Nitrógeno. UNAM. México. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios>.
- Lu X, Joshi A, Flomenberg P. 2014. Adenoviruses. In *Viral Infections of Humans* (pp. 99-121). Springer US
- Martínez MÁ, Gómez JB, García JC, Estape, JV. 2008. *Microbiológico de las infecciones gastrointestinales*.
- Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Iturriza-Gómara M. 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the

- Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology*, 156(8), 1397-1413.
- Matussek A, Dienus O, Djeneba O, Simpoire J, Nitiema L, Nordgren J. 2015. Molecular characterization and genetic susceptibility of sapovirus in children with diarrhea in Burkina Faso. *Infection, Genetics and Evolution*, 32, 396-400.
- Méndez E, Murillo A, Velázquez R, Burnham A, Arias CF. 2012. Replication cycle of astroviruses. In *Astrovirus Research* (pp. 19-45). Springer New York.
- Méndez EA, Arias CF. 2013. Astroviruses, p 609–628. *Fields virology*, sixth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 1.
- Meyer CT, Bauer IK, Antonio M, Adeyemi M, Saha D, Oundo JO, Kisumu K. 2015. Prevalence of classic, MLB-clade and VA-clade Astroviruses in Kenya and The Gambia. *Virology journal* 12,178. Mijatovic-Rustempasic S, Teel EN, Kerin TK, Hull JJ, Roy S, Weinberg GA, Bowen MD. 2014. Genetic analysis of G12P [8] rotaviruses detected in the largest US G12 genotype outbreak on record. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 214-219.
- Moon RY. 1999. Adenovirus infections. *Pediatrics in Review*, 20(2), 56.
- Moser LA, Schultz-Cherry S. 2005. Pathogenesis of astrovirus infection. *Viral immunology*, 18(1), 4-10.
- Moser LA, Carter M, Schultz-Cherry S. 2007. Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication. *Journal of virology*, 81(21), 11937-11945.
- Mukherjee A, Chawla-Sarkar M. 2011. Rotavirus infection: A perspective on epidemiology, genomic diversity and vaccine strategies. *Indian Journal of Virology* 22(1), 11-23.
- Munnink BBO, Cotten M, Canuti M, Deijns M, Jebbink MF, van Hemert FJ, van der Hoek L. 2016. A Novel Astrovirus-Like RNA Virus Detected in Human Stool. *Virus Evolution*, 2(1), vew005.
- Mustafa H, Palombo EA, Bishop RF. 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), 1058-1062.

- O'Halloran F, Lynch M, Cryan B, Fanning S. 2002. Application of restriction fragment length polymorphism analysis of VP7- encoding genes fine comparison of Irish and global Rotavirus isolates. *J. Clin. Microbiol.* 40,524-531.
- Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. 2015. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 32-53.
- Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Katayama K. 2012. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Archives of virology*, 157(2), 349-352.
- Parra GI, Green KY. 2015. Genome of emerging norovirus GII. 17, United States, 2014. *Emerging infectious diseases*, 21(8), 1477.
- Peña RM, Conejo PR. 2010. Gastroenteritis aguda. *Protocolos de la Asociación Española de Pediatría y Sociedad Española de Urgencias Pediátricas.*
- Pereira Filho E, da Costa Faria NR, Fialho AM, de Assis RS, Almeida MMS, Rocha M, Leite JPG. 2007. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *Journal of medical microbiology*, 56(3), 313-319.
- Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. 2007. Emergence of rare Sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 26, 21-27.
- Raboni SM, Damasio GAC, Ferreira CE, Pereira LA, Nogueira MB, Vidal LR, Almeida SM. 2014. Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: etiology, seasonality and clinical outcomes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 109(4), 428-435.
- Rahman M, Matthijnssens J, Nahar S, Podder G, Sack D, Azim T, Van Ranst M. 2005. Characterization of a novel P[25],G11 human group A Rotavirus. *Journal of clinical microbiology* 43: 3208–3212.

- Rahman M, Matthijnssens J, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Taniguchi K, Iturriza-Gómara M, Iftekharuddin N, Azim T, Van Ranst M. 2007. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J. Virol.* 81, 2382–2390.
- Ramachandran M, Gentsch J, Parashar U, Jin S, Woods P, Holmes J, Kirwood C, Bishop R, Greenberg, Gerna G, Coulson B, Taniguchi K, Bresee J, Glass R. 1998. Detection and characterization of novel rotavirus strain in the United States. *Journal of clinical microbiology* 36, 3223-3229.
- Ramig RF. 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of virology*, 78(19), 10213-10220.
- Ramig RF. 2007. Systemic rotavirus infection. *Expert review of anti-infective therapy*, 5(4), 591-612.
- Ren Z, Kong Y, Wang J, Wang Q, Huang A, Xu H. 2013. Etiological study of enteric viruses and the genetic diversity of norovirus, sapovirus, adenovirus, and astrovirus in children with diarrhea in Chongqing, China. *BMC infectious diseases*, 13(1), 412.
- Rezaei M, Sohrabi A, Edalat R, Siadat SD, Gomari H, Rezaei M, Gilani SM. 2012. Molecular epidemiology of acute gastroenteritis caused by subgenus F (40, 41) enteric adenoviruses in inpatient children. *Lab. Medicine.* 43, 10-15.
- Riechmann ER, Torres JB, Rodríguez MJL. 2014. Diarrea aguda. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP.*
- Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. 2015. Norovirus. *Clinical microbiology reviews.* 28:134 –164.
- Romani S, Azimzadeh P, Mohebbi SR, Bozorgi SM, Zali N, Jadali F. 2011. Prevalence of sapovirus infection among infant and adult patients with acute gastroenteritis in Tehran, Iran. *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench*, 5(1).
- Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, O’Ryan M. 2006. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *New England Journal of Medicine* 354(1), 11-22.



