

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Polimorfismo de los genes que codifican para las proteínas VP4, VP7 y
NSP4 de rotavirus y su asociación con la severidad de la diarrea**

Por

QB. Guadalupe González Ochoa

**Como Requisito Parcial para Obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología**

Mayo de 2006

**Polimorfismo de los genes que codifican para las proteínas VP4, VP7 y
NSP4 de rotavirus y su asociación con la severidad de la diarrea**

Comité de Tesis

Dr. Juan Fco. Contreras Cordero
Director de Tesis

Dr. Santos García Alvarado
Secretario

Dra. Diana Reséndez Pérez
Vocal

Dr. Carlos Hernández Luna
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A :

DIOS padre mío gracias por acompañarme a cada paso que doy, por que me has colmado de bendiciones y has permitido que se realice una etapa más en mi vida profesional.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON por brindar un espacio para cumplir con una meta profesional.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS por su apoyo en la disposición de infraestructura para el desarrollo de este trabajo.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Dr. Juan Fco. Contreras Cordero por ser mi guía durante la realización de este proyecto, pero sobre todo por ser mi maestro y mi amigo, GRACIAS.

Dr. Santos García Alvarado, Dra. Diana Reséndez Pérez, y al Dr. Carlos Hernández Luna por su valiosa cooperación durante la realización de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: **Karina, Oswaldo, Erika, Rocío y Sarahí**, muchas gracias por su apoyo y su amistad, somos una gran familia.

A mis **amigos, compañeros y a todas las personas** que de alguna u otra manera contribuyeron para hacer este sueño realidad.

DEDICATORIA

A mis padres:

JOSE ANTONIO GONZALEZ LEON Y GUADALUPE OCHOA FELIX por el amor que me han brindado desde siempre y por enseñarme que se puede ser mejor día con día.

A mis hermanos:

ERIKA CECILIA Y JOSE ANTONIO, por que los quiero mucho, gracias por el apoyo de siempre, los amo.

A mi amado esposo:

JOSE MANUEL VELARDE CANTU por el amor que me brindas, por tu apoyo y paciencia, por ser mi cómplice y ayudarme a realizar lo que un día pareció un imposible, gracias mi **AMOR.**

A mi maestra:

ROSA AMELIA VAZQUEZ CURIEL con mucho cariño y respeto por ayudarme a cumplir un sueño.

A mi segunda familia:

JOSE, LUPITA, PATY, EDUARDO Y JULIO VELARDE por recibirme tan amorosamente en su hogar y por el apoyo otorgado, los quiero mucho.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Pag.
1. RESUMEN Y ABSTRACT	12
2. INTRODUCCIÓN	14
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVO GENERAL	17
4.1 OBJETIVOS PARTÍCULARES.....	17
5. ANTECEDENTES.....	18
5.1 GENERALIDADES	18
5.2 CONSECUENCIAS DE UNA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS.....	22
5.3 NSP4 COMO POSIBLE ENTEROTOXINA	24
5.4 PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE EXTERNA Y PROPIEDADES ANTIGÉNICAS DE ROTAVIRUS.....	26
5.4.1 Proteína viral VP7.....	27
5.4.2 Proteína Viral VP4	28
5.5 POLIMORFISMO	30
6. MÉTODOS	32
6.1 MUESTRAS	32
6.2 EXTRACCION DE RNA	33
6.2.1 La extracción de RNA por fenol cloroformo	33
6.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.....	35
6.4 SINTESIS DE cDNA.....	36
6.5 AMPLIFICACION DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA VP4, VP7 Y NSP4.....	36
6.6 GENOTIPIFICACIÓN	37
6.7 DETERMINACION DE VARIANTES INTRAGENOTIPICAS	38
6.8 SECUENCIACIÓN.....	39
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	39

7. RESULTADOS.....	40
7.1 ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	40
7.1.1 Detección del genoma viral por electroforesis.....	40
7.2 DETERMINACION DE LOS GENOTIPOS	41
7.2.1 Genotipo VP4.....	41
7.2.2 Genotipo VP7.....	43
7.2.3 Genotipo NSP4	44
7.2.4 Cepas genotipificadas.....	45
7.3 POLIMORFISMO DE CADENA SENCILLA	46
7.3.1 Genotipo P[8].....	46
7.3.2 Genotipo G1	46
7.3.3 Genotipo Wa	47
7.5 SEVERIDAD DE LA GASTROENTERITIS Y EL POLIMORFISMO DE CADENA SENCILLA.....	49
7.6 SECUENCIACIÓN.....	51
8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIONES	61
LITERATURA CITADA.....	62
APENDICE.....	71

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pag.
1. Evaluación de la severidad de la gastroenteritis según la puntuación propuesta por Ruuska y Vesikari en 1990.....	34
2. Secuencias de los oligonucleótidos anidados utilizados para determinar los genotipos VP4, VP7 y NSP4, respectivamente.....	38
3. Modelos y severidad la gastroenteritis.....	51
4. Correlación entre la puntuación designada a los síntomas y los modelos de migración.....	51

LISTA DE FIGURAS

Fig.	Pag.
1. Representación esquemática de Rotavirus.....	21
2. Modelo que representa la inducción de diarrea por rotavirus.....	26
3. Modelo de migración característico de rotavirus del grupo A.....	40
4. Genotipos VP4.....	42
5. Genotipos VP7.....	43
6. Genotipo NSP4.....	44
7. SSCP de genotipos P[8].....	46
8. SSCP de genotipos G1.....	47
9. SSCP de genotipos Wa.	47
10. Alineación, con el programa Clustal X (versión 1.83), de las secuencias nucleotídicas.....	53
11. Alineación, con el programa Clustal X (versión 1.83), de las secuencias de proteínas.....	54
12. Árbol filogenético de la secuencias de NSP4 obtenidas en el presente estudio y de la base de datos de NCBI.....	55

LISTA DE SIMBOLOS



Partícula viral madura



Partícula viral incompleta



Proteína NSP4



Retículo endoplásmico



Flujo de agua

LISTA DE NOMENCLATURA

aa	Aminoácidos
[Ca ²⁺] _i	Calcio intracelular
°C	Grados Celsius
cDNA	DNA complementario
Cl ⁻	Cloro
DLM	Solución desnaturalizante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Dinucleótido trifosfato
ELISA	Inmuno ensayo ligado a enzimas
h	hora
Kb	Kilo bases
KDa	Kilo daltones
M	Concentración molar
Mab	Anticuerpos monoclonales
ME	Miscroscopia electrónica
mL	Mililitro
Na ⁺	Sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanometros
NSP	Proteína no estructural
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solución buffer fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Retrotranscriptasa

SNE	Sistema nervioso entérico
SSCP	Polimorfismo de cadena sencilla
TBE	Tris borato EDTA
uv	Luz ultra violeta
VP	Proteína viral
μL	Microlitro

1. RESUMEN

De los virus que provocan gastroenteritis, rotavirus es el principal agente causal de diarreas severas provocando la muerte de cerca 440,000 niños por año a nivel mundial. Algunos estudios señalan a las proteínas VP4, VP7 y NSP4 como factores de patogenicidad; VP4 y VP7 se involucran en procesos de ingreso del virus a la célula y en la producción de anticuerpos de neutralización; NSP4 es la única proteína descrita como enterotoxina, la cual, mediante un incremento en Ca^{2+} desencadena los procesos diarreicos. Hasta el momento, no se conocen los mecanismos por los cuales rotavirus puede causar una gastroenteritis severa. Por lo que el objetivo del presente trabajo es determinar si existe una correlación entre el polimorfismo de los genes que codifican para VP4, VP7 y NSP4 con los casos severos de diarrea. Se analizaron 123 muestras de heces de niños menores de 5 años colectadas de Octubre de 2004 a Marzo de 2005. La presencia del RNA característico de rotavirus se determinó a través de electroforesis en un sistema continuo. Posteriormente el RNA se sometió a RT-PCR para determinar los genotipos VP4, VP7 y NSP4. Los productos de PCR fueron desnaturalizados y sometidos a un sistema de SSCP para detectar el polimorfismo intragenotípico de las cepas de estudio y someter a una población representativa a secuencia de nucleótidos. Los resultados muestran que 64 (52%) de las cepas presentaron el modelo de migración característico de rotavirus. Con respecto a VP7 y VP4 el genotipo que predominó fue G1P[8] (34%), para NSP4 el genotipo Wa (65%) fue el que más se presentó. Por otro lado, las variaciones intragenotípicas detectadas en los genes que codifican para VP4 y VP7 mostraron tres modelos de migración y no se detectó una asociación con la severidad de la gastroenteritis. Por su parte, para NSP4, se detectaron 5 modelos de variación intragenotípica, mismos que se correlacionaron con el grado de deshidratación ($P < 0.05$). Los análisis de secuencia de los modelos indicó variaciones en las regiones de aa 115-140 para los modelos 1,2,3 y 5; pero no para el modelo 4, mismo que se relacionó con los casos más severos. Estos resultados muestran que VP7 y VP4 no están involucrados en la severidad de la infección y que NSP4 además de ser un factor de infecciones sintomáticas, como lo han reportado algunos investigadores, también puede ser un factor de la severidad de la gastroenteritis, indicando la importancia de estudiar este gen y la proteína que codifica para tener un mayor conocimiento de la patogénesis de la gastroenteritis por rotavirus.

ABSTRACT

Of the viruses that cause gastroenteritis, rotavirus is the main causal agent of severe diarrhea; it causes the fence death 440,000 children per year at world-wide level. Some researchers point to proteins VP4, VP7 and NSP4 like pathogenicity factors; VP4 and VP7 are related with the penetration viral into epithelial cells and the synthesis of neutralization antibodies; NSP4 is the first described viral enterotoxin, which, by means of an increase in Ca^{2+} it triggers the diarrheic processes. At the moment, are not known the mechanisms by which rotavirus can cause a severe gastroenteritis. The goal of the present work is determine if exist a correlation between the polymorphism of the genes codifies for VP4, VP7 and NSP4 with the severe cases of diarrhea. On this study were analyzed 123 samples of diarrheic faeces of children less than five years old. The presence of the RNA characteristic of rotavirus was determined by electroforesis in a continuous system. The VP4, VP7 and NSP4 genotypes were determined through RT-PCR. To detect the intragenotípico polymorphism, the PCR products were analyzed by SSCP. The results show that 64 (52%) of the samples presented the model of migration characteristic of rotavirus. The genotypes G1P[8] (34%) and Wa (65%) were predominant in VP7-VP4 and NSP4, respectively. On the other hand, the detected intragenotípico variations in the genes that codify to VP4 and VP7 was not associated to the severity of the gastroenteritis; it was not the case for NSP4, where the five different models from intragenotípico variation were detected, same that was correlated with the dehydration degree ($P < 0.05$). The analysis of sequence of the models showed variations in the regions of aa 115-140 for the models 1, 2,3 and 5; but it does not to model 4, same that was related to the most severe cases. These results show that probably VP7 and VP4 are determining for the infection and the viral neutralization, but not thus for the severity of the gastroenteritis. On the other hand, NSP4 can influence in the presence of asymptomatic infections, it reported by some investigators, if not also in the severity of the gastroenteritis, indicating that NSP4 can be considered like an important factor of viral pathogenicity in natural infections.

2. INTRODUCCIÓN

De los padecimientos que aquejan a la humanidad, los que desencadenan procesos diarreicos en la población infantil, se mantienen como una de las principales prioridades de la comunidad científica y la Organización Mundial de la Salud (Kapikian 1996). En niños, la diarrea y la deshidratación como consecuencia de la misma, son de las principales causas de morbilidad y mortalidad, los mas afectados son países subdesarrollados donde los servicios tanto sanitarios como de salud son insuficientes. Aunque la diarrea como síntoma de gastroenteritis puede ser causada por factores fisiológicos o por múltiples agentes infecciosos, en las de origen viral, la mayoría son por consecuencia de una infección por rotavirus. Aunque estos virus pueden infectar por igual a adultos y niños, los más susceptibles de desarrollar la enfermedad son los infantes por la falta de una respuesta de tipo inmunitaria que los adultos adquieren durante su vida (Parashar *et al*; 2003).

Se ha observado que los rotavirus pasan por múltiples cambios genéticos y antigénicos y que son responsables de la presencia cada vez mayor de los genotipos y serotipos. A la fecha, 15 serotipos y genotipos G, así como 15 serotipos y 25 genotipos P se conocen circulan entre la población humana y animal. Los cuales, pueden variar de una temporada invernal a otra, predominando en algunas ocasiones variantes poco comunes. Ésto, es un indicio de que el virus se somete a diferentes mecanismos de variabilidad entre lo que sobresa la acumulación de mutaciones por la falta de mecanismos de reparación de la RNA polimerasa, y los rearrreglos genéticos que pueden evolucionar al shift antigénico con los consabidos cambios en las proteínas de superficie (Padilla Noriega *et al*; 1998).

Con respecto a la enfermedad, se sabe que la severidad del cuadro clínico puede variar de leve a severo o inclusive comportarse como una infección de tipo asintomático (Mota-Hernández *et al*; 2003). Sin embargo, aunque mucho se ha estudiado sobre la epidemiología y biología del virus, hasta ahora no se conocen los mecanismos moleculares por los cuales, los rotavirus pueden ser causa de infecciones sintomáticas y asintomáticas, así como cuales son los factores que pueden inducir una diarrea severa.

Para determinar estos factores en la patología de una infección por rotavirus, se han realizado estudios en los genes virales y las proteínas que codifican, donde los resultados indican que los genes que codifican para las proteínas de superficie VP4, y VP7, así como para la proteína no estructural NSP4, entre otras, están involucrados en los procesos patogénicos (Morris and Estes, 2001).

Con respecto a las proteínas de superficie, los estudios se han dirigido al establecimiento de una respuesta inmunitaria tanto homotípica como heterotípica, lo que ha sido un factor para entender al menos en parte, como estas proteínas son blanco inmunológico para la neutralización del virus. Asimismo, se ha establecido la importancia de estas proteínas para la adsorción y penetración del virus a la célula hospedero. Sin embargo, aunque se han relacionado con la enfermedad, a la fecha faltan datos para determinar si estas proteínas son factores de patogenicidad dentro de la célula. Por su parte, existen evidencias de que la proteína NSP4 actúa como enterotoxina, la cual desencadena procesos diarreicos por desbalance del calcio intracelular participando en la generación de la enfermedad. Sin embargo, al igual que VP4 y VP7, no existen datos de si esta proteína NSP4 puede ser un factor de severidad de la infección (Estes, 2001).

Por tal motivo, el objetivo del presente estudio, fue analizar los genes que codifican para las proteínas VP4, VP7 y NSP4; y determinar si existe una asociación con mutaciones dentro de los genotipos que circulan en el área metropolitana de Monterrey, N.L. y la severidad de la gastroenteritis. La cual para este estudio tomó de base la escala propuesta por Ruuska (Ruuska and Vesikari, 1990)

3. HIPÓTESIS

Mutaciones en regiones específicas de los genes que codifica para las proteínas de superficie VP4 y VP7 y la proteína no estructural NSP4 se asocian a la severidad de la gastroenteritis.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el polimorfismo de los genes que codifican para las proteínas VP4, VP7 y NSP4, y su asociación con la severidad de la gastroenteritis.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar los genotipos de VP4, VP7 y NSP4 en Rotavirus.
2. Detectar la presencia de polimorfismos intragenotípicos.
3. Determinar la variabilidad intragenotípica mediante el análisis de secuencia nucleotídica.
4. Determinar la asociación de la variabilidad genética con la severidad de la diarrea.

5. ANTECEDENTES

5.1 GENERALIDADES

Desde tiempos antiguos, las enfermedades diarreicas han aquejado de manera severa a la humanidad (Kapikian, 1996). Las diarreas agudas se producen como consecuencia de una gastroenteritis de la cual también derivan otros síntomas como fiebre, vómito y deshidratación (Morris and Estes, 2001). La principal etiología de la gastroenteritis severa en infantes es vírica, hoy en día se han definido cuatro grandes grupos de estos virus: rotavirus, astrovirus, adenovirus entéricos y calicivirus humanos, de estos rotavirus constituye el principal agente etiológico de gastroenteritis severas en niños (Kapikian *et al*, 1996).

Rotavirus fue descubierto en 1973 por Bishop y colaboradores, quienes lo detectaron por Microscopia Electrónica (ME) en células epiteliales de mucosa duodenal de un niño con gastroenteritis severa no bacteriana. Al año siguiente, Flewett detectó las mismas partículas virales en heces de niños con diarrea aguda. Después de este descubrimiento, se incrementaron los reportes en los cuales los cuadros diarreicos eran adjudicados a rotavirus, determinándose que éste es la causa más común de hospitalización por gastroenteritis en los primeros 2 años de vida (Kapikian *et al*, 2001). Para 1975, se descubrió que rotavirus no solo afecta al hombre (Woode *et al*, 1975; Holmes *et al*, 1975), si no también a algunas aves (pavo, pollos y palomas) y a muchos otros mamíferos como lo son ovejas, caballos, cerdos y ratones; en todos los casos las infecciones se manifiestan los primeros meses de vida.

