



EL SABER DE MIS HIJOS
HARA MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS

“DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ASTROVIRUS Y ROTAVIRUS EN NIÑOS CON GASTROENTERITIS”

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO BIOLÓGO CLÍNICO

PRESENTA

PATRICIA MARÍA CALLEJA GARCÍA

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis profesional de **Patricia María Calleja García**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que se a aceptada como requisito parcial para obtener el título de Químico Biólogo Clínico.



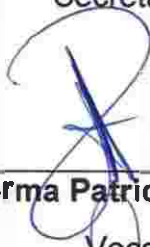
Dra. Guadalupe González Ochoa

Presidente



MC. Rosa Amelia Vázquez Cufiel

Secretario



Dra. Norma Patricia AdanBante

Vocal

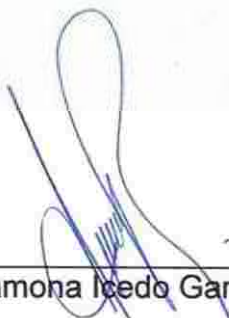
MC. Ramona Icedo García

Suplente

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en este trabajo de tesis sin permiso especial de los autores, siempre y cuando se de crédito correspondiente a los autores, a la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en este trabajo de tesis, deberá dar créditos a la Universidad de Sonora, previa aprobación escrito en manuscrito en cuestión del director de Tesis.



MC. Ramona Icedo García

Jefa del Departamento de Ciencias Químico Biológicas y
Agropecuarias.

DEDICATORIA

Cuando eres un niño piensas en tantas profesiones, que no sabes cual escoger, en el bombero porque salva vidas y apaga incendios, en policía porque protege a la sociedad, en medico porque salva las vidas y cura enfermos, o la profesión de papá porque lo admiras o el de mamá porque te inspira; conforme vas creciendo te fijas en una sola profesión y ese es tu objetivo al culminar tus estudios básicos. Yo crecí con una idea de estudiar una profesión, que al final mi objetivo dio un giro de 360 grados. Mis padres **Jesús Rodolfo Calleja Zavala** y **Blanca Andrea García Vallejo**, me apoyaban y me decían fuera cual fuera mi decisión me apoyaría y estarían presentes en ese momento de elección profesional, en la más importante decisión que tomaría, en lo único y más valioso que nos podrian dejar a mis hermanos **Guadalupe Calleja** y **Jesús Calleja** y a mí. Después mi padre decide el camino de estar con **Dios**, sin embargo me seguía ayudando y apoyando desde allá, mi madre por su parte hacia todo lo posible porque mis hermanos y por mi cumpliéramos nuestros sueño y nos daba ese apoyo incondicional y el amor ese amor que solo una madre puede ofrecer sin pedir nada a cambio, a ella no le importaba nada si no solo sacarnos adelante a lado de mi abuela **Dora Vallejo** y mis tíos que se convirtieron en mis segundos Padres, **Ramón García** y **Francisco García**, mis Tías, **Bruneth**, **Angelita**, **Trinidad**, **Dora** que me guiaba y cuidaban que no me saliera de mi camino y agarrarme de la mano cuando me caía, mis primos y primas que a la par crecíamos y compartíamos experiencias; los peques de la

familia **Hanna, Alex y Francisco** que son un motor cuando los veo sonreír. En tus etapas personas vienen personas van convives con tantas pero solo algunas se quedan para verte creer, que cuando sientes que caerás estarán ahí, que adoptas para que formen parte de tu familia, y se quedan por muchos años, ahí encontré a dos grandes personas **Irma Velarde y Gustavo Espinoza**, que a pesar de todo, distancia, el no estar juntos en algunas etapas hemos seguido unidos. Siempre supe que quería una profesión relacionada con las ciencias de la salud, pero no pensaba en QBC. Los primeros semestres fueron difíciles pero con obstáculos seguía adelante, y encontré otro pedazo de familia, **amigos, compañeros y colegas** que nos apoyamos mutuamente como una familia que somos, que después de todo el destino nos lleva por caminos diferentes pero al final nos encontraremos. Este camino es tan corto y largo a la vez que te topas con personas maravillosas, que no importa la edad, ni el grado sino la sinceridad, compañerismo y lealtad, pero sobre todo la amistad, la nueva amistad que surge entre esas personas y es cuando dices aún tengo espacio en mi corazón y digo los quiero en mi gran familia **Guadalupe González**, Familia y **Lupita Quintero** y Familia que me ayudaron, me aconsejaron a jamás darme por vencida mi admiración para ustedes y su gran familia. Seguimos por la vida y ahora con la era digital encuentras a personas y gracias a dios me encontré con varias personas que me apoyaron y sacaron de mis rutinas para darme cuenta que hay un poco de tiempo para sonreír y divertirse; **Alfonso, Adrian, Cruz, Erick, Ricardo, Eleazar, Emmanuel, Armando, José y René**. Y