- Russell WC. 2009. Adenoviruses: update on structure and function. *Journal of General Virology*, 90(1), 1-20.
- Rux JJ, Burnett RM. 2004. Adenovirus structure. *Human gene therapy*, 15 (12), 1167-1176.
- Sdiri-Loulizi K, Hassine M, Gharbi-Khelifi H, Aouni Z, Chouchane S, Sakly N, Aouni M. 2011. Molecular detection of genogroup I sapovirus in Tunisian children suffering from acute gastroenteritis. *Virus Genes*. 43, 6-12.
- Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS. 2007. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Archives of virology*, 152(3), 457-461.
- Snelling TL, Andrews RM, Kirkwood CD, Culvenor S, Carapetis J R. 2011. Case-control evaluation of the effectiveness of the G1P [8] human rotavirus vaccine during an outbreak of rotavirus G2P [4] infection in central Australia. *Clinical Infectious Diseases*, 52(2), 191-199.
- Soares CC, Albuquerque MCMD, Maranhão AG, Rocha LN, Ramírez MLG, Benati FJ, Santos N. 2008. Astrovirus detection in sporadic cases of diarrhea among hospitalized and non-hospitalized children in Rio De Janeiro, Brazil, from 1998 to 2004. *Journal of medical virology*, 80(1), 113-117.
- Straub TM, zu Bentrup KH, Coghlan PO, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, Nickerson CA. 2007. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging infectious diseases*, 13(3), 396.
- Svraka S, Vennema H, van der Veer B, Hedlund KO, Thorhagen M, Siebenga J, Koopmans M. 2010. Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe. *Journal of clinical microbiology*, 48(6), 2191-2198.
- Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD, Agocs M, Serhan F, Abeysinghe N. 2016. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children < 5 years of age, 2000–2013. *Clinical Infectious Diseases*, 62(suppl 2), S96-S105. Thongprachum A, Khamrin P, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H.

2016. Epidemiology of gastroenteritis viruses in Japan: prevalence, seasonality, and outbreak. *Journal of medical virology*, 88(4), 551-570.
- Toogood CI, Hay RT. 1988. DNA sequence of the adenovirus type 41 hexon gene and predicted structure of the protein. *Journal of general virology*, 69(9), 2291-2301.
- Tran TH, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, Nakagomi O. 2013. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII. 4 variants. *Journal of Clinical Virology*, 56(3), 269-277.
- Tse H, Chan WM, Li KS, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. 2012. Discovery and genomic characterization of a novel bat sapovirus with unusual genomic features and phylogenetic position. *PloS one*, 7(4), e34987.
- Uhnoo I, Svensson L, Wadell G. 1990. Enteric adenoviruses. *Baillière's Clinical Gastroenterology*, 4(3), 627-642.
- van der Avoort HG, Wermenbol AG, Zomerdijsk TP, Kleijne JA, van Asten JA, Jensma P, de Jong JC. 1989. Characterization of fastidious adenovirus types 40 and 41 by DNA restriction enzyme analysis and by neutralizing monoclonal antibodies. *Virus research*, 12(2), 139-157.
- Varela MF, Hooper AS, Rivadulla E, Romalde JL. 2016. Human Sapovirus in Mussels from Ría do Burgo, A Coruña (Spain). *Food and environmental virology*, 1-7.
- Verma H, Chitambar SD, Varanasi G. 2009. Identification and characterization of enteric adenoviruses in infants and children hospitalized for acute gastroenteritis. *Journal of medical virology*. 81(1), 60-64.
- Walter JE, Mitchell DK. 2003. Astrovirus infection in children. *Current opinion in infectious diseases*, 16(3), 247-253.
- Walter JE, Briggs J, Guerrero ML, Matson DO, Pickering LK, Ruiz-Palacios G, Mitchell DK. 2001. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Archives of virology*, 146(12), 2357-2367.
- Wang YH, Zhou DJ, Zhou X, Yang T, Ghosh S, Pang BB, Kobayashi N. 2012. Molecular epidemiology of Noroviruses in children and adults with acute gastroenteritis in Wuhan, China, 2007-2010. *Archives of virology* 157: 2417-2424.

- Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L, Nemerow GR. 2005. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *Journal of virology*, 79(4), 1992-2000.
- WHO Progress Report. 2008. Child and adolescent health and development. WHO Library, Geneva, Switzerland.
- Wold WS, Horwitz MS. 2013. Adenoviruses. In DM Knipe, PM Howley, Fields Virology, sixth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, p. 1732-1767.
- World Health Organization. 2007. Rotavirus vaccines. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 82: 285–96.
- Xavier MDPTP, Costa FAC, Rocha MS, de Andrade JDSR, Diniz FKB, de Andrade TR, de Mello Volotão E. 2015. Surveillance of Human Astrovirus Infection in Brazil: The First Report of MLB1 Astrovirus. *PloS one*, 10(8), e0135687.
- Xue Y, Pan H, Hu J, Wu H, Li J, Xiao W, Wu F. 2015. Epidemiology of norovirus infections among diarrhea outpatients in a diarrhea surveillance system in Shanghai, China: a cross-sectional study. *BMC infectious diseases*, 15(1), 1.
- Yarkın F, Yıldırım D, Çelik ÜS, Demirhindi H, Köksal F. 2016. The distribution of Rotavirus G and P genotypes in children with acute gastroenteritis in Cukurova region, Turkey. *Journal of Immunology and Clinical Microbiology*, 1(1), 3-9.
- Zhang Y, Bergelson JM. 2005. Adenovirus receptors. *Journal of virology*, 79(19), 12125-12131.
- Zhang W, Imperiale MJ. 2003. Requirement of the adenovirus IVa2 protein for virus assembly. *Journal of virology*, 77(6), 3586-3594.
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346(2), 312-323.
- Ziros PG, Kokkinos PA, Allard A, Vantarakis A. 2015. Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of Adenovirus 40 and 41. *Food and environmental virology*, 7(3), 276-285.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Guadalupe de Jesús Quintero Ochoa.