En la actualidad, rotavirus provoca 111 millones de episodios de gastroenteritis que solo requieren de cuidado en el hogar, 25 millones de visitas clínicas, 2 millones de hospitalizaciones y de 352,000 a 592,000 muertes cada año a nivel mundial. Tanto en países desarrollados como subdesarrollados se muestran índices semejantes de morbilidad; sin embargo, con respecto a la mortandad, ésta se ve incrementada en países en vías de desarrollo, por la falta de atención médica oportuna, aunado a los elevados niveles de desnutrición (Parashar *et al*, 2003).

En base a esta problemática, se han diseñado distintos tipos de vacunas, pero hasta ahora ninguna ha demostrado ser efectiva. En 1998, se autorizó en Estados Unidos la primera vacuna tetravalente de recombinación Rhesus-Humano (RRV-TV), pero un año después se retiró por causar invaginación intestinal en los niños a quienes les fue administrada (Lanata *et al*, 1992; Gentsh *et al*, 1996; Rennels *et al*, 1996; Hoshino *et al*, 2000; Georges *et al*, 2002; Pérez *et al*, 2002).

Con respecto a la estructura viral, rotavirus tiene un tamaño de 70 nm de diámetro y se caracteriza por poseer una estructura icosaédrica simétrica, conformada por una doble cápside externa, y una interna denominada core, ésta última envuelve al genoma viral, el cuál se compone 11 segmentos de RNA de doble cadena. El virus no posee envoltura lipídica y contiene una enzima RNA polimerasa dependiente de RNA. (Estes and Cohen, 1989). Los 11 segmentos del genoma viral presentan un total de 18,556 nucleótidos, cada uno de estos segmentos es numerado en base al orden de los modelos de migración en una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), donde el segmento uno y once son el de mayor y menor peso, respectivamente (3.3 a 0.6 kb) (Verly and Cohen, 1977; Beards, 1982; Prasad *et al*, 1996; Estes, 2001).

El genoma viral codifica para seis proteínas virales estructurales (VP) y seis no estructurales (NSP). Cada segmento génico codifica por lo menos para una proteína (fig. 1). Los genes 1, 2, 3, 4 y 6 codifican para VP1 (125 KDa), VP2 (102 KDa), VP3 (88 KDa), VP4 (88 KDa) y VP6 (41 KDa), respectivamente; mientras que el segmento 9 codifica para VP7 (37 KDa). Por otra parte NSP1 (53 KDa), NSP2 (35 KDa), NSP3 (34

KDa), NSP4 (28 KDa) y NSP5 (26 KDa) /NSP6 (12 KDa), son codificados por los genes 5, 8, 7, 10 y 11, respectivamente. El segmento 11 codifica para dos proteínas traducidas por dos distintos marcos de lectura que se encuentran traslapados (Estes and Cohen, 1989; Prasad and Estes, 1997; Estés, 2001). Las proteínas estructurales se distribuyen de la siguiente manera el virus: En el core, se localizan las proteínas VP1, VP2 y VP3; la proteína VP6, la cual es la más abundante, se ubica en la cápside interna; las proteínas VP4 y VP7 se localizan en la cápside externa, esta última es la segunda proteína más abundante.

De la cápside externa, la proteína VP7 (conocida como una glicoproteína) es el principal antígeno de neutralización, es decir, es responsable de inducir la producción de anticuerpos de neutralización (Ludert *et al*, 2002). Esta proteína es codificada por el gen 9 (7 ó 8, en algunas cepas) posee 1,062 pb y un marco de lectura de 978 pb que codifica para una proteína de 326 aminoácidos, la proteína ya madura tiene un peso de 34 KDa. (Estes and Cohen, 1989; Urasawa *et al*, 1993). Otra de las proteínas de la cápside externa es VP4, la cual se conoce como una hemaglutinina (Mackow et al, 1989), en la estructura viral, se encuentra en forma de espículas de alrededor de 20 nm; 60 de estas estructuras están distribuidas de manera uniforme alrededor de la cápside. Es codificada por el gen 4, tiene un marco de lectura abierto de 2,325-2,326 pb mismos que codifican para una proteína de 775 aminoácidos o 776 dependiendo de la cepa, cuyo peso es de 80 KDa. La proteína VP4 juega un rol importante en los procesos de infección viral, debido a que por efecto de la tripsina es fraccionada en dos segmentos (VP8 y VP5) y esto trae como consecuencia el ingreso del virus a las células blanco. Por otro lado, también interviene en la producción de anticuerpos de neutralización, de manera independiente de VP7 (Hoshino *et al*, 1985; Mackow et al, 1988; Taniguchi *et al*, 1989; Estes, 2001).

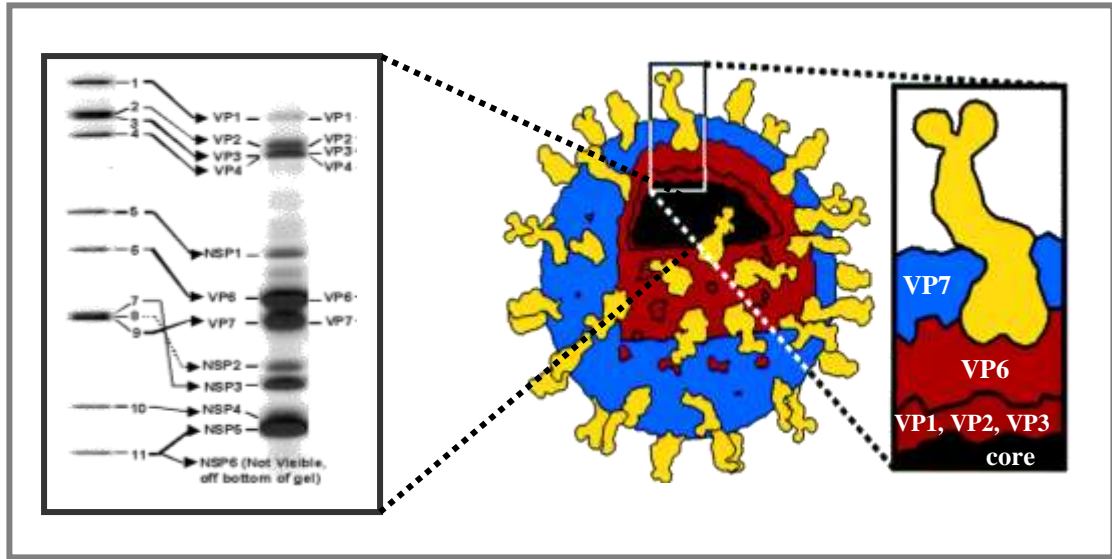


Fig. 1 Representación esquemática de Rotavirus. A la izquierda representación esquemática del genoma viral de rotavirus y la proteína expresada por cada gen, respectivamente. A la derecha, representación superficial de la estructura tridimensional de la cápside externa de la partícula viral completa.

La clasificación viral indica que rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*, los virus correspondientes al género rotavirus, se clasifican serológicamente en grupos, subgrupos, serotipos y genotipos. En base a las características antigénicas de VP6, se determinan los grupos o subgrupos. Se conocen siete grupos (A-G) y dos subgrupos I y II (Ghosh and Naik, 1989). Los grupos A, B y C se han detectado en humanos y animales. El grupo A ha sido establecido como el principal grupo relacionado con diarrea en niños; el grupo B ha sido detectado de manera esporádica en niños y adultos (Sanekata *et al*, 2003) y el grupo C, en infecciones en adultos en Iowa, China y Japón. Los grupos restantes (D-G) solo se han detectado en infecciones a animales (Bonsgorf *et al*, 1988; Riepenhoff-Talty *et al*, 1997; Wu *et al*, 1998; Kuzuya *et al*, 2005).

En base a las proteínas de la cápside externa VP4 y VP7, rotavirus se clasifica por medio de un sistema binario, en el cuál los distintos serotipos o genotipos VP4 y VP7 son relacionados (Kapikian *et al*, 2001). Los serotipos y genotipos VP7 se denominan G (debido a que VP7 es una proteína Glicosilada). Para VP4 el serotipo es indicado por la letra P (sensible a proteasa) seguido de un número, que indica el subtipo y el genotipo se indica entre corchetes. Hoy en día se conocen 15 serotipos G, de los cuales 10 son infectivos para el hombre; para VP4 se conocen 25 genotipos y 14

serotipos, de éstos los más frecuentes son P1 subtipo A y B y P2 subtipo A (Arista *et al*, 1999; Martella *et al*, 2003; Mota-Hernández *et al*, 2003; Rahman *et al*, 2005; McNeal *et al*, 2005). Los genotipos que circulan a nivel mundial son G1P[8], G4P[8], G2P[4], G3P[8]. Por otro lado, algunos investigadores han demostrado la presencia de genotipos G y P poco comunes así como combinaciones inusuales (Arista *et al*, 1997; Ramachandran *et al*, 1998; Argüelles *et al*, 2000; O'Halloran *et al*, 2002; Rhaman *et al*, 2003, Iturriza *et al*, 2004).

5.2 CONSECUENCIAS DE UNA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS

Todos los individuos, independientemente de la edad, son susceptibles a una infección por rotavirus. Sin embargo, en niños de 3 meses a 2 años de edad la infección conduce a una diarrea y otros síntomas como náuseas, vómitos, fiebre, anorexia, depresión, deshidratación y dolor abdominal. La sintomatología puede manifestarse en un tiempo aproximado de 48 h después de la infección por rotavirus. La gastroenteritis aguda es un proceso autolimitado, en la que solo es necesaria la valoración del paciente, aunque, un grado de deshidratación elevado puede provocar la muerte (Morris and Estes, 2001). En países subdesarrollados las muertes se atribuyen al estado de deshidratación, debido a que durante la infección se induce una gran pérdida de fluidos, esto mismo, conduce a la muerte de niños en condiciones vulnerables, tales como, un estado nutricional deficiente. En general, los brotes por rotavirus se presentan en las temporadas más frías del año (Wickelgren, 2000; Parashar *et al*, 2003).

Debido a que rotavirus afecta a todo tipo de mamíferos, se puede estudiar la enfermedad en modelos animales, el más común es el ratón, se considera también que la severidad del padecimiento dependerá de la ubicación en el tracto gastrointestinal, del inóculo utilizado, edad, fisiología intestinal del huésped y el estatus inmune. También en los modelos animales rotavirus muestra una marcada dependencia de edad para causar gastroenteritis, de igual manera, algunos estudios revelan que la resistencia a una infección por rotavirus es mediada por inmunidad adquirida (Morris and Estes, 2001).

Tanto en animales como en el humano, rotavirus interactúa con los enterocitos de las vellosidades del intestino delgado, estos se dividen en dos tipos: los enterocitos y las células crípticas. Aunque en un principio se sospechó que el daño en estas células traía como consecuencia la diarrea, algunos estudios recientes indican que no existe correlación entre lesiones histológicas y la sintomatología (Shaw *et al*, 1995 Raming, 2004).

La diarrea como consecuencia de una infección por rotavirus es multifactorial: a) la interacción del virus con el epitelio intestinal altera sus funciones conllevando a la diarrea, esto se debe a una mal absorción seguido de la destrucción del enterocito; b) por la acción de una proteína, considerada como una toxina (NSP4); c) por la estimulación del Sistema Nervioso Entérico (SNE); y por último d) por isquemia de las vellosidades (Lundgren *et al*, 2000; Lundgren and Svensson,2001; Raming, 2004). Por otro lado, en la severidad de la diarrea también influye la respuesta del huésped, aunque la existencia de algunos rotavirus causantes de infecciones asintomáticas, sugiere que tanto factores virales como del hospedero pueden influir en la severidad de la gastroenteritis.

Entre los factores del huésped que influyen en la severidad de la gastroenteritis están: a) el estado de desnutrición b) la edad c) La expresión de mucina intestinal y el nivel de reemplazo de las células epiteliales (Flores *et al*, 1986; Hall *et al*, 1993; Broome *et al*, 1993). Por otra parte, entre los factores virales que afectan la severidad de la gastroenteritis están que: a) algunos alelos de VP4 se han asociado con casos asintomáticos, b) los virus pueden ser atenuados (por varios pases en cultivo celular) esta atenuación se da como resultado de la restricción en la replicación y la pérdida de de la patogenicidad y c) algunas cepas virales solo se replican en ciertas especies.

La búsqueda de genes virales y proteínas responsables de las diarreas severas, han conducido al estudio del RNA viral, dichos estudios señalan a los genes que codifican para las proteínas VP3, VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP2 y NSP4 como factores de virulencia. Las proteínas VP4 y VP7 son importantes para la adsorción y penetración del virus en las células epiteliales, así como para la producción de anticuerpos de

neutralización. VP3 y VP6 son proteínas requeridas para la transcripción del RNA. No se comprende la función de NSP1 y NSP2 pero se cree que facilitan los procesos de replicación viral, por otra parte, NSP4 ha sido la única proteína considerada como una enterotoxina, por desencadenar procesos diarreicos (Morris and Estes, 2001).

5.3 NSP4 COMO POSIBLE ENTEROTOXINA

NSP4 es una glicoproteína de 175 aa, es codificada por el gen 10 (Estes, 2001). Durante los procesos de replicación viral, en la morfogénesis, la proteína madura se integra en la membrana del retículo endoplásmico (ER) y actúa como un receptor intracelular de las partículas proteicas subvirales (Tian *et al*, 1996). La proteína NSP4 completa, un fragmento de la misma (115-175) y ciertos péptidos (115-135, 131-140) se han relacionado con una actividad enterotoxigénica al inducir diarrea al ser inoculada en ratones (Ball *et al*, 1996; Zhang *et al*, 2000; Morris and Estes, 2001).

El proceso que conduce a la diarrea se inicia cuando rotavirus se une e infecta a los enterocitos en el intestino delgado. La unión es mediada por una serie de interacción secuencial con moléculas conformadas con y sin ácido siálico. El virus se internaliza por mecanismos no bien definidos y la cápside externa se pierde, activando la síntesis de moléculas virales. Eventos intracelulares, relacionados con NSP4, inducen la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico. El incremento de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) desencadena una serie de procesos celulares incluyendo la disrupción del citoesqueleto de las microvellosidades, disminución de la expresión de disacaridasas y otras enzimas, inhibición general de transporte de Na^+ y necrosis. Estos eventos conllevan a pérdida de la absorción y desencadenan la diarrea. Al parecer, NSP4 es secretado de la célula por una vía no clásica dependiente de Ca^{2+} previa a la lisis celular (Halaihe *et al*, 2000; Estes, 2001).

La liberación de NSP4 de las células infectadas conduce a efectos paracrinos, NSP4 se une a células no infectadas (a receptores no definidos) y desencadena una

cascada iniciada por fosfolipasa C-inositol 1,3,5-trifosfato (PLC-IP₃) que culmina en la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico incrementando el [Ca²⁺]_i. Si NSP4 actúa en enterocitos (fig. 2) induce una disrupción en las uniones celulares, resultando en permeabilidad paracelular; si actúa en células crípticas incrementa el [Ca²⁺]_i induciendo secreciones mediadas por la activación del transporte de Cl⁻. La proteína NSP4 secretada (u otra molécula) liberada de las células infectadas estimulan el SNE, esto se determinó debido a que agentes que bloquean el SNE pueden disminuir la pérdida de fluidos (Dong *et al*, 1997; Lundgren *et al*, 2000; Raming, 2004).

Con respecto a la importancia de algunos péptidos de NSP4, un estudio realizado por Tian y Colaboradores, en 1996, demostró la proteína purificada y un segmento proteico de los aminoácidos 114-135 (de la misma proteína), un incrementaba los niveles en Ca²⁺ intracelular en células de insecto. Posteriormente, varios investigadores coincidieron con respecto a la importancia del péptido de aminoácidos 114-135. Estudios posteriores de análisis de secuencias de aminoácidos de NSP4 comparando cepas animales atenuadas y no atenuadas, indicaron que mutaciones o depleciones entre los aminoácidos 131-140 se traduce en la pérdida de la habilidad para incrementar los niveles de Calcio intracelular y por consecuencia ausencia de diarrea (Zhang *et al*, 1998). Por otro lado, estos resultados mostraron la posibilidad de producir vacunas contra rotavirus en base a la atenuación de NSP4, sin embargo, por lo menos para la cepa denominada 89-12, la atenuación no estaba relacionada a mutaciones en NSP4 (Ward *et al*, 1997), estudios realizados en China tampoco demostraron una correlación entre los péptidos señalados en NSP4 de rotavirus aislados de casos sintomáticos o asintomáticos (Horie *et al*, 1997; Lee *et al*, 2000), ante tales controversias solo se pueden sugerir más estudios al respecto, con la finalidad de elucidar el papel que juega NSP4 como un factor de patogénesis viral y en la severidad de la gastroenteritis.