en este camino aún falta tantas personas que formaran parte de tu familia. Mi padrino **Luis Zamorano**. A todos ellos les dedico mi trabajo y mi culminación de Licenciatura.

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecer a Dios por todas las bendiciones y las fuerzas que me ha dado para culminar mi etapa profesional.

A la Universidad de Sonora y mis Maestros que me brindaron las herramientas necesarias para lograr esta etapa profesional.

A los Doctores José Guadalupe Soñanez y al Doctor Jesús Alfredo Rosas por abrirme las puertas de sus laboratorios para la realización práctica de mi trabajo, y darme el apoyo necesario.

A mis sinodales, M.C. Rosa Amelia Vázquez, M.C. Ramona Icedo y a la Doctora Norma Patricia Adán, por formar parte de mi comité y además me ayudaron a formar mi camino profesional.

Pero sobre todo quiero agradecer a mi asesora, que me acepto a formar parte de su familia científica, y además de ser mi asesora, también es madre científica y amiga, le agradezco infinitamente por todo ese apoyo que me ha brindado a lo largo de este proyecto a usted Doctora Guadalupe González además por su paciencia y por demostrarme que si se puede, que con dedicación y esfuerzo y fijándome los objetivos si se puede. Sinceramente y de corazón Gracias.

A mis amigos, Gustavo Espinoza e Irma Velarde, por su apoyo a lo largo de muchos años me han aguantado con mis locuras, y también han formado parte

de mi vida, son esos hermanos que adoptas y a quien a pesar de no tener la misma sangre los quieres como si lo fueran.

A mis amigos y compañero de carrera, Virginia (Shayanna), Eduardo, María, Jesús José, Luis, Miguel, Fernando, Marco, Luis Hinojosa.

A mis compañeros de laboratorio, Francisco Chipres, José Arquímedes, Cesar Jeravy, Cesar Muñoz, Magally, Daniel, Mariazel, Roció.

A esa personita que conoces el inicio de este proyecto y que no te imaginas que será esa amiga, compañera, Guadalupe Quintero, que me apoyaste en este proyecto y me diste ánimo siempre que lo necesite, que compartimos grandes aventuras viajeras, y ahora en la distancia no es un obstáculo sigues estando presente, gracias como me dices tu amiguita! muchas gracias

A mi familia que estuvieron ahí apoyándome y porque creyeron en mí, sin su apoyo y comprensión no sé dónde estuviera.

También agradecer a ese Ángel que aunque no esté presente sigue estando presente en mi corazón, gracias papá por demostrarme que nunca me debo de dar por vencida, por heredarme que trabajando se puede lograr grandes cosas, sabes que aunque no esté conmigo sé que este orgulloso de tú corajuda y niña berrinchuda te amo papá Jesús Calleja.

ÍNDICE

APROBACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	vi
ÍNDICE.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABLAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	xiv
HIPÓTESIS.....	xv
OBJETIVOS.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES.....	3
AGENTES INFECCIOSOS CAUSANTES DE GASTROENTERITIS.....	5
ASTROVIRUS.....	9
GENERALIDADES, EPIDEMIOLOGÍA Y MORBILIDAD.....	9
ESTRUCTURA.....	12
Estructura de H _{AstV} Serotipo 1.....	17
Estructura de H _{AstV} Serotipo 2.....	18
Poliproteína no estructural ORF1b.....	18
Poliproteína no estructural del ORF1a.....	19
Poliproteína estructural ORF2.....	20
CLASIFICACIÓN.....	21
CICLO REPLICACIÓN.....	22