Candidata para el Grado de  
Maestra en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: Caracterización Molecular de Virus Causantes de Gastroenteritis en Niños Menores de Cinco Años de Diferentes Municipios del Sur de Sonora.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud.

Datos personales: Nacida en Navojoa, Sonora el 2 de febrero de 1988. Hija de José Trinidad Quintero Partida y Ana Alicia Ochoa Félix.

Educación: Egresada de la Universidad Sonora, Unidad Regional Sur, grado obtenido Química Bióloga Clínica en 2013.

Publicación derivada del trabajo: González-Ochoa, G., **G. J. Quintero-Ochoa**, P. M. Calleja-García, J. A. Rosas-Rodríguez, A. Virgen-Ortíz, **P. Tamez-Guerra**. 2016. Detection of emerging rotavirus strains G12P[8] in México. Acta Virologica: 60: 136-142. doi:10.4149/av\_2016\_02\_136.

# ANEXOS

## Anexo 1

### Alineación de secuencias parciales del ORF2 del gen norovirus genogrupo GI

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GI_8_SONMX-112      TCGCTGGATGCGGTCCATGACTTAAGTTTGTGGACAGGAGATCGCGATCTCTTGCCCGATTATGTAATGATGATGGCGTCTAAGGACGCCCAACAAA
KJ196298_GI.8_Japon C.....A.....
GU299761_GI.8_USA   C.....A.....
KR053451_GI.8_BRAZIL C..T.....T.....T.....
KF306212_GI.2       C..T.....C..TG.....A..C.....A..T.....TCA..G
KU311161-GI.7       ..A..T.....G..CA.....A..AC.....T.....CT...
KM246914_GI.14      C..G.....A.....C.....G..C.....C.....

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GI_8_SONMX-112      CATGGATGGCACCAGTGGTGCCGGTCAGCTGGTACCAGAGGCCAAATACAGCTGAACCTTTACCAATAAAACCAGTGGCCGGGGCTGCGACTGCGGTGCA
KJ196298_GI.8_Japon .....
GU299761_GI.8_USA   .....
KR053451_GI.8_BRAZIL .....
KF306212_GI.2       .GCT.....G..A..C..C..A.....A.....G..G.....TT.....C..C.....C..GG.....T.....T..C..AA..A..A..C..A..C
KU311161-GI.7       .....T.....TT..G.....C.....CC..TG.....G.....TG..C..C..A..C.....CG..C
KM246914_GI.14      .....T.....C..G.....A..T.....GG.....T.....T..T.....T..G..A..CA...

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GI_8_SONMX-112      ACCGCCGGTCAGGTAATATGATTGACCCCTGGATAATGAATAATTTGTACAGGCTCCCAAGGGGAGTTTACCATTTCCCCAAATAACACACCTGGTG
KJ196298_GI.8_Japon .....T.....
GU299761_GI.8_USA   .....T.....
KR053451_GI.8_BRAZIL .....C..T.....
KF306212_GI.2       ..T..T..G..A..T.....T.....TG..T.....C..T..A..T.....T.....C..A..C..T..T..C..T..C..C...
KU311161-GI.7       .....T..A..T.....A.....T.....C..A..C..TG.....C..A.....T.....A..C.....C.....A
KM246914_GI.14      .....A..A..A..T.....T.....G.....A..T..A.....T.....A.....C..A.....T..C..T..C..C..A

      310     320     330     340     350     360     370     380
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GI_8_SONMX-112      ATATATTATTTGATTTGCAATTAGGACCACATCTTAATCCTTTCTTGCCCATTTGTCTAGAATGTACAATGCATGGGTTGGACT
KJ196298_GI.8_Japon .....T.....T.....GC.....GAA
GU299761_GI.8_USA   .....T.....T.....GT.....GAA
KR053451_GI.8_BRAZIL .....T.....T.....GC.....GAA
KF306212_GI.2       .....T..G.....A.....T.....A..C.....T..A.....CCA.....T.....GC.....GAA
KU311161-GI.7       ..C..T.....GTC..G.....C.....C..C..TC..CCTG.....CCAG.....T.....GT.....GAA
KM246914_GI.14      ..C.....G.....A.....C..C..T..A.....A..C..AT..A..CC..AG..CCA.....GT.....AGAA
```

## Anexo 2

### Alineación de secuencias parciales del ORF2 del gen norovirus genogrupo GII