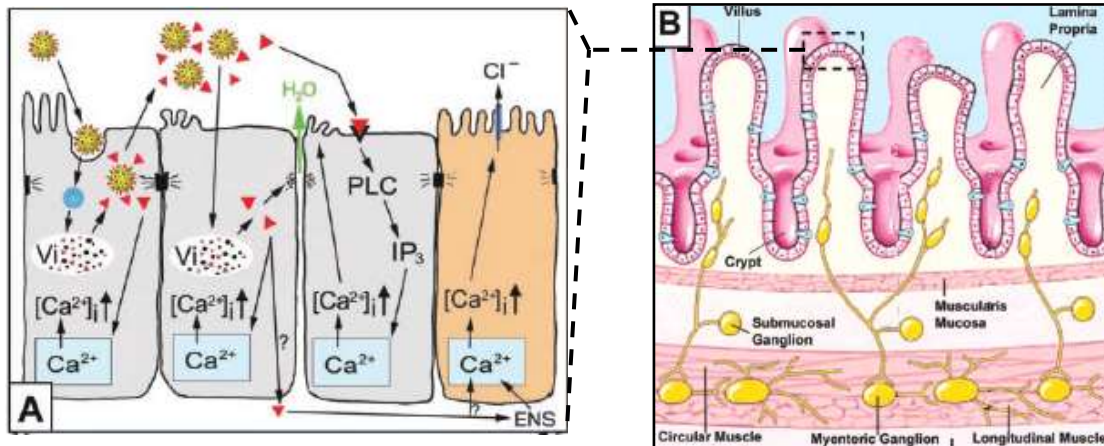


Fig. 2. Modelo que representa la inducción de diarrea por rotavirus. El inciso A muestra células infectadas y sucesos posteriores a la infección, de izquierda a derecha la primera célula infectada, el virus entra y pierde su cápside, se forman los viriones y se secreta la proteína NSP4 (triángulos rojos), NSP4 intracelular también induce un incremento de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico (cuadro azul); la siguiente célula es infectada NSP4 se une a receptores desconocidos y se introduce a la célula disrumpiendo las uniones intercelulares permitiendo el flujo de agua y electrolitos (Flecha verde) ; NSP4 también estimula a través de la cascada de PLC - IP_3 la liberación de $[Ca^{2+}]_i$; La célula marrón representa una célula críptica sobre la cual puede actuar NSP4 o el SNE que incrementa los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ que induce la secreción de Cl^- . El inciso B Muestra la estructura normal del intestino delgado, con el sistema circulatorio removido por clarida (Raming, 2004).

5.4 PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE EXTERNA Y PROPIEDADES ANTIGÉNICAS DE ROTAVIRUS

Los rotavirus presentan tres proteínas de importancia antigénica que se han utilizado para su clasificación en grupos (VP6), subgrupos (VP6) y serotipos (VP4 y VP7). Son las proteínas de la cápside externa VP7 y VP4 las que más interés han despertado para estudiar las características antigénicas ya que ambas inducen la producción de anticuerpos neutralizantes de forma independiente, por lo que son importantes en la inactivación del virus (Gentsh *et al*, 1996; Gouvea *et al* 1996; Santos *et al*, 1998). Estas dos proteínas, como ya se mencionó, determinan el genotipo viral y forman la base de clasificación binaria de los serotipos y genotipos G y P de los rotavirus. Por definición, serotipo es la clasificación basada en la neutralización de la infectividad viral. La serotipificación de rotavirus se ha llevado a cabo por medio técnicas como neutralización de reducción de placa (PRNT), neutralización de focos fluorescentes (FFN) e Inmunoensayos Ligados a Enzimas (ELISA), utilizando

anticuerpos monoclonales (Mabs) de neutralización (Beards *et al*, 1980; Coulson and Masendycz, 1990; Coulson, 1993; Kapikian *et al*, 2001).

5.4.1 Proteína viral VP7

En la actualidad, se cuenta con toda una batería de anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epítopes dentro de la misma proteína VP7 para detectar un mismo serotipo (Greenberg *et al*. 1983; Unicomb *et al.*, 1989; Padilla-Noriega *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1991). El criterio utilizado para definir un nuevo serotipo, es que exista al menos una diferencia de 20 veces en el título neutralizante (Wyatt *et al*, 1983; Hoshino, 1996). Sin embargo, se ha observado que existen diferencias significativas de reactividad por estos anticuerpos lo que dio evidencia de que existen diferentes dominios de neutralización sobre la proteína VP7. Como consecuencia de esto se introdujo el término monotipo, con el fin de identificar solo aquellas cepas de rotavirus que comparten el mismo serotipo pero que presentan diferente modelo de reactividad contra los diferentes anticuerpos monoclonales que identifican al serotipo (Coulson *et al*, 1996). Otra importante observación que se derivó de estos estudios antigénicos fue la reactividad cruzada de ciertos anticuerpos monoclonales contra cepas con diferente serotipo. A los anticuerpos con esta característica se les conoce como anticuerpos de reacción cruzada y la respuesta de los mismos se conoce como respuesta heterotípica (Crawford *et al*, 1999).

Un análisis de secuencia de aminoácidos de VP7 indica la presencia de nueve regiones variables (VR1-VR9) los cuales están altamente conservados para rotavirus dentro de un mismo serotipo, pero difieren entre cepas de distinto serotipo por tal motivo se puede deducir el serotipo en base a la secuencia nucleotídica de dos de esas variables VR5 y VR8 (Green, 1988; Gouvea, 1990). La especificidad de serotipo esta confinada a las regiones VR5, VR7, y VR8, que corresponden a las regiones antigénicas A (aminoácidos 87-101), B (142-152), y C (208-221), respectivamente. Estudios previos muestran que los epítopes de neutralización se encuentran localizados en las regiones VR5, VR8 y VR7 en donde el cambio de un sólo aminoácido es suficiente para cambiar

las características antigénicas de la cepa de rotavirus, por ejemplo, en la cepa SA11 una simple sustitución del aminoácido 211 crea la formación de un nuevo sitio de glicosilación, esto como consecuencia permite una resistencia significativa a la neutralización por sueros hiperinmunes (Estes, 2001).

5.4.2 Proteína Viral VP4

Esta proteína es segregada de manera independiente de VP7 y también presenta especificidad de serotipo (Greenberg *et al.*, 1983). La clasificación serológica de rotavirus en base a la proteína VP4, se ha realizado por el uso de antisueros hiperinmunes dirigidos a la proteína VP4 expresada de baculovirus recombinantes, como criterio de diferencia entre serotipos se consideró nivel de 8 veces en el título de anticuerpos neutralizantes (Hoshino *et al.*, 1996). Algunos estudios indican que la tripsina, segmenta la proteína en dos porciones VP5 (60 KD) y VP8 (28KD), esto favorece la capacidad del virus para entrar en la célula (Patton *et al.*, 1993; Arista *et al.*, 1996; Ludert *et al.*, 1996). En la secuencia de aminoácidos los sitios de acción de la tripsina en dos argininas localizadas en la posición 241 y 242. La subunidad VP8 contiene la mayoría de los sitios de antigenicidad en base a los cuales se lleva a cabo la serotipificación, mientras que VP5 contiene los sitios responsables de la reactividad cruzada entre diferentes serotipos VP4 (Larralde and Gorziglia, 1992; Urasawa *et al.*, 1993).

Algunos estudios realizados a la subunidad VP8 sugieren que en los residuos 102 a 149 se localizan las especificidades de los serotipos y subtipos. Sin embargo, no se ha podido analizar completamente los serotipos P, esto posiblemente se deba a varios factores como a) La falta de anticuerpos monoclonales capaces de detectar las diversas variedades antigénicas, b) La presencia de reacción cruzada, c) La presencia de monotipos. Por tal motivo, la tipificación en base a VP4 se ha realizado por medio de análisis de secuencia e hibridación. Una comparación de la secuencia de aminoácidos revela la presencia de nueve áreas de divergencia, en donde la región que más predominó incluye los residuos 92 a 192. Mutaciones en VP8 entre los residuos 72 a

217 provocan una de neutralización muy poco eficaz de Mabs dirigidos a algunos de éstos sitios (Steele *et al*, 1993; Kapikian *et al*, 2001).

Aunque no está del todo claro el papel que juega cada una de estas proteínas en el establecimiento de la respuesta de anticuerpos neutralizantes. Estudios por ELISA de competencia indican que anticuerpos anti-VP4, además de proteger contra la cepa homóloga, también dejan protección contra otras cepas de serotipo diferente. Estudios realizados por Contreras y colaboradores en 1995, en esta región parecen indicar que VP4 es más importante que VP7 en la producción de anticuerpos neutralizantes, ya que el hecho de que el serotipo P1A se haya presentado en mayor proporción que cualquiera de los serotipos G, en los casos estudiados, puede dar indicios de que esta proteína sea responsable de una respuesta heterotípica contra varias cepas de rotavirus en una infección natural (Ward *et al*, 1988; Vesikari *et al*, 1990).

Por otro lado, VP4 esta se ha relacionado con la virulencia de rotavirus, debido a que esta proteína depende la capacidad de invasión del virus a la célula, esto puede ser por dos mecanismos: a) Por la interacción de VP4 con receptores de ácido siálico en la célula, para que posteriormente el virus sea fagocitado por la misma, y b) Por la acción de la tripsina que al fraccionar a VP4 en dos segmentos VP5 y VP8, permite la entrada del virus a la célula blanco (Estes, 2001). Por otra parte, comparaciones de secuencias de VP4 entre cepas asintomáticas y sintomáticas, relacionadas no de manera específica con los principales serotipos G1, G2, G3 y G4, demostró un elevado nivel de conservación (95-97%) entre cepas asintomáticas y entre cepas cuya infección es sintomática se observó una divergencia del 25 al 27%, las cepas comparadas han sido clasificadas como P2A[6] (Gorziglia *et al*, 1988).

Estudios realizados por Mota-Hernández y colaboradores, sugieren una relación entre el genotipos VP4 y diferencias significativas en la sintomatología, en este análisis se determinó que la severidad de la diarrea se relaciona con diferentes serotipos P, mas que con los serotipos G, el serotipo P que se relacionó con las diarreas más severas no pudo ser serotificado, el segundo serotipo asociado a la severidad fue P1A[8]. Esto

sugiere que el gen que codifica para VP4 puede asociarse con la disminución de la virulencia. Sin embargo, hasta hoy no existe suficiente evidencia de que las infecciones asintomáticas sean producto de una cepa con estas características o de la condición fisiológica de los infantes infectados.

5.5 POLIMORFISMO

La inducción de mutaciones específicas en cada uno de los 11 genes es de utilidad para determinar la función de algunas de las proteínas. Mutaciones de los genes que conforman el virus pueden reflejarse de varias formas: 1) con la variación en la especificidad serotípica o genotípica, 2) con la pérdida de la capacidad de neutralización por Mabs específicos y 3) con alteraciones en la patogénesis viral, aunque esto no ha sido plenamente elucidado. La frecuencia de mutación que ocurre entre las cepas durante la replicación, limita el análisis de las cepas entre la población susceptible (Unicomb *et al*, 1991; Zao *et al*, 1999).

Con respecto a mutaciones virales que manifiesten una variación serotípica y genotípica, éstas pueden evidenciarse por técnicas inmunológicas, como Inmunoensayos; o por técnicas de biología molecular, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); debido a que algunas mutaciones pueden alterar la especificidad de los Mabs y oligonucleótidos. Un claro ejemplo del polimorfismo en rotavirus se ha observado a lo largo del mundo puesto que algunos serotipos G y P poco comunes, así como combinaciones inusuales van en incremento (Ramachandran *et al*, 1998; O'Halloran *et al*, 2002; Iturriza-Gómara *et al*, 2000; Rhaman *et al*, 2003), otro ejemplo es la predominancia de diferentes variantes genotípicas entre regiones o temporadas, un estudio realizado en México determinó que en el primer año de estudio el serotipo que más prevaleció fue G3, para el siguiente año, G1 fue el más predominante (Padilla Noriega *et al*, 1998).

Aún dentro de un mismo genotipo o serotipo se ha detectado la presencia de polimorfismos, esto se puede observar cuando un mismo serotipo no reacciona de con igual intensidad contra diversos Mabs específicos, es decir, la presencia de cepas monotípicas o de manera inversa cuando existen actividad heterotípica, es decir, un serotipo reacciona con Mabs dirigidos a otros serotipos. Algunos estudios a nivel molecular, realizados en Irlanda, en base al RFLP revelaron la presencia de dos linajes genéticos dentro del genotipo G1, uno de estos linajes estaba presente solo en esa región del mundo. De igual manera, pero para VP4 un análisis por RFLP demostró un modelo específico y único de un serotipo P. En base a lo anterior, es importante mencionar que las variantes intragenotípicas pueden dar indicios del origen evolutivo de la cepa y expliquen la presencia de algunas de las consecuencias ya mencionadas (Lizuka *et al*, 1993; O'Halloran *et al*, 2002; Arista *et al*, 2005).

Algunos estudios respecto al polimorfismo de cepas de rotavirus dentro de un mismo genotipo revelan que existe una relación entre mutaciones y la sintomatología de una infección por rotavirus. En un análisis realizado por Kirwood se compararon las secuencias de VP4, VP7 y NSP4 de dos cepas cuyo genotipo es G3P2, la diferencia es que unas eran sintomática y otras asintomática, el análisis demostró la presencia de variaciones nucleotídicas entre las cepas asintomáticas, para VP4 esas variaciones se detectaron entre los aminoácidos 133, 303 y 380, para VP7 las variaciones se presentaron en los residuos 27, 29, 42 y 238, para NSP4 la diferencia se presentó solo en el residuo 135. Otro estudio similar, esta vez comparando cepas sintomáticas y asintomáticas de genotipo G4P[6] se detectaron variaciones en los residuos 82, 114, 138 y 169 de NSP4, la región hipervariable VP8 mostró 10 variaciones nucleotídicas entre los aminoácidos 73-188, para VP7 los cambios se presentaron en el residuo 70 un sitio de glicosilación y en la región antigénica A (Pager *et al*, 2000). En ambos estudios, las mutaciones detectadas se localizan en las regiones de neutralización tanto para VP4 como para VP7 respectivamente, por otra parte NSP4 se observaron alteraciones en las regiones que se sugiere intervienen el procesos que desencadenan la diarrea. Como consecuencia de algunos estudios se sugiere que substituciones en los aminoácidos de NSP4, VP8 y VP7 pueden asociarse con la infección sintomática o asintomática.

6. MÉTODOS

6.1 MUESTRAS

De Octubre de 2004 a Marzo de 2005, se recolectaron muestras de heces de niños con gastroenteritis, ingresados en el Hospital General de Zona #6, en el Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) Constitución o ISSSTE Regional. Las tres instituciones se ubican en el área metropolitana de la ciudad de Monterrey, Nuevo León. 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.

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 mayor de 24 h, vómito, fiebre o uno de los síntomas mencionados. Como criterios de exclusión se consideró que la gastroenteritis sea de origen bacteriano y que el infante sea mayor de 5 años.

A cada médico y familiar de los pacientes se les solicitó llenar un cuestionario relacionado con la sintomatología del menor (apéndice 1). En base a esto se determinó la edad del paciente, sexo, número de días con diarrea o vómito, número de episodios diarreicos o de vómito en 24 h, la fiebre en °C, presencia de deshidratación moderada o severa, así como el tratamiento. Con esta información se evaluó la severidad de la gastroenteritis, en base a la puntuación propuesta por Ruuska (tabla1). En este tipo de evaluación el puntaje máximo es de 20, un puntaje menor de 8 se relaciona con una

gastroenteritis leve, de 9-14 con moderado y mayor de 15 como severo (Ruuska and Vesiraki, 1990).

6.2 EXTRACCION DE RNA

De muestras recolectadas se realizó una suspensión de heces al 20% en buffer de fosfatos (PBS). Para la extracción del RNA de rotavirus se utilizaron dos técnicas una por fenol cloroformo y otra por trizol, ambas técnicas se describen a continuación.

6.2.1 La extracción de RNA por fenol cloroformo

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Chomczynski y Sacchi con algunas modificaciones. Se homogenizó la suspensión de heces en vortex, se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm, se retiró 200 µl del sobrenadante, a éste se agregaron 200µl de buffer lisis (Tris Base, 8 mM; EDTA sal disódica, 76 mM; SDS, 45 mM; Mercaptoetanol, 0.16 M, NaCl, 0.7 M) se homogenizó en vortex por dos minutos, se adicionaron 200 µl de Fenol Saturado® (pH 8, Research Organics) se homogenizó en vortex, después se le adicionaron 200 µL de cloroformo se homogenizó nuevamente y se colocó en la centrifuga por 5 minutos a 12,000 rpm. En esta última etapa de la extracción se observaron 2 fases una acuosa y otra orgánica, en la fase acuosa se localiza el RNA viral y es por eso que se retiró ésta fase para colocarse en un tubo eppendorf estéril y etiquetado, posteriormente se almacenó a -20° C hasta su uso.

6.2.2 Extracción de RNA por Trizol

Las suspensiones de heces al 20% se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C, se recolectaron 150 µL del sobrenadante para transferirse a un tubo eppendorf de 1.5 mL, a éste se le agregaron 500 µL de TRI REAGENT® (Molecular Research Center,

<i>SINTOMATOLOGÍA</i>	<i>PUNTOS</i>	
<i>Días con diarrea</i>	<1	0
	1-4	1
	5	2
	6	3
<i>Evacuaciones en 24 h</i>	1-3	1
	4-5	2
	>6	3
<i>Días con vómito</i>	No vómitos	0
	1	1
	2	2
	3	3
<i>Episodios de vómito en 24 h</i>	0	0
	1	1
	2-4	2
	>5	3
<i>Temperatura en °C</i>	37 °C	0
	37.1 °C - 38.4 °C	1
	38.5 °C 38.9 °C	2
	>39 °C	3
<i>Deshidratación</i>	Nada	0
	Leve	2
	Moderada/severa	3
<i>Tratamiento</i>	Ninguno u otro	0
	Medicamento supervisado	1
	Hospitalizado	2
Gastroenteritis: Leve 0-8 puntos; Moderada 9-14 puntos; Severa >15 puntos		

Tabla 1. Evaluación de la severidad de la gastroenteritis según la puntuación propuesta por Ruuska y Vesikari en 1990.