PATOGÉNESIS	25
ROTAVIRUS	28
GENERALIDADES	28
ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN	28
EPIDEMIOLOGIA	33
CICLO DE REPLICACIÓN	36
PATOGÉNESIS	39
VACUNAS	42
METODOLOGÍA	46
DETECCIÓN DE ROTAVIRUS Y ASTROVIRUS	46
EXTRACCIÓN DE RNA	47
SÍNTESIS DE cDNA	49
AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES VP7 Y VP4 DE ROTAVIRUS Y LA REGIÓN ORF1b Y ORF2 DE ASTROVIRUS	50
PURIFICACIÓN DE PRODUCTO DE PCR	53
CLONACIÓN	54
SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIA	57
RESULTADOS	58
DETECCIÓN DE ROTAVIRUS Y ASTROVIRUS	58
AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE VP7 Y VP4 DE ROTAVIRUS	61
GENOTIPOS DE ROTAVIRUS Y ANÁLISIS DE SECUENCIA	63
ANÁLISIS DEL GEN QUE CODIFICA PARA VP7	63
ANÁLISIS DEL GEN QUE CODIFICA PARA VP4	63
DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIA DE LA REGIÓN ORF1 b Y ORF2 DE ASTROVIRUS	58
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIÓN	70
BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ARNg.	Ácido Ribonucleico genómico
ARNm.	Ácido ribonucleico mensajero
ARN.	Ácido Ribonucleico
ARNsg.	Ácido ribonucleico subgenómicos
AstV.	Astrovirus
HAstV	Ástrovirus humano
dcARN.	Ácido ribonucleico doble cadena
DLPs.	Transcrito a partir de partículas que carecen de capa externa
EM.	Microscopia electrónica
HastV.	Astrovirusque infectan humanos
HVR.	Región hipervariable
IEM.	Inmunoenzimomicropia
kDa.	Kilo Dalton
mM.	milimolar
mL.	mililitros
nm.	nanometros
NSPs.	Proteínas no estructurales
Nt.	nucleótidos
PCR.	Reacción en cadena de la polimerasa
RE.	Retículo endoplasmatico
Rpm.	Revoluciones por minuto
RT.	Retro transcriptasa
RV.	Rotavirus
HRV	Rotavirus que infectan humanos
VPs.	Proteínas virales
µL.	microlitros
µm	micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Imagen de microscopía electrónica de partículas virales de astrovirus	10
2	Esquema de la estructura tridimensional obtenida por criomicroscopía electrónica HAstV	14
3	Descripción gráfica del genoma de Astrovirus	15
4	Ciclo de replicación de Astrovirus	24
5	Características estructurales de los rotavirus	32
6	Incidencia de rotavirus	35
7	Ciclo de replicación de rotavirus	40
8	Vacunas contra rotavirus	45
9	Amplificación de Astrovirus regiones ORF1a y ORF2	60
10	Amplificación Gen VP1 y VP4 Rotavirus	62
11	Análisis de secuencia y filogenético VP7	64
12	Análisis de secuencia y filogenético VP4	66

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Agentes etiológicos causantes de gastroenteritis	6
2	Agentes etiológicos causantes de gastroenteritis en niños menores de 5 años	7
3	Características biológicas y epidemiológicas de los virus causantes de gastroenteritis	8
4	Descripción de cada una de las proteínas y los genes de rotavirus, su función y localización en la estructura viral	31
5	Clasificación de rotavirus en base a su genoma.	34
6	Lista de oligonucleótidos VP7 y VP4 rotavirus	52
7	Lista de oligonucleótidos ORF1a y ORF2 astrovirus	52
8	Reacción de ligación	54
9	Amplificación de las fracciones ORF2 y ORF1a Astrovirus	61
10	Amplificación del Gen VP7 de Rotavirus	61
11	Amplificación del Gen VP4 Rotavirus	62