```
.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120
GII.4_BONMX-162 TTTGTGAATGAAGATGGCGCTGAGCTGACGCCAAACCCAAATTGATGGGTCCCGACCCAACTCGTCCCGAGAGCTCAACAAATGAGGTTATGGCTCTGGAGCCCGTTGTTGGTCCCGCCATTGC
GII.4-BONMX-74 .....TC.....
ABS41325_GII.4_OSAKA_2007 .....A.....TC.....A.....T.....A.....T.....
DQ369797_GII.4-ASIA2003 .....C.....A.....G.....TC.....A.....T.....A.....T.....
AF145896_GII.4_Camberwell1994 .....TC.....
AY741811_GII.4_US_1995/96 .....A.....TC.....T.....T.....
AY502023_GII.4_FARMINGTON HILL .....A.....TC.....T.....T.....
DQ078814_GII.4_HUNTER_2004 .....A.....C.....TC.....A.....T.....G.....
EF187497_GII.4_YERSEKE_2006a .....TC.....A.....T.....T.....C.....
KF177448_GII.4_Sydney .....TC.....
KM245072.1_GII.4_Apeldoorn_200 .....TC.....A.....T.....
KJ710247_GII.4_Sydney2012 .....A.....TC.....A.....T.....T.....
LC177653_GII.4_Dan Haag_2006b .....A.....TC.....T.....C.....T.....
KT962983_GII.2 C.....GCT.....TC.AC.....ATGGT.....GG.....G.....AAGT.....T.C.....C.....T.A.....G.C.....TT.G.....
JN797508_GII.1 .....A.....GCT.....TC.A.....ATGGT.....GGT.....A.....C.....ACG.....A.....T.....G.....C.....G.....TT.....A.....
KY424350I_GII.17 .....A.....GCT.....TC.A.....ATGGT.....T.....TGGT.....A.....G.....C.....ACCC.TC.C.....A.....A.....CG.....C.....A.....T.....A.....

.....120.....140.....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240
GII.4_BONMX-162 GGCACCTGTAGCGGGCCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGAAACAATTTTGTACAAGCCCGCTGGTGAGAGTTTACAGTATCCCGTAGAAAACCGCTCCAGGTGAARACTATGGAG
GII.4-BONMX-74 .....T.....
ABS41325_GII.4_OSAKA_2007 .....G.....T.....G.....C.....T.....G.....
DQ369797_GII.4-ASIA2003 .....G.....T.....G.....C.....T.....G.....
AF145896_GII.4_Camberwell1994 .....A.....T.....G.....G.....
AY741811_GII.4_US_1995/96 .....T.....T.....G.....G.....
AY502023_GII.4_FARMINGTON HILL .....T.....
DQ078814_GII.4_HUNTER_2004 .....T.....T.....
EF187497_GII.4_YERSEKE_2006a .....T.....
KF177448_GII.4_Sydney .....T.....
KM245072.1_GII.4_Apeldoorn_200 .....G.....C.....
KJ710247_GII.4_Sydney2012 .....G.....T.....A.....C.....
LC177653_GII.4_Dan Haag_2006b .....G.....G.....T.....A.....C.....
KT962983_GII.2 A..C..A..CA.T..T..AC..A.T.A.....T.....GCA.....C..G.....CAA..T.A.....C.....CC.T..T..C..T.....G.G...CTA.A
JN797508_GII.1 T..C..C..A.C.....A.T.....G.A.....TG.....C.....T.AAA..T.A.....G.....CC.T..TT.C.....G.CT.G.TA.A
KY424350I_GII.17 C.....C..CA.T.....A.T..CA.....CA.....G.....A.AAA..T.A.....C.....G.A.C.....T..T.A.....TT..TA.A

.....220.....240.....260.....280.....300.....310
GII.4_BONMX-162 CGCGCCCTTGGGACCTGATCTAAATCCCTACCTATCCCATTTGGCCAGAAATGTACAAATGGACATGCCGGCCG
GII.4-BONMX-74 .....C.....C.....
ABS41325_GII.4_OSAKA_2007 T.....C.....T.G.C.T.....T.T..C.....T.....TT...A.T
DQ369797_GII.4-ASIA2003 .....A.C.....G.....A.....T.T..CC.....TT...A.T
AF145896_GII.4_Camberwell1994 .....C.....T.G.....T.T.T.C.....T.....TT...A.T
AY741811_GII.4_US_1995/96 .....C.....T.G.C.T.....T.T.....TT...A.T
AY502023_GII.4_FARMINGTON HILL .....C.....G.....T.T.....CT...A.T
DQ078814_GII.4_HUNTER_2004 .....C.....T.G.....T.....TT...A.T
EF187497_GII.4_YERSEKE_2006a .....C.....T.G.....T.....C.....TT...A.T
KF177448_GII.4_Sydney .....C.....T.....TT...A.T
KM245072.1_GII.4_Apeldoorn_200 .....A.C.....T.G.....T.....TT...A.T
KJ710247_GII.4_Sydney2012 .....A.C.....T.....TT...A.T
LC177653_GII.4_Dan Haag_2006b .....A.C.....G.....T.....TT...A.T
KT962983_GII.2 TCT.GAG.....T.A..AT.....T.T..GC.A..C..A..A.....C..GT.....T
JN797508_GII.1 TTT.GAA..A.C.....AT.....A.T.....GC.A..CC.TT.A.....TT.....T.T
KY424350I_GII.17 ..TTAGAG.....C.....T.G.C.T..TT.GC.T.....T.A..G.....GT.....T.T
```

### Anexo 3

Alineación de secuencias parciales del ORF2 del gen sapovirus genogrupo G1.