Inc), se homogenizó en vortex 10 veces con intervalos de 3-5 minutos, se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente se añadieron 100µL de cloroformo, nuevamente se agitó en vortex por 10 ocasiones con intervalos de 3 a 5 minutos, se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos, se centrifugó por 5 minutos a 4° C, después de esto se observaron dos fases, una acuosa y una orgánica, se tomó la fase acuosa y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL etiquetado. A la fase acuosa se le

agregaron 400 µl de alcohol isopropílico se homogenizó por inversión y se incubó a -20° C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4° C, se retiró el sobrenadante, se adicionó 1 mL de etanol absoluto, se centrifugó a 12,000 rpm por 7 min. a 4° C, se retiró el sobrenadante hasta dejar un volumen de aproximadamente 50 µL, nuevamente se colocó en la centrifuga por 5 min. a 12,000 rpm a 4° C, se retiró el sobrenadante con cuidado de no remover la pastilla de RNA y se colocó en la campana de flujo laminar por 15 minutos para secar la pastilla, posterior a esto se resuspendió en 20 µL de agua nanopura estéril, después se almacenaron a -20° C hasta su uso.

El RNA viral obtenido por el método de fenol cloroformo se utilizó para visualizar el genoma de rotavirus en geles de poliacrilamida al 10% indicando las muestras positivas para rotavirus. A éstas se les realizó nuevamente una extracción pero ahora por el método de trizol, el RNA obtenido se sometió a una retrotranscripción seguido de una PCR para genotipificar las cepas de rotavirus detectadas.

6.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Una muestra de heces se consideró positiva para rotavirus al visualizarse el genoma viral segmentado característico del mismo (Verly and Cohen, 1977), en un gel de poliacrilamida al 10%. El RNA de doble cadena se sometió a una electroforesis en un sistema continuo a 100 Volts, por 4 horas con buffer de corrimiento tris-glicina 1X (Glicina, 150 mM; Tris, 20 mM) para visualizar los segmentos de RNA, el gel se tiñó por nitrato de plata, para ésto se retiró el gel de la cámara de electroforesis, después del tiempo establecido de corrimiento, y se transfirió a una solución fijadora (Etanol absoluto 10% y Ácido acético 0.5%) por 30 minutos, después se colocó en una solución de nitrato de plata 1X (AgNO₃, 10 mM) por 30 minutos, se lavó 2 veces con agua bidestilada, y se pasó a una solución reveladora (Formaldehído, 1.5%; NaOH, 0.75 M) por 10 o 15 minutos, se retiró ésta solución y se añadió ácido acético al 5% por 5

minutos para después colocarse en agua bidestilada y visualizarse en el transluminador (Macbeth prooflite® con luz blanca) (Herring *et al*, 1982; Mosai *et al*, 1984).

6.4 SINTESIS DE cDNA

El RNA viral se sometió a una retrotranscripción, el proceso se describe a continuación: Se preparó una mezcla con un primer externo, 0.1µM (Con2, para el gen VP4; End9, para VP7 o 10Beg16, para NSP4) y 2 µl de RNA geonómico de rotavirus, para un volumen final de 3.7 µl. Esta mezcla se colocó en el termociclador (TERMOHYBAID *PCRsprint*) a 94° C por 5 minutos, después incubó en hielo por 10 minutos. Mientras se preparó una segunda mezcla la cual contenía: Buffer 1X (Tris-HCl 50 mM; MgCl₂ , 8 mM; KCl, 30 mM; DTT, 1 mM; pH 8.5), MgCl₂ 7 mM; dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.64 mM y 2 U de transcriptasa reversa (MMLV Reverse Transcriptase®, BIOLINE) para un volumen final de 6.3 µl. El contenido de esta mezcla adicionó a la mezcla inicial (conteniendo el RNA y el oligonucleótido correspondiente), posteriormente se sometió a 42° C por 30 minutos, seguido de 5 minutos a 94° C, este último paso para eliminar los residuos de la retrotranscriptasa (Gentsch *et al*, 1992; Gouvea *et al*, 1990; Lee *et al*, 2000).

6.5 AMPLIFICACION DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA VP4, VP7 Y NSP4

El cDNA se sometió a una PCR para amplificar el gen completo, en el caso de VP7 y NSP4; y parcial, en el caso de VP4. La mezcla de PCR se realizó como a continuación se describe: Buffer, 1X (Tris-SO₄ pH 8.9, 600 mM, sulfato de amonio, 180 mM); MgCl₂, 1.5 mM; oligonucleótido sentido, 0.5 µM (Con 2, 5' ATTCGGACCATTATAACC 3' para VP4; Beg9, 5' GGCTTTAAAAGAGAGA-ATTTCCGTCTGG 3' para VP7 y 10Beg16, 5' TGGTCCGAGAGAGCGCGTG 3', para NSP4); oligonucleótido antisentido (Con 3, 5' TGGCTTCGCCATTTTATAGACA 3' para VP4; End9, 5' GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG 3', para VP7 y 10End722, 5' GACCATTTCCTTCCATTAAC 3', para NSP4); dNTP's (dATP, dGTP,

dCTP, dTTP), 0.4 mM; 1 U de Taq polimerasa (Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity) y 1 µl de cDNA, para un volumen final de 12.5 µL, posteriormente se sometió en el termociclador, a 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos para desnaturalizar el cDNA, 42 °C por 30 segundos para el alineamiento de los oligonucleótidos y después a 72 °C por 40 segundos para la extensión de las cadenas, en el caso de VP4 y VP7; para NSP4 las condiciones del termociclador fueron 30 ciclos de 94° C, por 45 minutos; 49°C, por 30 segundos y 72° C por 1 minuto 30 segundos. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1.5%, con bromuro de etidio, con luz ultra violeta en el transluminador (UVP, Transilluminator) (Gentsch *et al*, 1992; Gouvea *et al*, 1990; Lee *et al*, 2000).

6.6 GENOTIPIFICACIÓN

Para cada gen amplificado se determinó el genotipo correspondiente mediante una PCR semianidada. Para genotipificar VP7, VP4 y NSP4 se preparó una mezcla con los siguientes componentes: 0.2 µL de producto de PCR, Buffer, 1X (Tris-SO₄ pH 8.9, 600 mM, Sulfato de Amonio, 180 mM); MgCl₂, 1.5 mM; un oligonucleótido externo, 1 µM (Con3, para VP4; End9, para VP7 y 16End722, para NSP4; respectivamente); un oligonucleótido anidado, 1 µM (tabla 2); dNTP's, 0.4 mM; 1 U de Taq polimerasa (Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity) para un volumen final de 12.5 µL. Las condiciones en el termociclador fueron de 30 ciclos, de 90 seg a 94°C, 2 minutos a 42° C y 30 seg a 72° C. Los segmentos amplificados, representativos de cada genotipo, se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se visualizaron en el transluminador con luz uv.

<i>Gen</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Primer anidado 5'-3'</i>	<i>Segmento amplificado</i>
<i>VP4</i>	P[8]	1T-1 TCTACTTGGATAACG TGC	345 pb
	P[4]	2T-1 CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	483
	P[6]	3T-1 TGTTGATTAGTTGGATTCAA	267
	P[9]	4T-1 TGAGACATGCAATTGGAC	391
	P[10]	5T-1' ATCATAGTTAGTAGTCGG	583
<i>VP7</i>	G1	aBT1 CAAGTACTCAAATCAATGATGG	749
	G2	aCT2 CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	652
	G4	aDT4 CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	583
	G3	aET3 CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	374
<i>NSP4</i>	Wa	GGCTGGATATAAAGAGCAGG	450
	Kun	ATTGATAGTGCGATCGACTGG	280
	RRV	AACGATTGGGCTGAAGGTG	200

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos anidados utilizados para determinar los genotipos *VP4*, *VP7* y *NSP4*, respectivamente (Gentsch *et al*, 1992; Gouvea *et al*, 1990; Kudo *et al*, 2001).

6.7 DETERMINACION DE VARIANTES INTRAGENOTIPICAS

El análisis de polimorfismo intragenotípico se determinó mediante la técnica de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP, del inglés Single Strand Conformation Polymorphisms). 1µL de DNA producto de PCR semianidada se mezclaron con 9 µL de solución desnaturalizante (DLM, NaOH, 0.1 M; Formamida, 50%; xilen cyanole, 0.25%; azul de bromofenol, 0.25%) se incubó por 5 minutos a 95°C, después se colocó en hielo por 10 minutos, posteriormente se depositaron 6 µL de ésta mezcla en un gel de poliacrilamida de 8-10% en buffer TBE 0.6X(tris base, 0.5mM; borato, 50 mM; EDTA 7.5 mM) a 100 volts constantes por un tiempo de 3 h, para *VP4* y 5 hrs, para *NSP4*; para *VP7* el corrimiento fue de 75 volts por 16 h. El gel se tiñó por nitrato de plata, las bandas se visualizaron en el transluminador con luz blanca (Díaz *et al*, 2002; Kukita *et al*, 1997; Orita *et al*, 1989).

6.8 SECUENCIACIÓN

De cada modelo de migración, determinado por SSCP, se seleccionó una muestra para secuenciar. El producto de PCR se purificó de agarosa de bajo punto de fusión (Ultra Pure DNA grade[®], BIORAD) con el kit Turbo GenClean[®] (BIO 101[®] Systems) como recomienda el fabricante. La concentración del DNA purificado se midió en el espectrofotómetro a 260 nm; una posterior lectura a 280 nm demostró el nivel de pureza de las muestras. Se utilizaron de 10 ng de DNA por cada 100 pb (75 ng, para NSP4) y una concentración de 5 picomoles de un oligonucleotido externo (sentido o antisentido) para un volumen final de 16 µL. Las muestras listas para ser secuenciadas fueron enviadas a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos. En el IBT las muestras fueron secuenciadas por el método de secuenciación basado en fluorescencia Taq FS Dye Terminador, en el secuenciador ABIPRISM 310TM Genetic Analyzer. El análisis de las secuencias de DNA se realizó con el software sequencing Análisis 3.7 ABI PRISM (Applied Biosystem) y Clustal X.

6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación entre los distintos modelos y la severidad de la gastroenteritis se determinó utilizando una tabla de contingencia y la correlación de pearson, esto se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS.

7. RESULTADOS

7.1 ANÁLISIS DE MUESTRAS

De Octubre de 2004 a Marzo de 2005 se recolectaron un total de 123 muestras de heces de niños menores de 5 años, ingresados por gastroenteritis, en diversos hospitales del área metropolitana de Monterrey.

7.1.1 Detección del genoma viral por electroforesis

A las 123 muestras de heces recolectadas de niños con gastroenteritis, se les realizó una extracción de RNA por el método fenol cloroformo. El RNA purificado se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% por 4 horas, seguido de una tinción con nitrato de plata, posteriormente el genoma rotavirus se manifestó por la presencia de los 11 segmentos de RNA de doble cadena característicos del virus. De las muestras analizadas 64 (52%) resultaron positivas para rotavirus, mismas que mostraron un modelo de migración electrofóretico característico de rotavirus del grupo A (fig. 3).

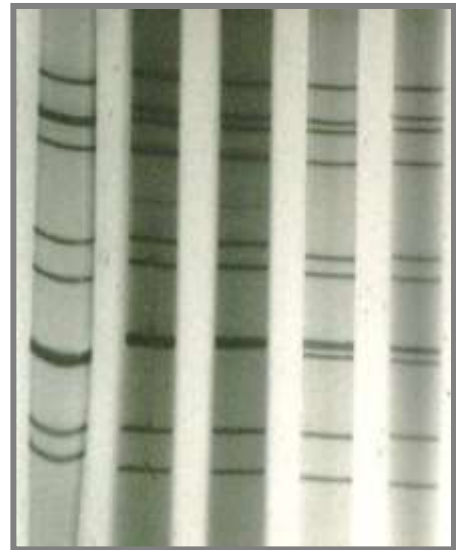


Fig. 3 Modelo de migración característico de rotavirus del grupo A.

7.2 DETERMINACION DE LOS GENOTIPOS

Una vez detectadas las muestras positivas para rotavirus, se prosiguió a realizar una extracción de RNA por el método de trizol. Al RNA obtenido se le determinó la concentración y pureza, para someterle a una RT-PCR y posteriormente una PCR semianidada para determinar los genotipos VP7, VP4 y NSP4.

7.2.1 Genotipo VP4

El gen que codifica para la proteína VP4 se amplificó por RT-PCR de manera parcial. Los oligonucleótidos Con 3 y Con2 se alinean en los nucleótidos 11-32 en el extremo 5' y 868-887 del extremo 3' respectivamente, por lo que el segmento amplificado es de 870 pb, mismos que corresponden al fragmento VP8* y aproximadamente 40 pb más. De las 64 muestras positivas para rotavirus 45 (70%) amplificaron para el segmento de 870 pb (Fig. 4a). Posteriormente, el producto de PCR se sometió a una PCR semianidada utilizando un oligonucleótido externo Con3 y 5 oligonucleótidos anidados, 1T-1 (que amplifica para genotipo P[8]), 2T-1 (genotipo P[4]), 3T-1 (P[6]), 4T-1 (P[9]) y 5T-1 (P[10]). Los resultados indicaron que 35 (54%), de las muestras que amplificaron el segmento de 870 pb, corresponden al genotipo P[8] (FIG 4b), y 10 (16%) no pudieron ser genotipificadas. Aunque algunas muestras no amplificaron para PCR, éstas se sometieron a PCR semianidada, como resultado solo 1 (2%) muestra resultó ser genotipo P[8], (gráfica 1).

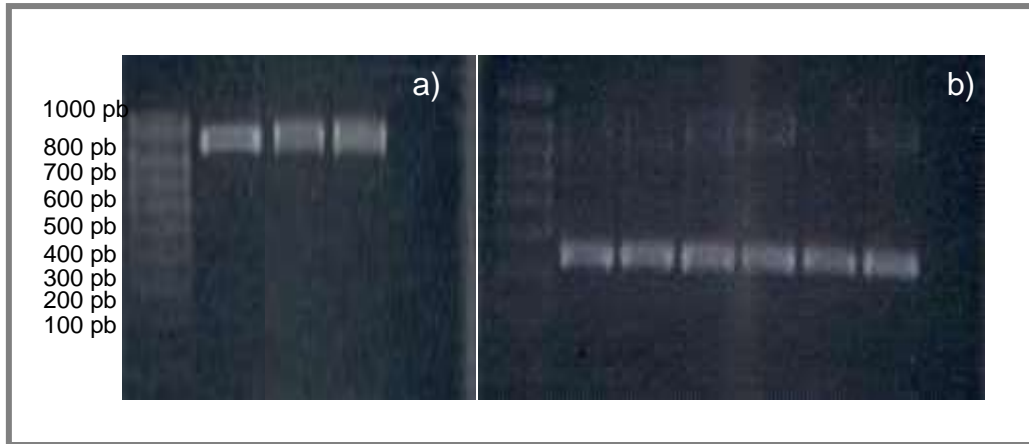
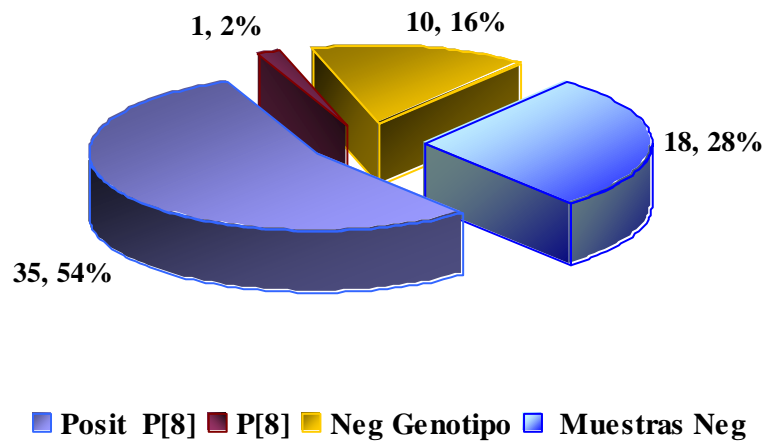


Fig. 4 Genotipo VP4. Gel de agarosa al 1.5% a) visualización del segmento de 870 pb fracción VP8* de VP4. b) segmento de 345 pb correspondientes al genotipo P[8].



Gráfica 1. Determinación de genotipos de VP4. De las 64 muestras positivas para rotavirus 35 (54%) amplificaron para el fragmento de 870 pb, mismas que correspondieron al genotipo P[8]. Una muestra (2%) no se amplificó en PCR pero sí en PCR semianidada, correspondiendo al genotipo P[8]. 10 (16%) amplificaron un segmento de 870 pb, pero no pudieron ser genotipificadas y 18 (28%) no amplificaron en PCR ni en PCR semianidada.

7.2.2 Genotipo VP7

Para determinar los genotipos G, se realizó una RT-PCR, para amplificar el gen completo de 1062 pb, seguido de una PCR semianidada, en ésta última etapa se utilizaron los oligonucleótidos anidados aBT1, aCT2, aDT4, aET3, que reconocen los genotipos G1, G2, G4 y G3 respectivamente, así como el oligonucleótido externo End 9. Los resultados demostraron la prevalencia del genotipo G1 (fig. 5), el cual se detectó en el 47 (73%) de las muestras, seguido de 2 G4 (3.12%) y un G3 en mucho menor proporción (1.5%) (gráfica 2).