RESUMEN

De los virus causantes de gastroenteritis, Astrovirus humano (HAstV) se asocia con diarrea moderada o aguda en 5% de los casos en niños. Los genotipos de HAstV reportados a nivel mundial son los genotipos clásicos (HAstV-1). Por otro lado, Rotavirus se asocia al 30-50% de los casos de gastroenteritis severa y a 453,000 muertes anuales a nivel mundial. La mayoría de las infecciones por rotavirus se atribuyen al genotipo G1P[8], G2P[8], G4P[8], G2P[4] y G9P[8]. Algunos estudios han descrito variaciones genotípicas e intragenotípicas de rotavirus de una temporada a otra o entre distintas zonas geográficas. En el presente trabajo se analizaron 100 muestras de heces de niños con gastroenteritis. De éstas muestras 5 (5/100, 5%) fueron positivas para Astrovirus y 14 (14/100, 14%) para rotavirus. Dos de las 5 muestras de astrovirus fueron secuenciadas, el análisis de las mismas relaciono a una de las cepas con homología del 98% con genotipo HAstV-2 y otra con genotipo HAstV-6. De las 14 muestras positivas de rotavirus 6 (6/14, 28.5%) fueron caracterizadas como genotipo G12 y 4 (4/14, 28.6%) genotipo P[8]. En el análisis filogenético realizado el gen VP7 genotipo G12 se asoció con el linaje III, mientras que el gen VP4 genotipo P[8] se relacionó con el linaje V. Así mismo, el análisis de secuencia deducida de aminoácidos demostró variaciones en regiones antigénicas con respecto a las cepas vacunales (Rotarix® y RotaTeq®). En este trabajo se realizó el primer reporte de cepas de rotavirus G12 en México. Así mismo, en el caso de Astrovirus se detectó la cepa poco común HAstV-6. Estos resultados indican que se requiere de un estudio continuo de epidemiología molecular para determinar la incidencia y variabilidad genética tanto de Rotavirus como Astrovirus. Lo anterior con la finalidad de determinar si las estrategias de prevención actuales son eficientes, como lo es en el caso de rotavirus, o si se requiere que se establezcan nuevas estrategias de prevención y manejo de casos clínicos para gastroenteritis viral.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones gastrointestinales representan un grave problema de salud a nivel mundial, particularmente para la población infantil. De los agentes infecciosos causantes de gastroenteritis los virus se presentan en un 70-80% de los casos. De los virus causantes de gastroenteritis, Astrovirus humano (HAstV) se asocia con diarrea moderada o aguda en 5% de los casos en niños. Entre los principales genotipos de HAstV reportados a nivel mundial están los genotipos clásicos (HAstV-1). Por otro lado, Rotavirus se asocia al 30-50% de los casos de gastroenteritis severa y alrededor de 453,000 muertes anuales a nivel mundial. La mayoría de las infecciones por rotavirus se atribuyen al genotipo G1P[8], G2P[8], G4P[8], G2P[4] y recientemente G9P[8]. Algunos estudios tanto de Rotavirus como Astrovirus, han descrito variaciones genotípicas de ambos virus de una temporada a otra o entre distintas zonas geográficas. El estudio epidemiológico y molecular de virus como Rotavirus y Astrovirus causantes de gastroenteritis en niños podría contribuir en el reconocimiento de cepas en el área de estudio, en la evaluación de la eficiencia y la posible eficacia de las estrategias preventivas actuales. Por tal motivo, es importante el estudio del monitoreo de incidencia estos virus y las variaciones intragenotípicas que estos puedan presentar.

HIPÓTESIS

La detección y caracterización molecular de Rotavirus y Astrovirus causantes de gastroenteritis en niños contribuirá con el análisis de las cepas detectadas en el área de estudio.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar, por medio de herramientas de biología molecular, las cepas de rotavirus y astrovirus aisladas en niños menores de cinco años con gastroenteritis durante el periodo de estudio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la incidencia de rotavirus y astrovirus en niños con gastroenteritis.
2. Identificar los genotipos correspondientes a cada virus detectado durante el periodo de estudio.
3. Analizar la secuencia nucleotídica de los genes asociados a la clasificación genotípica de cada virus

INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis es una afección asociada a procesos no inflamatorios en intestino delgado e inflamatorios a nivel de colon (Steiner and Guerrant., 2010). Entre los síntomas que comúnmente se presentan están diarrea, vómito y fiebre (Hostettler,2004). La gastroenteritis puede ser causada por agentes infecciosos como virus, bacterias y parásitos. De éstos, los virus se asocian con el 70% de los casos de diarrea y es la población infantil la más susceptible. Entre los agentes virales que se relacionan con gastroenteritis se encuentran Rotavirus, Astrovirus, Norovirus, Sapovirus, y Adenovirus entéricos (Elliot, 2007; WHO, 2011).