```

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....|
GI.1 SONMK-58          CAGTGGCTCACACTGAAGGAACCCACAAAATAGTGTTTGAGATGGAGGGCAATGGCTCCAACCAAGAGCCAAAGCAAAACAACAACCCAAATGGTTC
GU296663.1 Sapovirus GI.1/Vene          .....C.....G.....
FJ823082.1 Sapovirus GI.1/7783          .....G.....
FJ823072.1 Sapovirus Hu/GI.1/7          .....T.....
AB622437.1 Sapovirus GI/Tokyo          .....T.....
AY694184.2 Sapovirus Hu/Dresde          .....C.....G.C.....G
HM002617.1 Sapovirus GI/MT-201          .....G.....TC.....G.C.....
AJ251991.1 Hu/SLV/Lyon                    .....C.....G.C.....G
U65427.1 Sapporo GI. I                    .....G.....TC.....G.C.....
X86560.1 Sapporo-Manchester                .....C.....C.....G
AY646854.2 Sapovirus Chanthabu            .....C.....G.C.....G
AY237422.3 Sapovirus Mc114                 .....T.....TC.....G.C.....

.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200.....210.....|
GI.1 SONMK-58          CGACCCACATCCCACGTTGTGTGGCTAATCCCGAGCAACCCCAATGGGGCCGCACAGCGCCTGGAGTTGGCTGTTGCCACTGGTGCAATCCAATCC
GU296663.1 Sapovirus GI.1/Vene          .....
FJ823082.1 Sapovirus GI.1/7783          .....
FJ823072.1 Sapovirus Hu/GI.1/7          .....C.....
AB622437.1 Sapovirus GI/Tokyo          .....
AY694184.2 Sapovirus Hu/Dresde          .....T.....
HM002617.1 Sapovirus GI/MT-201          .....T.....
AJ251991.1 Hu/SLV/Lyon                    .....C.....
U65427.1 Sapporo GI. I                    .....T.....
X86560.1 Sapporo-Manchester                .....
AY646854.2 Sapovirus Chanthabu            .....C.....
AY237422.3 Sapovirus Mc114                 .....

.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320.....330.....|
GI.1 SONMK-58          GCTTTGCAGTCTTTTCGTACTTTTCTTGGAAACGACAGGATGCCACGGGAACTTTTCTGGATCTATATCGCTTCATCCCAACATTAACCCGTAC
GU296663.1 Sapovirus GI.1/Vene          .....
FJ823082.1 Sapovirus GI.1/7783          .....
FJ823072.1 Sapovirus Hu/GI.1/7          .....
AB622437.1 Sapovirus GI/Tokyo          .....
AY694184.2 Sapovirus Hu/Dresde          .....C.....T.....
HM002617.1 Sapovirus GI/MT-201          .....C.....T.....
AJ251991.1 Hu/SLV/Lyon                    .....C.....T.....
U65427.1 Sapporo GI. I                    .....
X86560.1 Sapporo-Manchester                .....
AY646854.2 Sapovirus Chanthabu            .....
AY237422.3 Sapovirus Mc114                 .....

.....370.....380.....|
GI.1 SONMK-58          CCGGGTGGGCGGTACCTTTGAAGCCCGA
GU296663.1 Sapovirus GI.1/Vene          .....A.....T.....G.AG..AG
FJ823082.1 Sapovirus GI.1/7783          .....A.....T.....
FJ823072.1 Sapovirus Hu/GI.1/7          .....GT.....G.T...G
AB622437.1 Sapovirus GI/Tokyo          .....GT.....G.T...G
AY694184.2 Sapovirus Hu/Dresde          .....G.....G.T...G
HM002617.1 Sapovirus GI/MT-201          .....G.....G.T...G
AJ251991.1 Hu/SLV/Lyon                    .....GT.....G.T...G
U65427.1 Sapporo GI. I                    .....G.....G.T...G
X86560.1 Sapporo-Manchester                .....GT.....G.T...G
AY646854.2 Sapovirus Chanthabu            .....GT.....G.T...G
AY237422.3 Sapovirus Mc114                 .....C.GT.....G.T...G

```

## Anexo 4

Alineación de secuencias parciales del ORF2 del gen sapovirus genogrupo GII.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
GII.I SONMX-55      TTGGACCAACGATTGAACCTTCTATTGCCCACTCATGTTGAGACACCTAATGCTACTGCTCACCGTGTGGAAC TTGCAATGGCCACAGGGGCAGTG
AJ786351.1 Sapporo GII.I/Ehime      .G..C...T.....A.....A..C..G...G.....T...A...
KU317449.1 Sapovirus GII/India      .G..C...A.....A.....A..G...G.....G.....G...
LC081177.1 Sapovirus GII.1/Jap      .G..C...A.....A.....A..G...G.....G.....G...
LC086705.1 Sapovirus/GII.1/Aic      .G..C...A.....A.....A..G...G.....G.....G...
AJ249939.1 Sapporo GII.I/Brist      .G..C...A.....A.....A..G...G.....G.....G...
AY237419.2 Sapovirus Mc2          .G..C...A.....A.....A..G...G.....G.....T...
KP067430.1 Sapovirus GII.1 str     .G..CG.....A.....A.....G...G.....G.....G...
AJ606692.1 Sapporo/Chiba          .G...G..C...G...A.....A.....G...A..G.....G...
U95645.1 Sapporo virus-London/     .G...G..C...T...A.....A.....G...C..G.....G...
KF495121.1 Sapovirus GII.1/CQS     .G..C...A.....T..A.....G...G.....G.....G...
KF495122.1 Sapovirus GII.1/CQS     .G..C...A.....A.....A..G...G.....G.....G...
EU363876.1 Sapovirus/CMH002/00     .G..C...A.....A.....A..G...G.....G.....T...

      130      140      150      160      170      180      190      200      210
GII.I SONMX-55      GAGAGTGTTTTCTCGCGTCAACCAATACCATGGACCACCCGGCAAGCAGCAAAACACCTTTCTCGGTGCCATACATTTGGGCCACCGCATCAAC
AJ786351.1 Sapporo GII.I/Ehime      .G..A.....T.....T.....T...T...CC.....T...
KU317449.1 Sapovirus GII/India      .G.....T.....T.....T...C.....T...
LC081177.1 Sapovirus GII.1/Jap      .G.....T.....T...C...T...T...
LC086705.1 Sapovirus/GII.1/Aic      .G.....T.....T...C...T...T...
AJ249939.1 Sapporo GII.I/Brist      .G.....T.....T...C.....T...
AY237419.2 Sapovirus Mc2          .G.....T.....T...C.....T...
KP067430.1 Sapovirus GII.1 str     .G.....T.....T...C.....T...
AJ606692.1 Sapporo/Chiba          .G.....T.....T...C.....T...
U95645.1 Sapporo virus-London/     .G.....T.....T...CC.....T...
KF495121.1 Sapovirus GII.1/CQS     .G.....A.....A.....C.....T...
KF495122.1 Sapovirus GII.1/CQS     .G.....A.....A.....C.....T...
EU363876.1 Sapovirus/CMH002/00     .G.....T.....T...C.....T...

      250
GII.I SONMX-55      TGTGTGCTGGTTGGGG
AJ786351.1 Sapporo GII.I/Ehime      .....C.....
KU317449.1 Sapovirus GII/India      .....
LC081177.1 Sapovirus GII.1/Jap      .....
LC086705.1 Sapovirus/GII.1/Aic      .....
AJ249939.1 Sapporo GII.I/Brist      .....
AY237419.2 Sapovirus Mc2          .....
KP067430.1 Sapovirus GII.1 str     .....
AJ606692.1 Sapporo/Chiba          .....
U95645.1 Sapporo virus-London/     .....C.....
KF495121.1 Sapovirus GII.1/CQS     .....
KF495122.1 Sapovirus GII.1/CQS     .....
EU363876.1 Sapovirus/CMH002/00     .....