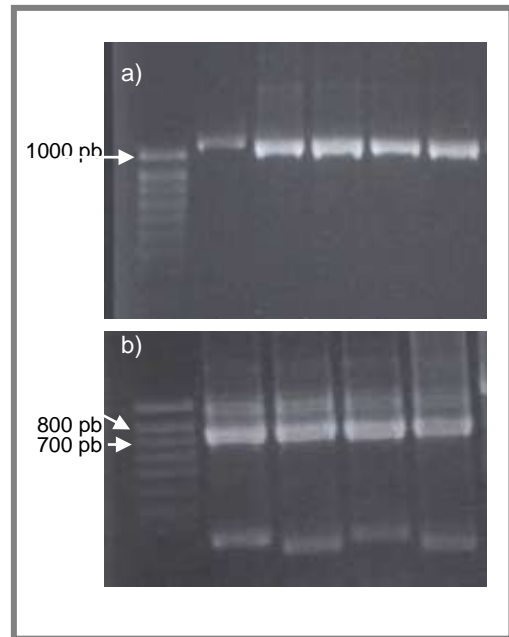


Fig. 5. Genotipos VP7. a) Gel de agarosa al 1.5% a) segmento de 1062. b) segmento de 749, mismo que corresponde al genotipo G1.

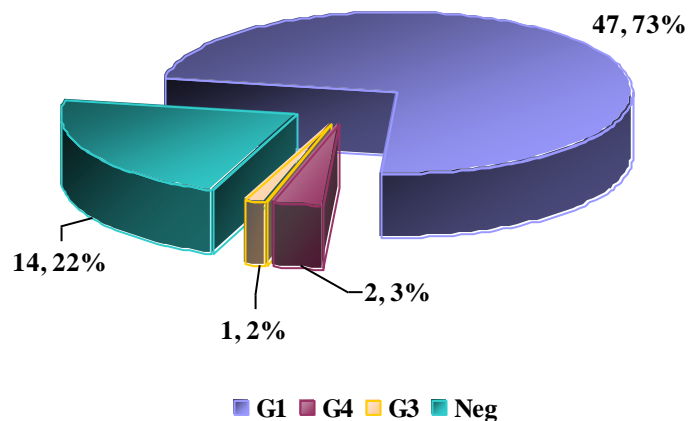


Grafico 2. Determinación de genotipos de VP7. De las muestras positivas para rotavirus 47 (73%) resultaron ser genotipo G1, 2 (3%) genotipo G4 y 1 genotipo G3, 14 (22%) resulto negativo.

7.2.3 Genotipo NSP4

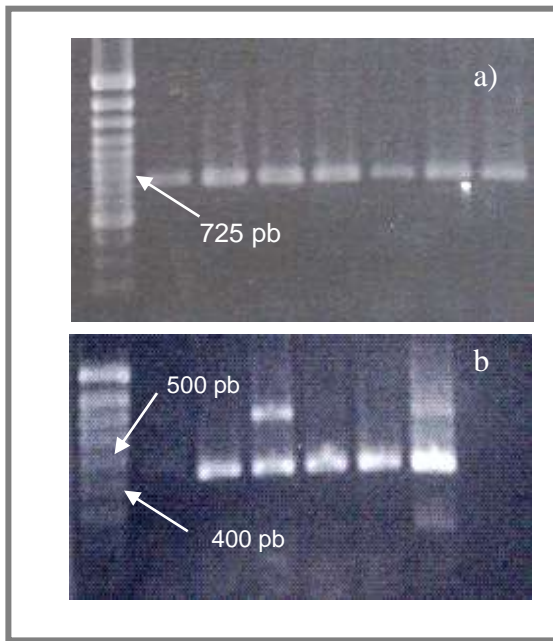
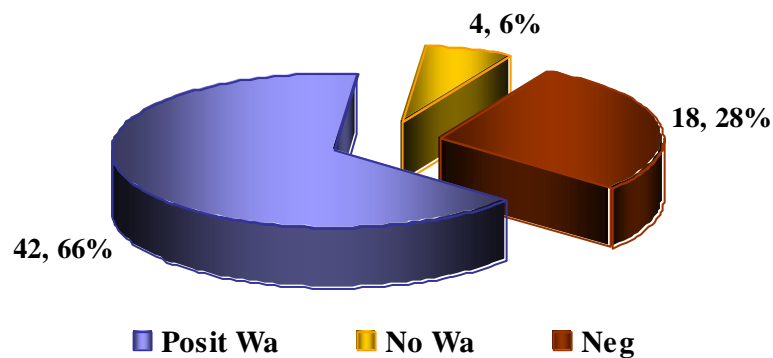


Fig. 6 Genotipo NSP4. Gel de agarosa al 1.5% a) segmento amplificado de 725 pb. b) segmento de 450 pb correspondiente al genotipo Wa.

En el caso de NSP4 se amplificó un segmento de 725 pb. El DNA producto de RT-PCR se sometió a una PCR semianidada junto con los oligonucleótidos 12End722, Wa, KUN, y RRV; el primero se alinea en el extremo 3' del gen y los tres restantes se alinean en los nucleótidos 286, 439 y 508; y amplifican los genotipos Wa, KUN y RRV, respectivamente. De las muestras analizadas en ésta temporada 42(65%) corresponde a genotipo Wa (Fig. 6), 4(16%) no pudieron ser genotipificadas, las restantes no amplificaron para el segmento de 725 pb (gráfica 3).



Grafica 3. Genotipos NSP4. El 66% de las muestras, es decir, 42 muestras resultaron genotipo Wa, 4 amplificaron el segmento de 725 pb, pero no correspondieron a ningún genotipo de los propuestos a analizar en el presente estudio, 18 (28%) muestras no amplificaron en PCR ni en PCR semianidada.

7.2.4 Cepas genotipificadas

De todas las cepas de rotavirus analizadas en el presente estudio, se determinaron los genotipos VP4, VP7 y NSP4. Con respecto a NSP4, de las 42 cepas que correspondieron al genotipo Wa, 20 (31.25%) resultaron genotipo G1P[8], 1 (1.56%) G4P[8], 4 (6.25%) P[8], 8 (12.5%) G1, 1 (1.56%) G3, 1(1.56%) G4 y 7 (11%) no amplificaron para G1 ni para P[8]. De las cepas restantes 9(14%) correspondieron a genotipo G1P[8], 2(3.12%) correspondieron a P[8], 10 (15.6%) a G1 y por último solo 1(1.56%) no amplificó para ninguno de tres los genotipos (gráfica 4).

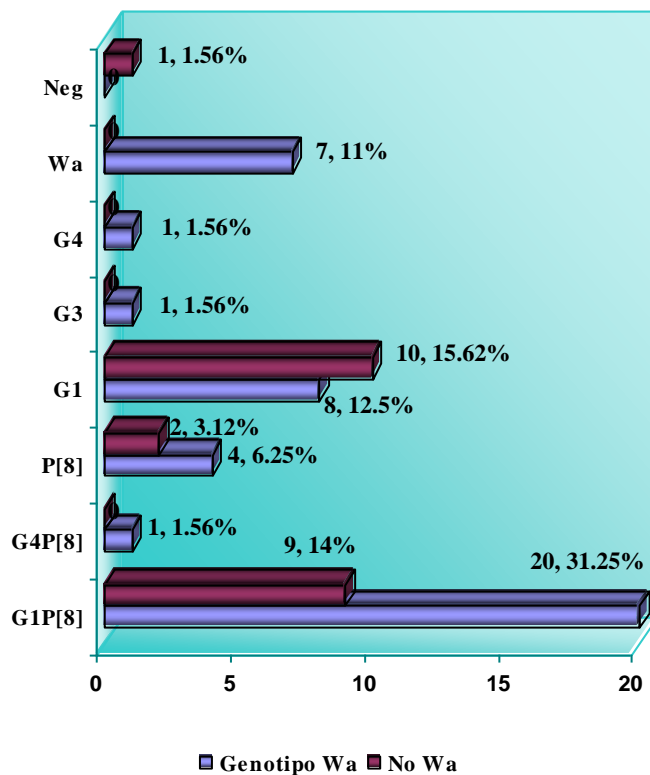


Grafico 4. Genotipos de las cepas analizadas durante el periodo de estudio. Las barras de color lila corresponden a las cepas genotipo Wa, las de color guinda son negativas para genotipo Wa, Kun o RRV. De las cepas Wa, 20 resultaron genotipo G1P[8], 1 G4P[8], 4 P[8], 8 G1, 1 G3, 1G4 y 7 no amplificaron para G1 ni para P[8]. De las cepas restantes 9 correspondieron a genotipo G1P[8], 2 correspondieron a P[8], 10 a G1 y por último solo 1 no amplificó para ninguno de tres los genotipos

7.3 POLIMORFISMO DE CADENA SENCILLA

El DNA producto de PCR semianidada se sometió a una desnaturarización para separar las dos cadenas de DNA, posteriormente se cargó en un gel de poliacrilamida al 8 o 10% en buffer TBE 0.6X, a 75 ó 100 volts, para un corrimiento de 4 a 16 h, por último se tiñó con nitrato de plata.

7.3.1 Genotipo P[8]

El segmento de 345 pb correspondiente al genotipo P[8] de VP4 se sometió a las condiciones ya mencionadas, como resultado se observó que solo 3 de las 64 cepas estudiadas mostraron un modelo de migración distinto. El modelo 1 estuvo presente en 34 (94%) muestras, los modelos 2 y 3 solo se presentaron en las muestras 34 y 51, respectivamente (fig. 7).

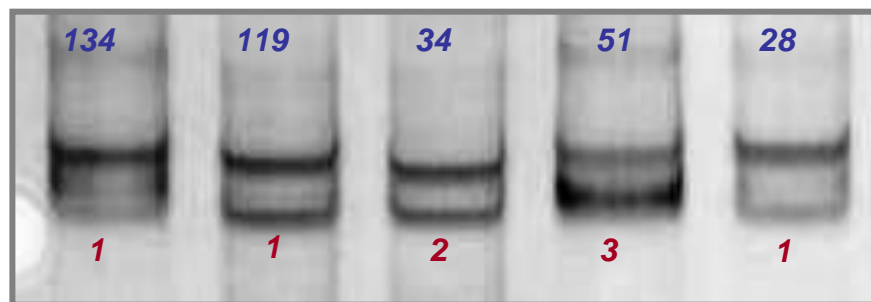


Fig. 7 SSCP de genotipos P[8]. El número de muestra se presenta en azul y los modelos en rojo.

7.3.2 Genotipo G1

Debido a que el genotipo G1 fue el más predominante de los genotipos de VP7, éstos se utilizaron para el análisis por SSCP. Los resultados indicaron la presencia de 3 modelos de migración distintos (fig. 8). Los modelos 2, y 3 correspondientes a las

muestras 28 y 34 fueron únicos, por otro lado el modelo 1 se presentó en 45 (90%) de las muestras analizadas.

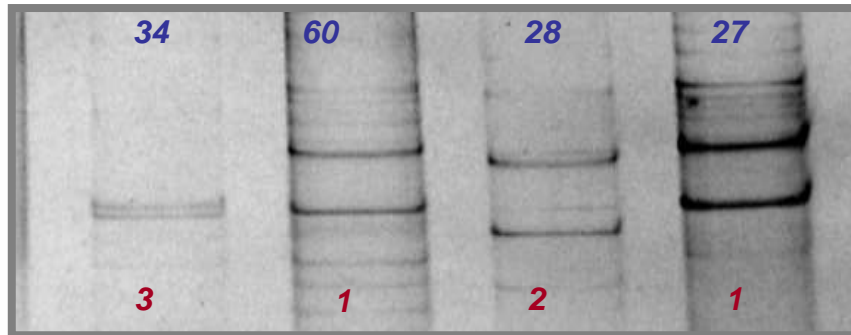


Fig. 8. SSCP de genotipos G1. El número de muestra se presenta en azul y los modelos en rojo.

7.3.3 Genotipo Wa

El análisis de los genotipos Wa de NSP4 por SSCP reveló la presencia de 5 distintos modelos de migración (fig. 9) El modelo 1 se presentó en 4 (9.5%) de las muestras analizadas; el modelo 2, en 13(30.9%); modelo 3, en 11(26.1%); modelo 4, en 10 (23.8%) y por último el modelo 5, en 4 (9.5%) de todas las muestras (gráfico 4).

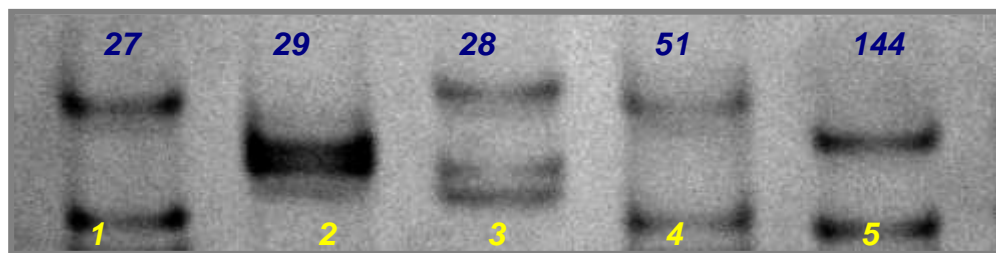


Fig. 9. SSCP de genotipos Wa. El número de muestra se presenta en azul y los modelos en amarillo.

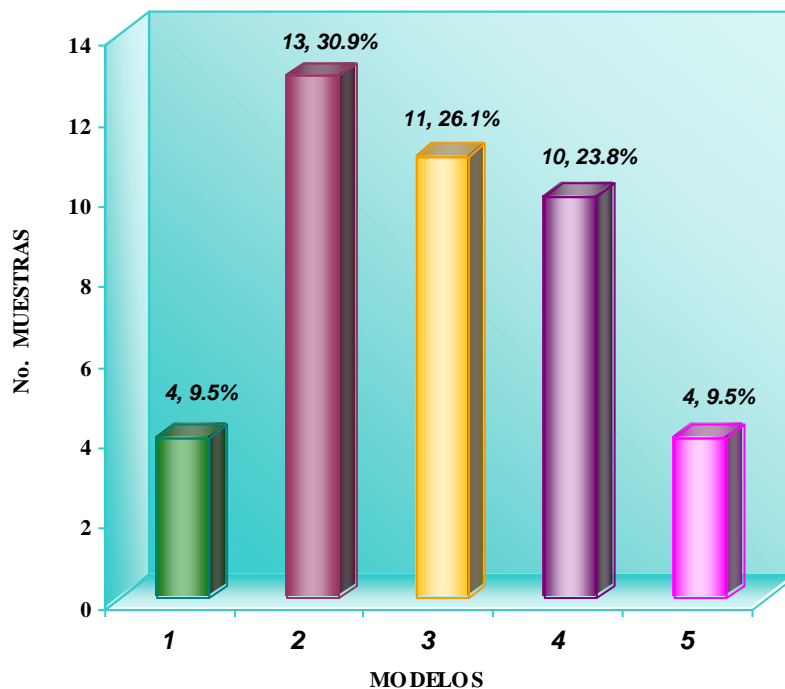


Gráfico 5. Modelos de migración resultado de SSCP de los genotipo Wa detectados en el presente estudio y el número de muestras que corresponden a cada uno de los 5 modelos.

7.4 SEVERIDAD DE LA GASTROENTERITIS

Para determinar la severidad de la gastroenteritis se registró la edad, número de días con diarrea o vómito, número de episodios diarreicos o de vomito en 24hrs, fiebre en °C, presencia de deshidratación moderada o severa, y tratamiento de cada menor muestreado. El análisis se realizó en base a la puntuación propuesta por Ruska y Vesikari, donde una puntuación menor de 8 fue indicio de una gastroenteritis leve, de 9-14 moderada y mayor de 15 severa (tabla 1). De las 64 muestras positivas para rotavirus 10 (16%) se relacionaron con una gastroenteritis leve, 36(56%) moderada y 18(28%) severa (gráfico 1).

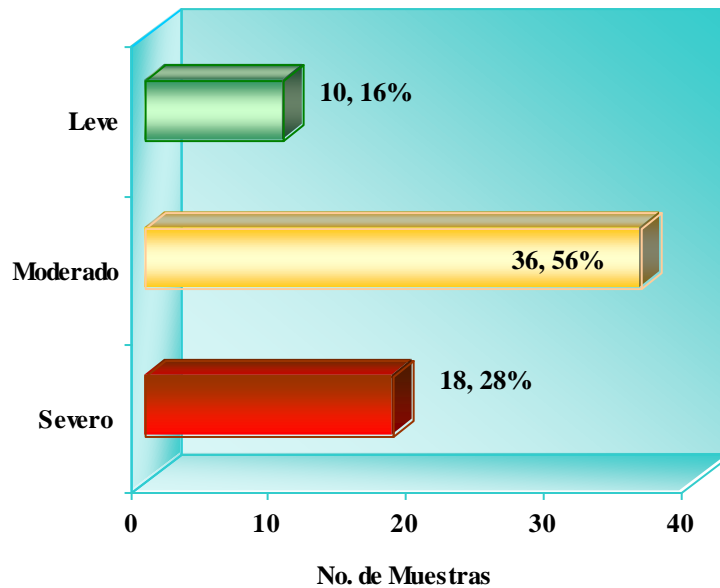


Gráfico 6. Análisis de la severidad de la gastroenteritis por rotavirus detectados de Octubre de 2004 a Marzo de 2005 en base a la puntuación propuesta por Ruuska y Vesikari. De las 64 muestras positivas para rotavirus 10 se relacionaron con una gastroenteritis leve, 36 con una moderada y 18 con severa.