Por su parte, Astrovirus humanos (HAstV) causa entre el 3 y 5% de hospitalización por diarrea, estas infecciones son más frecuente en niños de 1 a 3 años (Fauquier- Sánchez *et al.*, 2005). Entre las características importantes de astrovirus es que afecta a niños menores de dos años, y tiene una amplia distribución mundial y puede presentarse solo o co-infecciones con otros virus entéricos o bacterianos (Gutiérrez *et al.*, 2005).

Por otro lado, Rotavirus se asocia al 30% de las enfermedades gastrointestinales y se considera la causa más importante de gastroenteritis aguda en bebés y niños pequeños en países desarrollados y países en vías del

desarrollo a nivel mundial. La alta incidencia ocurre entre los 6 y 24 meses de edad (Parasharef *al.*, 2006; Palumboet *al.*, 2009; Tateet *al.*, 2012).

Tanto rotavirus como astrovirus son de los principales agentes infecciosos virales causantes de gastroenteritis en niños y se consideran un serio problema de salud pública a nivel mundial. El estudio epidemiológico y molecular de virus como rotavirus y astrovirus causantes de gastroenteritis en niños podría contribuir en el reconocimiento de cepas en el área de estudio y en la planeación de nuevas estrategias de prevención. Por tal motivo, es importante el monitoreo de incidencia estos virus y las variaciones intragenotípicas que estos presenten.

ANTECEDENTES

ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES.

La gastroenteritis aguda se define como inflamación de la mucosa gástrica e intestinal, la principal manifestación clínica es la diarrea. Este padecimiento, puede ser causada por algún agente infeccioso (García, 2010). La sociedad europea de gastroenterología hepática y nutrición pediátrica (por sus siglas en inglés ESPGNAN) y la sociedad europea de enfermedades infecciosas pediátricas (por sus siglas en inglés ESPID) definen el cuadro clínico de la gastroenteritis aguda como la disminución de la consistencia de heces (blandas o líquidas), y un incremento en la frecuencia de evacuaciones, con o sin fiebre o vómitos, con una duración habitual menor de 7 días y no superior a 14 días (Pagés, 2010).

Las enfermedades diarreicas agudas, son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años. Anualmente, se estima una mortalidad de 760,000 millones de niños a nivel mundial (WHO, 2013). Se considera que en la actualidad ocurren alrededor de 1.7 millones de episodios de gastroenteritis aguda infecciosa (Yalda, 2014). En México las enfermedades gastrointestinales son la segunda causa de morbilidad en 16,519 niños menores de cinco años (Hernández *et al*, 2013; INEGI, 2015).

En el 2001 la secretaria de salud (SSA), informó que las enfermedades gastrointestinales, ocasionadas por bacterias y parásitos ocupaban la decimocuarta causa de muerte a nivel nacional. El seguro social (SS) brindó 2 millones 188 consultas por enfermedades gastrointestinales. De acuerdo con estadísticas de instituto mexicano del seguro social (IMSS), las infecciones por gastroenteritis fueron salmonelosis, tifoidea y rotavirus, esto representa un problema severo en la salud pública del país (Hernández *et al.*, 2011).

Se estima que en los países de Asia, África y países latinoamericanos, la probabilidad de que un niño muera antes de tener los cinco años de edad debido a las infecciones gastrointestinales es de 50%, esto depende del estado socioeconómico y nutricional del infante (Hernández *et al.*; 2013). Las enfermedades diarreicas agudas son padecimientos con una evolución rápida (en cuestión de horas), y una duración menor a tres semanas (Ryan *et al.*; 2011). La diarrea es uno de los síntomas comúnmente asociado a infecciones por bacterias, virus y parásitos, transmitidas por comida o agua contaminada (Who, 2013).