```



## Anexo 5

### Alineación de secuencias parciales del gen hexón de adenovirus sub-género C tipo 6



## Anexo 6

### Alineación de secuencias parciales del gen de la polimerasa (ORF1b) Astrovirus serotipo 6

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
    -.-. |----|----|----|----|----|----|----|----|----|
HAsTV-6-SONMX      TATGTTGACAACCTTCTTAACCGCCATGCTTATTACCATCTGGTGAAGTTACCGTGCAGACACGGGGCAACCCATCTGGACAGTTTTCAACAAC
AB769867.1 Human astrovirus 6/ .....C.....
GQ441165.1 Human astrovirus 6/ .....C.....
GQ901902.2 Human astrovirus 6/ .....A...G..A.....C.....
GQ495608.1 Human astrovirus 6/ .....C.....G.....C.....
GQ441176.1 Human astrovirus 6/ .....T..T...C.....G..C..T.....T.....C.....C.....
AF292077.1 Human astrovirus 6  .....C.....G.....T.....C.....
AB769866.1 Human astrovirus 6/ .....C.....
HM237363.1 Human astrovirus 6/ .....C.....T.....G.....T.....T.....C.....

      130      140      150      160      170      180      190      200      210
    -.-. |----|----|----|----|----|----|----|----|----|
HAsTV-6-SONMX      TGGCTACAAGCTTTTGAGTTTGCCTTATTTTAATGGCCAGATAAGGATCTCTGGAAGACCTACGACACCGTAGTCTACGGGGATGACAGGCTCTC
AB769867.1 Human astrovirus 6/ .....
GQ441165.1 Human astrovirus 6/ .....
GQ901902.2 Human astrovirus 6/ .....T.....A.....
GQ495608.1 Human astrovirus 6/ .....G.....A.....
GQ441176.1 Human astrovirus 6/ .....C.....A..C.....C.....T.....T..A.....A.....
AF292077.1 Human astrovirus 6  .....C.....T.....T.....
AB769866.1 Human astrovirus 6/ .....
HM237363.1 Human astrovirus 6/ .....A..C.....A..A..C.....T..T..T.....T..A.....

      250
    -.-. |----|----|----|
HAsTV-6-SONMX      TATGAGGAAGAGTGAT
AB769867.1 Human astrovirus 6/ .....
GQ441165.1 Human astrovirus 6/ .....
GQ901902.2 Human astrovirus 6/ .....A..
GQ495608.1 Human astrovirus 6/ .....A..
GQ441176.1 Human astrovirus 6/ .....
AF292077.1 Human astrovirus 6  .....
AB769866.1 Human astrovirus 6/ .....
HM237363.1 Human astrovirus 6/ .....A.....

```

## Anexo 7

Alineación de secuencias parciales del gen de la cápside (ORF2) astrovirus serotipo 2.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HAsTV 2-SONMX-17      CAACTCAGGAAACAGGGTGTACAGGACCAAAACCTGCAATATGCCAGAGAGCCACCGCAACACTTGAACAATTGGGTCAAATACAACAGGAGC
JX087964.1 Human astrovirus 2/.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KU973899.1 Human astrovirus 2/.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KF156806.1 Mamastrovirus 1/Hon.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KM272966.1 Mamastrovirus 1/Bra.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KP208781.1 Mamastrovirus 1/Rus.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JQ898567.1 Human astrovirus/Ta.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
L13745.1 Human astrovirus 2/US.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KF039911.1 Human astrovirus 2/.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
L06802.1 Human astrovirus 2/Ox.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

      130      140      150      160      170      180      190      200      210
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HAsTV 2-SONMX-17      CTTAATCCCGTCCGGTTAAGGACCGTACTGGGAGTACTCAGTTTGGGCCAGTGCAGGCGCTAGGAGCTCAATATTCAATGTGGAAATTAAAGTA
JX087964.1 Human astrovirus 2/.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KU973899.1 Human astrovirus 2/.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KF156806.1 Mamastrovirus 1/Hon.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KM272966.1 Mamastrovirus 1/Bra.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KP208781.1 Mamastrovirus 1/Rus.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JQ898567.1 Human astrovirus/Ta.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
L13745.1 Human astrovirus 2/US.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KF039911.1 Human astrovirus 2/.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
L06802.1 Human astrovirus 2/Ox.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
```