7.5 SEVERIDAD DE LA GASTROENTERITIS Y EL POLIMORFISMO DE CADENA SENCILLA.

Dentro de los modelos se observaron casos de gastroenteritis de leve, moderado a severo. Para el modelo 2, 3 (23%) correspondieron a casos leves; 9 (70%) a moderados y solo 1 (8%) a severo. Para el tercer modelo son 3 casos leves (27%), 7(54%) moderados y 1(7.7%) severo. Con respecto al modelo 4 solo se presentaron 7 (70%) casos severos y 3(30%) moderados. Para el modelo 5 se observaron 3 (75%) leves y un (25%) moderado. La excepción a lo antes mencionado, fue el modelo 1 que solo presento 4 (100%) casos moderados (gráfico 6).

Para determinar si existe asociación entre la severidad de la gastroenteritis y los 5 modelos, detectados por SSCP en el gen que codifica para NSP4, se utilizó el programa estadístico SPSS, mediante el cual se realizó una tabla de contingencia y una correlación de Pearson., Los resultados mostraron un valor de la $X^2_{calculada} > X^2_{\alpha=0.05,8}$, por lo que la hipótesis nula se rechazó (tabla 3) demostrando que si existe una dependencia significativa entre los 5 modelos y la severidad de la diarrea. El análisis

por de Pearson indicó que no existe correlación entre los modelos y la puntuación global para evaluar la severidad de la gastroenteritis, sin embargo, al comparar los modelos con cada uno de los síntomas (con los valores asignados por Ruuska para determinar la severidad) se observó que solo el grado de deshidratación y la temperatura mostraban una correlación significativa ($P < 0.05$) (tabla 4).

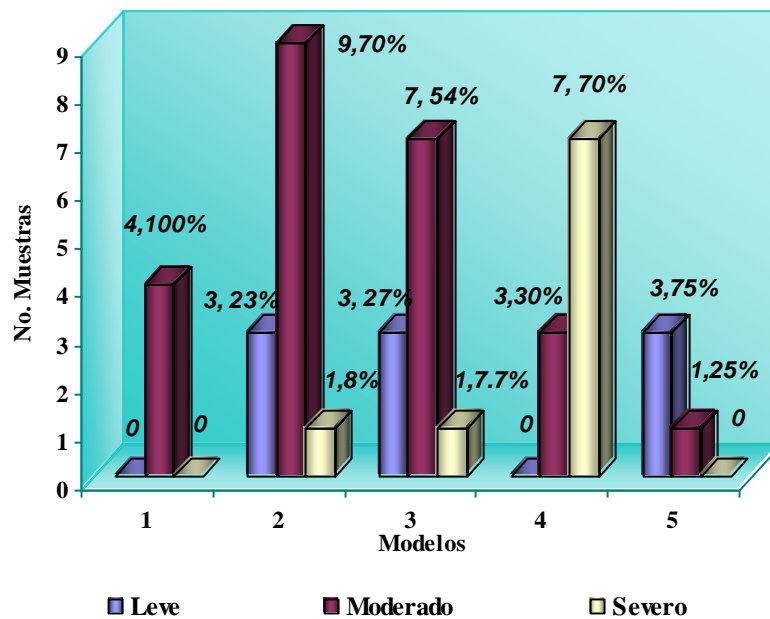


Gráfico 6. Modelos de migración resultado de SSCP de los genotipos Wa y el número de casos leves, moderados o severos que corresponden a cada genotipo. Modelo 2, 3 correspondieron a casos leves; 9 a moderados y solo 1 a severo. Modelo 3, se presentaron 3 casos leves, 7 moderados y 1 severo. Con respecto al modelo 4 solo se presentaron 7 casos severos y 3 moderados. Para el modelo 5 se observaron 3 leves y un moderado. Por último, modelo 1 presento 4 casos moderados.

<i>Severidad</i>	<i>Modelos</i>					<i>Total</i>
	1	2	3	4	5	
<i>Leve</i>	0	3	3	0	3	9
<i>Moderado</i>	4	9	7	3	1	24
<i>Severo</i>	0	1	1	7	0	9
<i>Total</i>	4	13	11	10	4	42

Tabla 3. Modelos y severidad la gastroenteritis. X^2 cal = 26.77, $X^2_{\alpha=0.05,8} = 15.507$
 H_0 = No hay dependencia entre hileras; H_A = Si hay dependencia entre columnas e hileras
Debido a que X^2 cal = 26.77 > $X^2_{\alpha=0.05,8} = 15.507$, se rechaza la hipótesis nula indicando que si hay dependencia entre columnas e hileras.

<i>P</i>	<i>Puntuación</i>						
	<i>Diarrea</i>	<i>Diarrea/24</i>	<i>Vom</i>	<i>Vom/24</i>	<i>Temp</i>	<i>Deshidrat.</i>	<i>Trat.</i>
	0.35	0.21	0.37	0.59	0.013	0.025	0.17

Tabla 4. Correlación entre la puntuación designada a los síntomas y los modelos. Valores $P < 0.05$ indican una correlación

7.6 SECUENCIACIÓN

Debido a que NSP4 presento mayor variabilidad genotípica, al mostrar 5 distintos modelos de migración, se seleccionó una muestra representativa de cada modelo para secuenciar. Las secuencias obtenidas se compararon con las almacenadas en la bases de datos de la NCBI, utilizando el programa BLAST. Las secuencias se alinearon utilizando el software Clustal X (Fig. 9 y 10). Posteriormente, se tradujo la secuencia de nucleótidos a proteínas con el programa EMBOSS:transeq del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI) y se alineó con otras secuencias ya reportadas.

Se observó que NSP4 es una proteína conservada, la región del los aminoácidos (aa) 119 a 126 no mostró variaciones por tratarse del sitio de unión a VP4 (que se

propone esta entre los aa 112 -148); por otra parte, la región de 167-173 que también se conservó en todas las secuencias, se conoce como sitio de unión a las partículas virales sin cápside externa. En la secuencia también se observan dos cisteínas altamente conservadas en las posiciones 66 y 74.

El árbol filogenético se realizó con el programa Treeview 16.6 (fig. 11), en éste se observó 2 agrupaciones, de arriba el grupo de secuencias provenientes de casos asintomáticos; seguido de otra agrupación de secuencias, en este caso provenientes de casos sintomáticos, las muestras correspondientes a los modelos analizados en este estudio se ubicaron junto a las secuencias de casos sintomáticos a manera de subgrupo.

Por otro lado, en el análisis de secuencias de aminoácidos con respecto a cada modelo, se observó que en la región de aminoácidos 115 a 140 se localizaron algunos cambios de aa, para la muestra correspondiente al modelo 1 se vio un cambio de L en lugar de H en la posición 134; el modelo 2, presentó una A en lugar de T y una K por R, en la posición 139 y 140; modelo 3, mostró una R en lugar de una K y una L en lugar de H, en las posiciones 131 y 134 respectivamente; el modelo 5 presentó una K en lugar de una M en el aa 115. El modelo 4 fue el único que no presentó variaciones en la región ya mencionada.

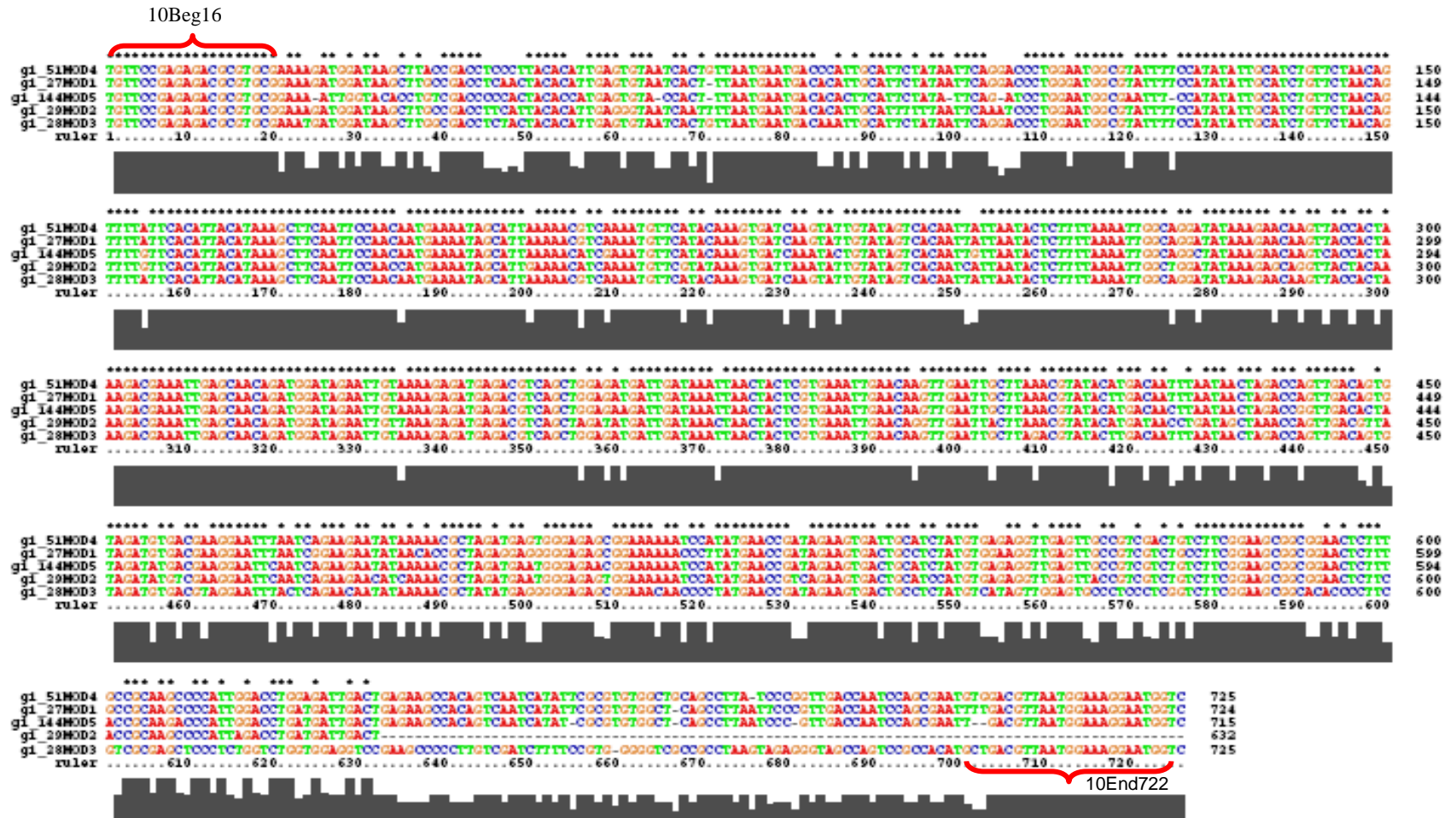


Fig 10. Alineación, con el programa Clustal X (versión 1.83), de las secuencias nucleotídicas. Se indica el número de muestra seguido del modelo de migración, obtenido por SSCP, correspondiente. En los recuadros se observa la ubicación de los primers 10Beg16 y 10End722, sentido y antisentido, respectivamente.

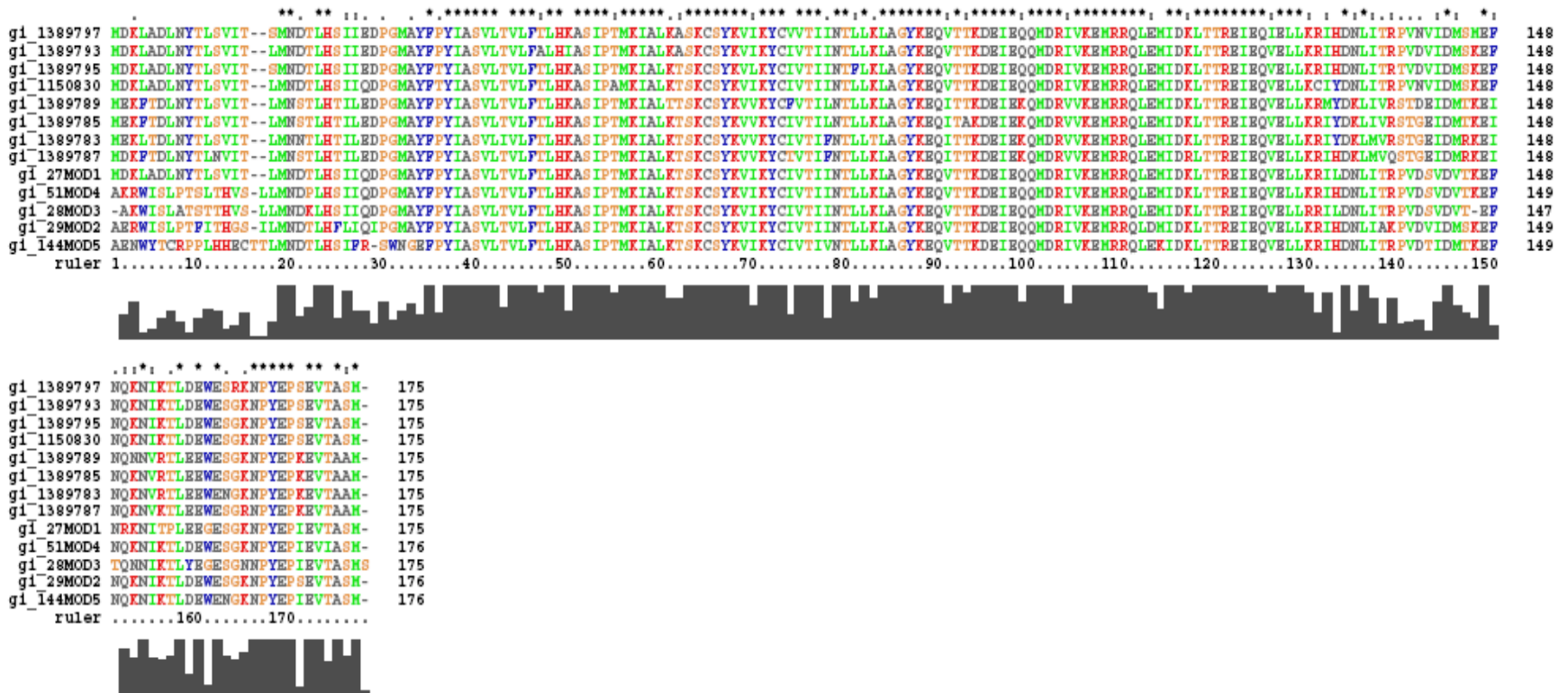


FIG 11. Alineación, con el programa Clustal X (versión 1.83), de las secuencias de proteínas. Se indica el número de muestra seguido del modelo de migración, obtenido por SSCP, correspondiente. Se observan dos cisteínas altamente conservadas en las posiciones 66 y 74, la región de los aminoácidos (aa) 119 a 126 no mostró variaciones por tratarse del sitio de interacción entre VP4 y NSP4.