La gastroenteritis aguda es una patología de alta incidencia 68% en niños menores de cinco años. Entre los agentes etiológicos asociados a gastroenteritis por virus se encuentran en primer lugar a rotavirus y norovirus (Yalda; 2014; Hernández *et al.*, 2013). La población infantil es la más susceptible

a presentar gastroenteritis aguda, la principal complicación es la deshidratación severa del infante lo que trae como consecuencia la muerte del menor si este no es atendido de la forma adecuada y oportuna (Who, 2008).

AGENTES INFECCIOSOS CAUSANTES DE GASTROENTERITIS

La gastroenteritis infecciosa puede ser causada por agentes infecciosos como bacterias, virus y parásitos (Tabla 1). Los agentes bacterianos y parasitarios son responsables de cerca del 20 al 25 % de casos de las enfermedades infecciosas agudas. Por su parte, los virus se relacionan con el 70-85% de los casos (Tabla 2) (Ryanet *al.*, 2011).

Entre los agentes infecciosos causantes de gastroenteritis viral, se encuentra rotavirus, norovirus, saporovirus, adenovirus y astrovirus (Tabla 3) de los cuales rotavirus y norovirus se relaciona con 453,000 y 218,000 muertes anuales de niños respectivamente a nivel mundial (Koo*etal.*, 2010; Tate*etal.*, 2012).

Por otro lado, adenovirus entérico, saporovirus y astrovirus se relaciona a casos de gastroenteritis severa a leve en niños menores de cinco años de edad (Finkbeiner*et al.*, 2010; Sdiri-Loulizlet *a.*, 2011; Rezaei*et al.*, 2012).

Tabla 1.

Agentes etiológicos causantes de gastroenteritis

Bacteriana	Parásitos	Viral
<i>Escherichiacolispp</i>	<i>Giardia lamblia</i>	Rotavirus grupo A
<i>Salmonella entérica spp</i>	<i>Cryptosporidiumparvum</i>	Adenovirus entérico
<i>Campylobacterspp</i>	<i>Amebas</i>	Astrovirus
<i>Shigellaspp</i>		Calicivirus humano
<i>Yersiniaenterocolítica</i>		Norovirus
<i>Aerominasspp</i>		Sapovirus
<i>Vibriospp</i>		

*Tomado y adaptado de Adsarias et al., 2015

Tabla 2.

Agentes etiológicos causantes de gastroenteritis en niños menores de cinco años y su incidencia en países desarrollados y subdesarrollados.

Microorganismo	Países en vías de desarrollo	Países desarrollados
Bacterias		
<i>Escherichiacoli</i>	ND	37%
<i>Shigellaspp.</i>	<1%	10%
<i>Salmonella spp.</i>	25%	1.5%
<i>Campylobacterspp.</i>	40%	3%
<i>Yersiniaenterocolitica</i>	2%	<1%
<i>Aeromonasspp.</i>	7%	1%
Virus		
Rotavirus	44%	24%
Astrovirus	<1%	<5%
Parásitos		
<i>Giardialamblia</i>	35%	10%
<i>Entamoebahistolytica</i>	<1%	3%

*Tomado y adaptado de Hernández *et al.*, 2011.

Tabla 3.

Características biológicas y epidemiológicas de los virus causantes de gastroenteritis.