## Anexo 8

Alineación de secuencias parciales del gen de la polimerasa (ORF1b) Astrovirus serotipo 2.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HAstV 2-SONMX-03 AACATATCAAAGAAATCAGGTGGAACCTCATTAATAAAGACCAGCGTAAAAGTACAGACATGTGCATGAATGGTATGTTGGTAACCTCCTTAAT
JK087964.1 Human astrovirus 2/ .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
FJ375759.1 Human astrovirus/Ch .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KC915035.1 Mamastrovirus 1/Ita .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JF327666.1 Human astrovirus Pu .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KC342249.1 Mamastrovirus 1/Chi .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AB308374.1 Mamastrovirus 1/V13 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KF039911.1 Human astrovirus 2/ GG..C.....G..T..A...T...A...A...A...A...A...A...A...A...AC...C...



      130     140     150     160     170     180     190     200     210
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HAstV 2-SONMX-03 AAGTTACCTTGCAGACACGAGGCAATCCATCTGGCCAGTTTTCAACAACAATGGACAACAACATGGTCAACTTTTGGTTACAAGCTTTTGAGTTT
JK087964.1 Human astrovirus 2/ .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
FJ375759.1 Human astrovirus/Ch ..A.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KC915035.1 Mamastrovirus 1/Ita .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JF327666.1 Human astrovirus Pu .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KC342249.1 Mamastrovirus 1/Chi .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AB308374.1 Mamastrovirus 1/V13 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KF039911.1 Human astrovirus 2/ .G..A...G...A...G..A..C..G...A..A...T...T...T...T...C...C...

      250     260     270     280     290     300     310     320     330
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HAstV 2-SONMX-03 ATCTCTGGAAGACTTATGACACTGTAGTTTATGGAGATGATAGGCCTTCAACAACACCTTCAGTGCCTGATAATTATGAGGAGAGAGTGATTACT
JK087964.1 Human astrovirus 2/ .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
FJ375759.1 Human astrovirus/Ch ..C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KC915035.1 Mamastrovirus 1/Ita .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JF327666.1 Human astrovirus Pu .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KC342249.1 Mamastrovirus 1/Chi ..C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AB308374.1 Mamastrovirus 1/V13 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KF039911.1 Human astrovirus 2/ .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

ANEXO 9

Congresos y Publicación

 **IX Congreso Nacional de Virología** 

La Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Virus,  
de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

otorga la presente

**CONSTANCIA**

a:




Quintero-Ochoa G de J, Calleja-García PM, Virgen-Ortiz A, Rosas-Rodríguez JA, Tamez-Guerra P\*, González-Ochoa G.

Por su participación como

**PONENTE**

**VARIABILIDAD INTRAGENOTÍPICA DEL GEN DE VP4  
GENOTIPO P[8] DE ROTAVIRUS**

en el IX Congreso Nacional de Virología  
Morelos, México del 22 al 25 de septiembre de 2015.

COMITÉ ORGANIZADOR

Pavel Isa- IBT UNAM Elizabeth Loza Rubio- INIFAP Ramón A. González- CIDC UAEM

## Detection of emerging rotavirus G12P[8] in Sonora, México

G. GONZÁLEZ-OCHOA<sup>1</sup>, G. DE J. QUINTERO-OCHOA<sup>1</sup>, P. M. CALLEJA-GARCÍA<sup>2</sup>, J. A. ROSAS-RODRÍGUEZ<sup>1</sup>,  
A. VIRGEN-ORTÍZ<sup>2</sup>, P. TAMEZ-GUERRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Sonora, México; <sup>2</sup>Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima, Colima, México; <sup>3</sup>Laboratorio de Inmunología y Virología, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México

Received April 21, 2015; revised October 12, 2015; accepted April 15, 2016

**Summary.** – Rotavirus is the most common cause of gastroenteritis in children up to five years of age worldwide. The aim of the present study was to analyze the genotypes of rotavirus strains isolated from children with gastroenteritis, after the introduction of the rotavirus vaccine in México. Rotavirus was detected in 14/100 (14%) fecal samples from children with gastroenteritis, using a commercial test kit. The viral genome was purified from these samples and used as a template in RT-PCR amplification of the VP4 and VP7 genes, followed by gene cloning and sequencing. Among the rotavirus strains, 4/14 (28.5%) were characterized as G12P[8], 2/14 (14.3%), as G12P (not typed), and 3/14 (21.42%) as G (not typed) P[8]. Phylogenetic analysis of the VP7 gene showed that G12 genotypes clustered in lineage III. Phylogenetic analysis revealed that VP4 genotype P[8] sequences clustered in lineage V, whereas other P[8] sequences previously reported in México (2005–2008) clustered in different lineages. Rotavirus genotype G12 is currently recognized as a globally emerging rotavirus. To our knowledge, this is the first report of this emerging rotavirus strain G12P[8] in México. Ongoing surveillance is recommended to monitor the distribution of rotavirus genotypes and to continually reassess the suitability of currently available rotavirus vaccines.