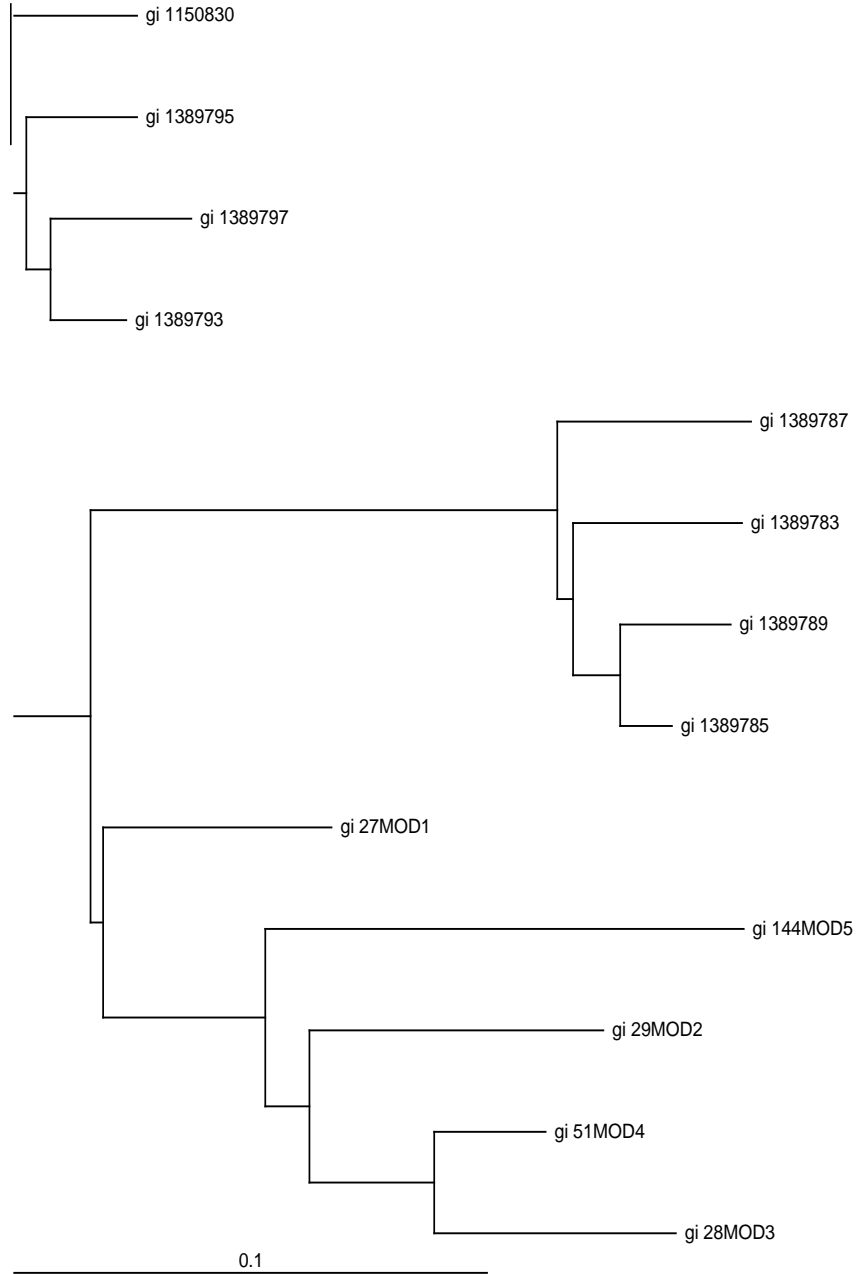


FIG 12. Árbol filogenético de la secuencias de NSP4 obtenidas en el presente estudio y de la base de datos de NCBI. Las muestras 1150830,189795, 1389797 y 1389793, corresponden a casos asintomáticos; 1389787, 1389783, 1389789, 1389785 a casos sintomáticos (Kirwood and Palombo, 1997)

8. DISCUSIÓN

Debido a que rotavirus afecta más de 111 millones de niños a nivel mundial tanto en países desarrollados como subdesarrollados, y que desde su descubrimiento se ha demostrado la presencia de múltiples variedades, se vislumbró la necesidad de estudiar este patógeno a niveles del polimorfismo genético (Parashar *et al*, 2003). Hasta hoy en día se han reportado estudios epidemiológicos de muchos lugares alrededor del mundo, desde América del norte, México, Sur América, Europa, Asia, África e Indonesia (Morris and Estes, 2001), ésto con la finalidad de determinar los genotipos de rotavirus que predominan en cada región y establecer una estrategia para el control de los mismos, desafortunadamente, la variabilidad dentro de los mismos genotipos, y la falta de estudios donde este polimorfismo se relaciona con la enfermedad, entre otros factores, han intervenido en el establecimiento de estas estrategias (Georges *et al*, 2002). Es por esta razón que se requiere de estudios a nivel molecular para determinar que genes se relacionan con la patología viral y enfocarnos en su estudio para el diseño de mejores estrategias preventivas o de control.

La gastroenteritis por rotavirus presenta síntomas como diarrea, vomito y fiebre; y dependiendo de la intensidad y frecuencia de los episodios diarreicos, pueden conducir a una deshidratación severa comprometiendo la vida del paciente (Morris and Estes, 2001); las causas pueden ser multifactoriales, influyendo por un lado las partículas virales y por otro la reacción del hospedero infectado. Es importante mencionar que el estado nutricional, y por ende el inmunológico, determina la pronta recuperación del menor ante una infección por rotavirus, es por esta razón que el mayor número de decesos infantiles se da en países en vías del desarrollo, donde las condiciones no son las apropiadas para una pronta recuperación. Sin embargo, a la par de lo anterior, es

importante resaltar que además de la condición fisiológica e inmunológica del paciente, existen evidencias de que algunos componentes virales pueden participar en la severidad de la gastroenteritis, como son: la existencia de cepas que infectan de manera asintomática (Kirwood *et al*, 1997), la factibilidad de atenuación de cepas patógenas (mediante varios pases en cultivo celular); así como, la presencia de una proteína que actúa como una enterotoxina, que desencadena procesos diarreicos (Raming *et al*, 2004).

En el presente estudio fue nuestro interés estudiar el polimorfismo de los genes que codifican para las proteínas de superficie VP4, VP7 y la proteína no estructural NSP4, debido a que algunos estudios relacionan estas proteínas con la patogénesis viral (Kirwood *et al*, 1997; Zhang *et al*, 1998; Zhang *et al*, 2000; Morris and Estes, 2001). Se ha establecido que las proteínas VP4 y VP7 son importantes para la adsorción y penetración del virus en las células huésped, además de que ambas inducen la producción de anticuerpos neutralizantes de manera independiente. Como factores de patogenicidad algunos investigadores han demostrado la intervención de estas dos proteínas en casos asintomáticos y sintomáticos (Kirwood *et al*, 1997; Estes, 2001); con respecto, a VP7 se ha mostrado que una simple mutación en el aminoácido 211 (cepa SA11) trae como consecuencia una resistencia a anticuerpos neutralizantes (Estes, 2001); de igual manera para VP4, mutaciones los residuos 72 a 217 (fragmento VP8) provocan una neutralización muy poco eficaz o nula (Steele *et al*, 1993; Kapikian *et al*, 2001). Sin embargo, aun y cuando son importantes en la penetración del virus a la célula blanco, no esta claro su papel en la generación de la enfermedad y por consecuencia su asociación con la severidad del cuadro clínico.

Por otro lado, durante la morfogénesis, en los procesos de replicación viral la proteína NSP4 actúa como un receptor intracelular en el retículo endoplásmico (ER), donde interactúan las denominadas partículas proteicas subvirales (Tian *et al*, 1996). NSP4 es la única proteína de rotavirus que ha sido considerada como una enterotoxina, debido a diversos estudios donde demuestran que la proteína completa, un fragmento de la misma (115-175) y ciertos péptidos (aa114-135 y aa131-140), se han relacionado con actividad enterotoxigénica, donde se induce un incremento en los niveles celulares de

Ca²⁺ hacia el RE, que desestabiliza la membrana plasmática y estimula la secreción de Cl⁻, provocando diarrea (Ball *et al*, 1996; Zhang *et al*, 2000; Morris and Estes, 2001, Estes, 2001). Aunque algunos investigadores coinciden en que mutaciones en los aminoácidos 114-140 se asocian con casos asintomáticos (Tian *et al*, 1996; Kirwoos *et al*, 1997; Zhang *et al*, 1998; Estes, 2001), otros no están de acuerdo con esto, debido a que sus estudios no relacionan casos asintomáticos con variaciones en dicha región de aminoácidos (Ward *et al*, 1997; Lee *et al*, 2000). Por lo tanto, aunque se ha establecido la participación de NSP4 en los procesos diarreicos, aún existe controversia respecto al papel que juegan las mutaciones en la manifestación de casos leves, moderados o severos de la gastroenteritis. Por tal motivo, parte del presente estudio analiza las variantes intragenotípicas en NSP4 y su asociación con la severidad de la gastroenteritis en niños infectados por rotavirus.

Para tener una mejor imagen de la participación de las mutaciones de los genes de estudio con la severidad de la gastroenteritis, se analizaron los genes que codifican para las proteínas VP7, VP4 y NSP4, todos correspondientes a un mismo genotipo, los cuales se relacionan a la cepa Wa (G1, P[8], y Wa NSP4); con el objetivo de determinar la presencia de variantes intragenotípicas y si estas variaciones se asocian a la severidad de la gastroenteritis (determinada en base a la escala de Ruuska). Con respecto a VP4 y VP7, aunque los resultados mostraron variaciones intragenotípicas como lo demuestra la presencia de tres modelos de migración por SSCP de cada uno de los genes de estas proteínas, no fue posible establecer una relación de la severidad de la gastroenteritis con alguno de estos modelos.

Estudios realizados por Mota-Hernández y colaboradores en el 2003 asocian a un genotipo de VP4 con los casos mas severos de diarrea, estudios previos realizados por Kirwood demostraron que mutaciones en regiones antigénicas importantes en VP7 y VP4 respectivamente, se relacionaban con infecciones asintomáticas. Nuestros resultados no indican que variantes intragenotípicas en VP4 y VP7 se correlacionen con casos severos, leves o moderados. Esto se debe, en base a lo anterior, a que VP7 y VP4 son determinantes para la infección y la neutralización viral, pero no así para la

severidad de la gastroenteritis. Por otra parte, se ha determinado la actividad de NSP4 como una enterotoxina que desencadena los procesos diarreicos, en ratones (Ciarlet *et al*, 2002; Raming *et al*, 2004). En infecciones naturales se han relacionado mutaciones en esta proteína con casos asintomáticos (Kirwoed *et al*, 1997).

Sin embargo, para NSP4 los resultados indicaron la presencia de 5 modelos de migración, mismos que se correlacionaron con la severidad de la gastroenteritis ($P < 0.05$), en base al grado de deshidratación. De cada modelo de variación, se seleccionó una muestra representativa y se obtuvo la secuencia de aminoácidos, dicha secuencia indicó la presencia de dos cisteínas altamente conservadas en la posición 66 y 74, previamente reportadas en otros trabajos (Estes, 2001), con respecto a la región 115-140, en la cual mutaciones se asocian a casos asintomáticos según algunos investigadores (Tian *et al*, 1996; Kirwood *et al*, 1997; Zhang *et al*, 1998), se observaron variaciones en los distintos modelos analizados: la muestra correspondiente al modelo 1 presentó un cambio de L en lugar de H en la posición 134; el modelo 2, presentó una A en lugar de T y una K por R, en la posición 139 y 140; modelo 3, mostró una R en lugar de una K y una L en lugar de H, en las posiciones 131 y 134 respectivamente; el modelo 5 presentó una K en lugar de una M en el aa 115. Cuando relacionamos cada uno de estos modelos con la gastroenteritis, un dato importante fue que el modelo 4 fue el único que no presentó variaciones en la región ya mencionada, y este mismo modelo fue el único en asociarse con casos moderados-severos. Cuando estos resultados se analizaron mediante un árbol filogenético se observó que las cepas de estudio muestran una menor distancia con respecto a secuencias de casos sintomáticos y a mayor distancia (otro grupo) de secuencias de casos reportados como asintomáticos.

Por tal motivo, en este estudio se encontró un aspecto diferente al encontrado por (Kirwood *et al*, 1997; Pager *et al*, 2000) ya que mientras ellos solo relacionaron la presencia de mutaciones con la presencia o ausencia de sintomatología, nosotros mostramos una correlación entre mutaciones con la en la región de aa 115-140 con los casos leves-moderados de la gastroenteritis. Estos resultados indican que la proteína NSP4 no solo puede influir en la presencia de infecciones sintomáticas o asintomáticas,

como lo han reportado algunos investigadores, si no también puede ser considerada como un factor de la severidad de la gastroenteritis en infecciones naturales.

9. CONCLUSIONES

Rotavirus es el principal agente etiológico de la gastroenteritis de origen viral. En el presente estudio, los genotipos que predominaron fueron G1P[8] en base a VP7 y VP4, respectivamente. En base a NSP4 solo se detectaron genotipos Wa. Las muestras pertenecientes a un mismo genotipo se sometieron a un análisis de polimorfismo de cadena sencilla mismo que reveló la presencia de 3 distintos modelos de migración para VP7 y VP4, para NSP4 indicó la presencia de cinco modelos distintos. A diferencia de VP4 y VP7 se estableció una correlación de modelos de migración de NSP4 y la severidad de la deshidratación ($P < 0.05$). Por tal motivo se secuenciaron cinco muestras representativas de cada modelo de migración, éste análisis demostró variaciones en las regiones 115-140, excepto para el modelo 4 el cual fue el único que no presentó variaciones en esta región, este modelo se relacionó con los casos moderados-severos, el modelo 1 se relacionó con casos moderados y los modelos 2,3 y 5 con casos moderados-leves. Estos estudios indican que NSP4 puede no solo asociarse a procesos diarreicos en modelos murinos, si no también en afecciones humanas, mutaciones en el gen que codifica para NSP4 no solo se relaciona con la presencia o ausencia de sintomatología, si no también con la severidad de la gastroenteritis particularmente con el grado de deshidratación. Por lo mismo, NSP4 podría considerarse como un importante factor de patogenicidad de rotavirus.

LITERATURA CITADA

- Arias C, Romero P, Alvarez V, López S. 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol.* 70:5832-5839.
- Arista S, Giammanco G, Grazia S, Colomba C, Martella V. 2005. Genetic variability among serotype G4 Italian human rotaviruses. *J Clin Microbiol.* 43: 1420-1425.
- Arista S, Vizzi E, Alaimo C, Palermo D, Cascio A. 1999. Identification of human rotavirus strain with the P [14] genotype by PCR. *J Clin Microbiol.* 37:2706-2708.
- 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. *Arch Virol.* 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. *J Clin Microbiol.* 38:252-259.
- Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. 1996. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science.* 272:101-4.
- Beards G, Pilford J, Thouless T, Flewett T. 1980. Rotavirus serotype by serum neutralization. *J Med Virol.* 5:231-237.
- Beards G. 1982. Polymorphism of genomic RNAs within rotavirus serotypes and subgroups. *Arch Virol.* 74: 65-70.
- Bishop R. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1:1281-1283.
- Bonsdorf, C. H. V., and L. Svensson. 1988. Human serogroup C rotavirus in Finland. *Scand J Infect Dis.* 20:475-478.
- Broome R, Vo P, Ward R, Clark H, Greenberg H. 1993. Murine rotavirus genes encoding outer capsid proteins VP4 and VP7 are not major determinants of host range restriction and virulence. *J Virol.* 67:2448-2455.

- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
- Ciarlet M, Conner M, Finegold M, Estes M. 2002. Group A rotavirus infection and age-dependent diarrheal disease in rats: a new animal model to study the pathophysiology of rotavirus infection. *J Virol.* 76: 41-57.
- Coulson. B. 1993. Typing of human rotavirus VP4 by an enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 31:1-8.
- Coulson B, Masendycz P. 1990. Measurement of rotavirus-neutralizing coproantibody in children by fluorescent focus reduction assay. *J Clin Microbiol.* 28:1652-1654.
- Coulson, B. S., C. D. Kirkwood, P. J. Masendycz. R. F. Bishop. And G. Gerna. 1996. Amino acids involved in distinguishing between monotypes of rotavirus G serotypes 2 and 4. *J Gen Virol.* 77:239-245.
- Contreras J, Menchaca G, Padilla-Noriega L, Tamez R, Greenberg H, Lopez S, Arias C. 1995. Heterogeneity of VP4 neutralization epitopes among serotype P1A human rotavirus strains. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2:506-508.
- Crawford M, Estes K, Charlet M, Barone Ch, O'Neal M, Cohen J, Conner M. 1999. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *J Virol.* 73:4813-4822.
- Díaz F, Farfán-ale J, Olson K, Loroño-pino M, Gubler D, Blair C, Black W, Beaty B. 2002. Genetic variation within the premembrane coding region of dengue viruses from the Yucatan peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 67: 93–101.
- Dong Y, Zeng C, Ball J, Estes M, Morris A. 1997. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:3960-3965.
- 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 M, Cohen J. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.* 53:410-448.
- Flewett T, Bryden A, Davies H, Woode G, Bridger J, Derrick J. 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *The Lancet.* 2: 61-63.
- Flores J, Midthun K, Hoshino Y, Green K, Gorziglia M, Kapikian A, Chanock R. 1986. Conservation of the fourth gene among rotaviruses recovered from asymptomatic newborn infants and its possible role in attenuation. *J Virol.* 60:972-979.

- Gentsch J, Woods P, Ramachandran M, Das B, Leite J, Alfieri A, Kumar R, Bhan M, Glass R. 1996. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis.* 174:30–36.
- 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. *J Clin Microbiol.* 30:1365–1373.
- Green K, Sears J, Taniguchi K, Midthun K, Hoshino Y, Gorziglia M, Nishikawa S, Urasawa A, Kapikian R, Chanok, Flores J. 1988. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene. *J Virol.* 62: 1812-1822.
- Greenberg H, Valdesuso J, van Wyke K, Midthun K, Walsh H, McAuliffe V, Wyatt R., Kalica A, Flores J, Hoshino Y. 1983. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J Virol* 47:267–275.
- Georges P, Mayers M. 2002. Intossusception, rotavirus, and oral vaccines: summary of a workshop. *Pediatrics.* 110:1-6
- Ghosh S, Naik T. 1989. Detection of large number of subgroup 1 human rotaviruses with a long rna electropherotype. *Arch Virol.* 105:119-127.
- 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. *J Clin Microbiol.* 28:276–282.
- Gorziglia M, Green K, Nishiwaka K, Taniguchi K, Jones R, Kapikian A, Chanok R. 1988. Sequence of the fourth gene of human rotavirus recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J Virol.* 62:2978-2984.
- Gulati B, Nakagomi O, Koshimura Y, Nakagomi T, Pandey R. 1999. Relative frequencies of G and P types among rotaviruses from indian diarrheic cow and buffalo calves. *J Clin Microbiol.* 37: 2074-2076.
- Greenberg H, Valdesuso J, van Wyke K, Midthun K, Walsh H, McAuliffe V, Wyatt R, Kalica A, Flores J, Hoshino Y. 1983. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J Virol.* 47:267–275.
- Halaihel N, Liévin V, Ball J, Estes M, Alvarado F, Vasseur M. 2000. Direct inhibitory effect of rotavirus NSP4(114-135) peptide on the Na⁺-D-glucose symporter of rabbit intestinal brush border membrane. *J Virol.* 74: 9464-9470.

Hall G, Bridger J, Parsons K, Cook R. 1993. Variation in rotavirus virulence: a comparison of pathogenesis in calves between two rotaviruses of different virulence. *Vet Pathol.* 30:223-233.

Heide R, Koopmans M, Shekary N, Houwers D, van Duynhoven Y, van der Poel. 2005. Molecular characterization of human and animal group A rotaviruses in Netherland. *J Clin Microbiol.* 43: 669-675.

Herring A, Inglis N, Ojeh C, Snodgrass D, Menzies J. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol.* 16: 473-477.

Holmes I, Ruck B, Bishop R, Davidson G. 1975. Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. *J Virol.* 16:937-943.

Horie Y, Masamune O, Nakagomi O. 1997. Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins identified by sequence analysis. *J gen Virol.* 78:2341-2346.

Hoshino Y, Kapikian A. 1996. Clasification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes. *Arch Virol.* 12:99-111.

Hoshino Y, Kapikian A. 2000. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology immunity, and vaccine development. *J Health Popul Nutr.* 18:5-14.

Hoshino Y, Sereno M, Midthun K, Flores J, Kapikian A, Chanock R. 1985. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82:8701-8704.

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. *J Clin Microbiol.* 38:898-901.

Iturriza-Gómara M, Kang G, Mammen A, Jana A, Abraham M, Desselberg U, Brown D, Gray J. 2004. Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *J Clin Microbiol.* 42:2541-2547.

Kapikian A, Hoshino Y, Chanock R. 2001. Rotaviruses. 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. 1787-1833.

Kapikian A. 1996. Overview of viral gastroenteritis. *Arch Virol.* 12:7-19

Kirwood C, Coulson B, Bishop R. 1996. G3P2 rotaviruses causing diarrhoeal disease in neonates differ in VP4, VP7 y NSP4 sequence from G3P2 strains causing asymptomatic neonatal infection. *Arch Virol.* 141:1661-76.

Kirwood C, Palombo E. 1997. Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein NSP4. *Virology*. 236:258-265.

Kudo S, Zhou Y, Cao X, Yamanishi S, Nakata S, Ushijima H. 2001. Molecular characterization in the VP7, VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 4 (G4) isolated in Japan and Kenya. *Microbiol Immunol*. 45: 167-171.

Kukita Y, Tahira T, Sommer S, Hayashi K. 1997. SSCP Analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum Mut*. 10:400-407.

Kuzuya M, Hamano M, Nishijima M, Fujii R, Ogura H, Tanaka M, Oda A, Kusaka S, Naitou M. An outbreak of acute gastroenteritis caused by human group C rotavirus in a welfare institution in Okayama prefecture. *Jpn J Infect Dis*. 58: 255-257.

Lanata C, Black R, Burton B, Midthun K, Davidson B. 1992. Safety, immunogenicity, and efficacy of one or three doses of the rhesus tetravalent rotavirus vaccine in Lima, Peru. *Vaccine*. 10:273.

Larralde G, Gorziglia M. 1992. Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4. *J Virol*. 66:7438-7443.

Lee C, Wang Y, Kao C, Zao C, Lee C, Chen H. 2000. NSP4 gene analysis of rotaviruses recovered from infected children with and without diarrhea. *J Clin Microbiol*. 38:4471-4477.

Lizuka, Chiba M, Masamune O, Gerna Giuseppe, Nakagomi O. 1993. Molecular characterization of human rotavirus VP4 genes by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. *Microbiol Immunol*. 37:729-735.

Lundgren O, Peregrin A, Persson K, Kordasti S, Uhnoo I, Svensson L. 2000. Role of enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*. 287:491-495.

Ludert J, Feng N, Yu J, Broome R, Hoshino Y, Greenberg H. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein *in vitro* and *in vivo*. *J Virol*. 70:487-493.

Ludert J, Krishnaney A, Burns J, Vo P, Greenberg H. 1996. Cleavage of Rotavirus VP4 *in vivo*. *J Gen Virol*. 77:391-395.

Ludert J, Ruiz M, Hidalgo C, Liprandi F. 2002. Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation. *J Virol*. 76:6643-6651.

Lundgren O, Svensson L. 2001. Patogénesis of rotavirus diarrhea. *Microbes and Infection*. 3:1145-1156.

Mackow E, Barnett E, Chan H, Greenberg H. 1989. The rhesus rotavirus outer capsid protein VP4 functions as a hemagglutinin and is antigenically conserved when expressed by a baculovirus recombinant. *J Virol.* 63:1661-1668.

Mackow E, Shaw R, Matsui S, Vo P, Dang M, Greenberg H. 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc Natl Acad Sci USA.*85:645-649.

Martella V, Ciarlet M, Pratelli A, Arista S, Terio V, Elia G, Cavalli A, Gentile M, Decaro N, Greco G, Cafiero M. A., Tempesta M, Buonavoglia C. 2003. Molecular analysis of the VP7, VP4, VP6, NSP4, and NSP5/6 genes of a buffalo rotavirus strain: identification of the rare P[3] rhesus rotavirus-like VP4 gene allele. *J Clin Microbiol.* 41:5665-5675.

McNeal M, Sestak K, Choi A, Basu M, Cole M, Aye P, Bohm R, Ward R. 2005. Development of a rotavirus-shedding model in rhesus macaques, using a homologous wild-type rotavirus of a New P genotype. *J Virol.* 79: 944-954.

Mota-Hernandez F, Calva J, Gutierrez C, Villa-Contreras S, Arias C, Padilla-Noriega L, Guiscafré-Gallardo H, Cedillo R, Herrera I, Puerto F. 2003. Rotavirus diarrhea severity is related to the VP4 type in Mexican children. *J Clin Microbiol.* 41:3158-3162.

Morris A, Estes M. 2001. Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial Mucosal Interactions VIII: Pathological consequences of rotavirus infection and enterotoxin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281: G303-G310.

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.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci.* 86:2766-2770.

Padilla-Noriega L, Arias C, Lopez S, Puerto F, Snodgrass D, Taniguchi K, Greenberg H. 1990. Diversity of rotavirus serotypes in Mexican infants with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 28:1114-1119.

Padilla-Noriega L, Mendez-Toss M, Menchaca G, Contreras J, Romero-Guido P, Puerto F, Guiscafré H, Mota F, Herrera I, Cedillo R, Muñoz O, Clava J, Guerrero M, Coulson B, Greenberg H, López S, Arias C. 1998. Antigenic and genomic diversity of human rotavirus VP4 in two consecutive epidemic seasons in Mexico. *J Clin Microbiol.* 36: 1688-1692.

- Pager C, Alexander J, Steele A. 2000. South African G4P[6] asymptomatic and symptomatic neonatal rotavirus differ in their NSP4, VP8 and VP7 genes. *J Med Virol.* 62(suppl. 2): 208 (Abstracts).
- Parashar U, Hummelman G, Bresee J, Miller M, Glass R. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 9:565-571.
- Patton J, Hua T, Mansell E. 1993. Location of intrachain disulfide bonds in the VP5 and VP8 trypsin cleavage fragments of the rhesus rotavirus spike protein VP4. *J Virol.* 67:4848-4855.
- Pérez M, Merrin S, Scardino D, Bégué R. 2002. Evaluation of rotavirus vaccine effectiveness in a pediatric group practice. *Am J Epidemiol.* 156: 1049 - 1055.
- Prasad B, Rothngel R, Zeng C, Jakana J, Lawton J, Chiu W, Estes M. 1996. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature.* 382:471-473
- Prasad B, and Estes M. 1997. Molecular basis of rotavirus replication: structure-function correlations, p. 239–278. In W. Chiu, M. Burnett, and R. Garcea (ed.), *Structural Biology of Viruses*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Rahman M, Leener L, Goegebuer T, Wollants E, Van der Dock I, Van Hoves L, Ranst M. 2003. Genetic characterization of a novel, naturally occurring recombinant human G6P[6] rotavirus. *J Clin Microbiol.* 41:2088-2095.
- Rahman M, Matthijnsens J, Nahar S, Podder G, Sack D, Azim T, Van Ranst M. 2005. Characterization of a novel P[25],G11 human group A rotavirus. *J Clin Microbiol.* 43: 3208–3212.
- 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. *J Clin Microbiol.* 36: 3223-3229.
- Ramig R. 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol.* 78:10213-10220.
- Rennels M, Glass R, Dennehy P, Bernstein D, Pichichero M, Zito E, Mack M, Davidson B, Kapikian A. 1996. Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines--report of the national multicenter trial. *Pediatrics.* 97:7-13.
- Riepenhoff-Talty M, Morse K, Wang C, Shapiro C, Roberts J, Welter M, Allen M, Evans M, Flanagan T. 1997. Epidemiology of C rotavirus infection in western new york women of childbearing age. *J Clin Microbiol.* 35:486-488.

- Ruuska T, Vesikari T. 1991. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis.* 22: 259-67
- Sanekata T, Ahmed M, Kader A, Taniguchi K, Kobayashi N. 2003. Human group B rotavirus infections cause severe diarrhea in children and adults in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 41: 2187-2190.
- Santos N, Lima R, Pereira C, Gouvea V. 1998. Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 36:2727–2729.
- Shaw R, Hempson S, Mackow E. 1995. Rotavirus diarrhea is caused by nonreplicating viral particles. *J Virol.* 69: 5946-5950.
- Steele A, García D, Sears J, Gerna G, Nakagomi O, Flores J. 1993. Distribution of VP4 gene alleles in human rotaviruses by using probes to the hyperdivergent region of the VP4 gene. *J Clin Microbiol.* 31:1735-1740.
- Tamiguchi K, Nishikawa K, Urasawa T, Urasawa S, Midthun K, Kapikian A, Gorziglia M. 1989. Complete nucleotide sequence of the gene encoding VP4 of a human rotavirus (Strain K8) which has unique VP4 neutralization epitopes. *J Virol.* 63: 4101-4106.
- Tian P, Ball J, Zeng C, Estes M. 1996. Rotavirus Protein Expression is important for virus assembly and pathogenesis. *Arch Virol.* 12:69-77.
- Unicomb L, Coulson B, Bishop R. 1989. Experience with an enzyme immunoassay for serotyping human group A rotaviruses. *J Clin Microbiol.* 27: 586-588.
- Unicomb L, Podder G, Gentsch J, Woods P, Hasan K, Faruque A, Albert M, Glass R. 1999. Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995. *J Clin Microbiol.* 37:1885–1891.
- Urasawa T, Taniguchi M, Kobayashi A, Hasegawa Y, Urasawa S. 1993. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of a unique human rotavirus strain Mc35 with subgroup I and serotype 10 Specificity. *Virology.* 195: 766-771.
- Vesikari T, Rautanen T, Varis T, Beards G, Kapikian A. 1990. Clinical Trial in Children Vaccinated between Two and Five Months of age. *Am J Dis Child.* 144:285–289.
- Verly E, Cohen J. 1977. Demonstration of size variation of RNA segments between different isolates of calf rotavirus. *J gen Virol.* 35:583-586.
- Ward R, Knowlton D, Schiff G, Hoshino Y, Greenberg H. 1988. Relative concentrations of serum neutralizing antibody to VP3 and VP7 proteins in Adults Infected with a Human Rotavirus. *J Virol.* 62:1543–1549.

Ward R, Mason B, Berstein B, Sander D, Smith V, Zandle G, Rappaport R. 1997. Attenuation of a human rotavirus vaccine candidate did not correlate with mutations in the NSP4 protein gene. *J Virol.* 71:6267-6270.

Ward R, McNeal J, Clemens J, Sack D, Rao M, Huda N, Green K, Kapikian A, Coulson B, Bishop R, Greenberg H, Gerna G, Schiff G. 1991. Reactivities of serotyping monoclonal antibodies with culture-adapted human rotaviruses. *J Clin Microbiol.* 29: 449-456.

Wickelgren I. 2000. How rotavirus causes diarrhea. *Science.* 287:409-411.

Woode, G. N., J. C. Bridger, J. M. Jones, T. H. Flewett, A. S. Bryden, H. A. Davies, and G. B. B. White. 1976. Morphological and Antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice, and foals. *Infect Immunol.* 14:804-810.

Wu H, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S. 1998. Serological and genomic characterization of human rotaviruses detected in China. *J Med Virol.* 55:168-176.

Wyatt R, Mebus C, Yolken R, Kalica A, James H., Kapikian A, Chanock R. 1975. Rotaviral Immunity in Gnotobiotic calves: Heterologous resistance to human virus induced by bovine virus. *Science* 203:548–550.

Zao C, Yu W, Kao C, Taniguchi K, Lee C, Lee CN. 1999. Sequence Analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. *J Gen Virol.* 80:1407-1415

Zhang M, Zeng C, Dong Y, Ball J, Saif L, Morris A, Estes M. 1998. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *J Virol.* 72:3666-3672.

Zhang M, Zeng C, Morris A, Estes M. 2000. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J Virol.* 74:11663-11670.

APENDICE



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACION NUEVO LEON

UNIDAD MÉDICA No. _____

**SOLICITUD DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS
PARA CASOS DE ROTAVIRUS**

DATOS DEL PACIENTE

NOMBRE _____ EDAD _____
 paterno materno nombre

DIRECCION _____ TELEFONO _____

MUNICIPIO _____ ESTADO _____



SINTOMAS

VOMITO
DIARREA AGUDA
FIEBRE 38-39°C
NAUSEAS

DOLOR ABDOMINAL
DESHIDRATACION
FATIGA
OTROS _____

		ESTUDIO DE LABORATORIO		
--	--	-------------------------------	--	--

Fecha de la Toma ____ / ____ / ____
 día mes año

Tipo de muestra

Heces fecales

Nombre del
Médico: _____

Institución: _____

Unidad Médica _____

Resultado: Positivo _____ Negativo _____

Enviar copia a la Coordinación Delegacional de Salud Pública



SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA
VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE DIARREA POR ROTAVIRUS

FOLIO: /



FORMATO ROTAVE-2-01

I. IDENTIFICACION		
NOMBRE: _____ APELLIDO PATERNO APELLIDO MATERNO NOMBRE(S)		
FECHA DE NACIMIENTO: / / ESTADO: _____ MUNICIPIO: _____		
GENERO: [M] [F] EDAD: / / Años Meses Días		
DOMICILIO ACTUAL: _____ Calle y número Colonia y/o Localidad Municipio y Estado		
II. DATOS DE LA UNIDAD TRATANTE		
NOMBRE: _____ CLAVE: _____		
II. NOTIFICACION		
A. FECHA DE NOTIFICACION	b) Número máximo en 24 h	VI. TERMINO DE LA ATENCION MEDICA
[][][][][][]	c) Número de días con diarrea	A. MOTIVO
día mes año	[][][]	1. MEJORIA
	C. VOMITO	2. ALTA VOLUNTARIA
B. FUENTE DE INFORMACION	a) Número en 24 horas	3. DEFUNCION
[] []	[][][]	B. FECHA DE TERMINO DE LA ATENCION MEDICA
1.-REGISTRO HOSPITALARIO	b) Número de días con vómito	[][][][][][]
2.-VIG. EPID. ACTIVA	[][][]	día mes año
3.-CERT. DE DEFUNCION	D. TEMPERATURA MAXIMA EN GRADOS CELSIUS	
	[][][][]	
III. ANTECEDENTES	E. ESTADO DE HIDRATACION	VII. LABORATORIO
A. ¿SE ALIMENTA AL PECHO MATERNO?	1.-SIN DESHIDRATACION	A. FECHA DE TOMA DE MUESTRA
[] []	2. CON DESHIDRATACION	[][][][][][]
1.-SI	3. CHOQUE HIPOVOLEMICO	día mes año
2.-NO	V. ATENCION MEDICA EN EL HOSPITAL	B. LUGAR DE PROCESAMIENTO
B. Edad de inicio:	A. FECHA DE INICIO DE LA ATENCION MEDICA	1 LOCAL
1.-Menor de 1 mes	[][][][][][]	2.LAB. ESTATAL
2.-De 1 a 3 meses	día mes año	3.INDRE
3.-Mas de 3 meses		4.OTROS
C. Edad de término	B. TRATAMIENTO(S) RECIBIDO:	C. FECHA DE PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA
[][][]	1. PLAN A	[][][][][][]
IV. CARACTERISTICAS CLINICAS	2. PLAN B	día mes año
A. FECHA DE INICIO	3. PLAN C	D. TECNICA EMPLEADA
[][][][][][]	4. ANTIBIOTICOS	1. ROTAFORESIS
día mes año	C. SERVICIO(S) DE ATENCION	2.ELISA
B. EVACUACIONES	1 - CONSULTA EXTERNA	3.OTROS
[] []	2. HIDRATACION ORAL	E. RESULTADO
a) CONSISTENCIA	3. URGENCIAS	1 POSITIVO
1.-LIQUIDA	4. HOSPITALIZACION	2.NEGATIVO
2.-PASTOSA		
3.-FORMADA		

ENVIAR DE COPIA A COORDINACIÓN DELEGACIONAL DE SALUD PÚBLICA