**Keywords:** rotavirus; gastroenteritis; G12P[8]

### Introduction

Rotavirus gastroenteritis is a common infectious disease that affects children up to five years of age worldwide (Desselberger *et al.*, 2009). The mortality rates from diarrhea attributable to rotavirus infection are estimated to be 453,000 child deaths per year, with most of the deaths occurring in developing countries (Tate *et al.*, 2012). Rotavirus genotypes G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], and G9P[8] are responsible for the majority of severe cases of infections worldwide and currently available rotavirus vaccines were designed based on these five common circulating genotypes (Parashar *et al.*, 2013). Despite the worldwide prevalence of rotavirus genotypes G1–G4 and G9, several

studies have described unusual genotypes such as G5, G8, and G12 (Rahman *et al.*, 2007; Santos and Hoshino, 2005). The first isolate of G12 rotavirus was reported in 1987, causing diarrhea in young children. It was not reported again until 1998 in Thailand, then subsequently in 1999–2006 in United States, India, Bangladesh, Japan, Korea, United Kingdom, Belgium, Argentina, and Brazil (Rahman *et al.*, 2007). G12 is currently recognized as a globally emerging rotavirus genotype, displaying a high rate of transmission in recent years (da Silva Soares *et al.*, 2012; Delogu *et al.*, 2015; Tort *et al.*, 2015). In 2006, the Rotavirus vaccine program was implemented in México. Although the currently available vaccine has been described as safe and efficacious, the variability in rotavirus genotypes over recent years highlights the need for constant surveillance. Therefore, the present study reports genotypic analysis of rotavirus strains isolated from children with gastroenteritis in the south of Sonora, México.

E-mail: lupitaglezo@hotmail.com; phone: +526424259969.

**Poster Board Number:**

FRIDAY-363

**Publishing Title:**

**Molecular Characterization of Rotavirus and Astrovirus in Children with Gastroenteritis**

**Author Block:**

G. González-Ochoa<sup>1</sup>, G. D. J. Quintero Ochoa<sup>2</sup>, P. M. Calleja-García<sup>1</sup>, J. A. Rosas-Rodríguez<sup>1</sup>, P. Tamez-Guerra<sup>2</sup>; <sup>1</sup>Univ. de Sonora, Navojoa, Mexico, <sup>2</sup>Univ. Autónoma de Nuevo León, San Nicolas de los Garza, Mexico

**Abstract Body:**

**Background:** Rotavirus and Astrovirus are viruses associated to diarrhea in children up to five years old. Human Astroviruses are detected in 5-20% of the cases of acute and middle gastroenteritis in children. The common Astroviruses reported worldwide are the classic type (HAstV-1). On the other hand, Rotavirus causes severe gastroenteritis in children with 453,000 children deaths each year. Most of the cases of rotavirus infections are associated to genotypes G1P[8], G2P[8], G4P[8], G2P[4] and G9P[8]. Several studies have shown the Rotavirus genotypes variability between different seasons or geographic areas. In this study, we analyzed 100 fecal samples of children with gastroenteritis testing for human Rotavirus and Astrovirus. **Methods:** The viral RNA was purified from the samples by Trizol<sup>®</sup> method, followed by the synthesis of cDNA and the amplification of VP4 and VP7 gene of Rotavirus and ORF1b or ORF2 of Astrovirus with specific primers. The PCR products were cloned in the pGEM-T vector and sequenced. **Results:** The results showed that 5% (5/100) samples were positive to Astrovirus and 14% (14/100) to Rotavirus. Twenty percent (1/5) of the Astrovirus strains sequences presented a 98% homology with human astroviruses type 2 (HAstV-2) and 20% (1/5) with HAstV-6. The rotavirus genotypes detected were G12P[8] in 28.6% (4/14) of the analyzed samples and G no typed P[8] in 14.3%(2/14). The phylogenetic analysis of VP7 genotype G12 showed that the sequences reported in this study clustered with rotavirus strains G12 lineage III. **Conclusions:** To the best of our knowledge, this study provides the first report of rotavirus G12 in México. These results together with the detection of HAstV-6, which is an uncommon genotype reported worldwide, indicates that studies of Rotavirus and Astrovirus surveillance in children with gastroenteritis are important for the analysis of the genotype variability.

**Author Disclosure Block:**

G. González-Ochoa: None. G.D.J. Quintero Ochoa: None. P.M. Calleja-García: None. J.A. Rosas-Rodríguez: None. P. Tamez-Guerra: None.



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA  
DEPTO. DE CIENCIAS QUÍMICAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**"VI SIMPOSIO NACIONAL DE BIOMEDICINA Y SALUD"**

Navojoa Sonora a 17 de octubre de 2016

**Guadalupe de Jesús Quintero Ochoa**  
**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Presente**

Estimado (a) Congresista:

Se le informa que su trabajo:

**"Caracterización Molecular de Virus Causantes de Gastroenteritis en Niños"**

**Por**

**Guadalupe de Jesús Quintero-Ochoa, Patricia Tamez-Guerra, Patricia María Calleja-García, Ricardo Romero-Arguelles, Armando Avilés-Hernández, Michel Fernando Cejudo Flores, Guadalupe González-Ochoa.**

ha sido aceptado para su presentación durante el VI Simposio Nacional de Biomedicina y Salud, que se llevará a cabo en la ciudad de Navojoa, Sonora del 26 al 28 de octubre de 2016.

Atentamente



**Dr. José Gpe. Soñanez Organis**  
Coordinador General