Aspectos especiales	Rotavirus	Calicivirus	Astrovirus	Adenovirus
Biológicos				
Ácidonucleicos	RNA de doble cadena	RNA de cadena sencilla	RNA de cadena sencilla	DNA de doble cadena
Diámetro: forma	65-70 nm, cápside desnuda con doble capa	27-38 nm, desnudos, redondos	28-38 nm, desnudos, con forma de estrella	70-90 nm, desnudo, icosaédrico
Replicación en cultivo celular	Generalmente incompleta	Ninguna	Ninguna	Ninguna o incompleta
Número de serotipos	Cinco importantes para humanos	Más de 4	Conocidos ocho	Desconocido
Patogénicos				
Sitio de infección	Duodeno, yeyuno	Yeyuno	Intestino delgado	Intestino delgado
Mecanismo de inmunidad	IgA intestinal local	Desconocido	Desconocido	Desconocido
Epidemiología				
Epidemicidad	Epidémico o esporádico	Brotos familiares y comunitarios	Esporádica	Esporádica
Temporada de año	Casi siempre invierno	Ninguna conocida	Ninguna conocida	Ninguna conocida
Edades principales de efectuación	Lactantes, niños menores de 2 años	Niños mayores y adultos	Lactantes, niños	Lactantes- niños
Métodos de transmisión	Fecal-oral	Fecal-oral; agua y mariscos contaminados	Fecal-oral	Fecal-oral
Periodo de incubación (días)	1-3	0.5-2	1-2	8-10
Principales pruebas de diagnóstico	IEE, EM, PCR	EM, IEM, PCR	EM, PCR	IEE, EM8

EM, microscopía electrónico; IEE, inmunoensayo enzimático; IEM, inmunomicroscopía electrónica; PCR, reacción en cadena de la polimerasa. Tomado y adaptado de Ryan, 2013.

ASTROVIRUS

GENERALIDADES, EPIDEMIOLOGÍA Y MORBILIDAD.

Astrovirus (AstV) fue identificado en 1975 por Appleton y Higgins como agentes infecciosos causantes de gastroenteritis. Se detectó en una sala de maternidad donde los bebés presentaban un cuadro clínico de diarrea y vómito. La detección del virus se realizó en las heces de los niños por medio de microscopía electrónica. Al microscopio se observó la presencia de partículas virales de morfología distinta a los virus ya conocidos hasta el momento asociados a gastroenteritis como rotavirus o calicivirus (Appleton and Higgins, 1975).

Estas partículas virales fueron descritas unos meses más tarde como virus pequeños (28 nm), redondos y con un aspecto característico en forma de estrella de cinco a seis puntas (Fig. 1). Esta descripción dio origen al nombre de astrovirus que se deriva del griego astron y significa estrella (Madeley and Crosgrave, 1995). Posteriormente, gracias a los conocimientos y descubrimientos realizados por Lee y Kurtz para el aislamiento de HAstV en cultivos celulares con células embrionarias de riñón humano 1981, se logró la identificación de cinco serotipos diferentes de astrovirus en 1984. Y se permitió que se realizarán inmunoensayos para el reconocimiento de antígenos

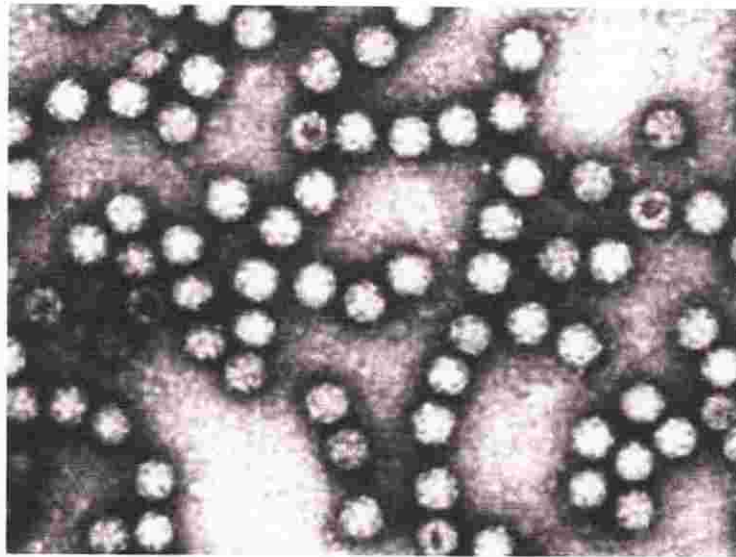


Fig 1. Imagen de microscopia electrónica de partículas virales de Astrovirus.

virales de astrovirus de importancia médica. La caracterización molecular ha sido una herramienta de mucha importancia ya que hasta la fecha se han reconocido 8 serotipos de HAstV (Hermann *et al.*, 1988; Lee and Kurtz, 1994; Sánchez-Fauquier *et al.*, 2005; Méndez and Arias., 2007).

En 1993 se establece la familia *Astroviridae* dentro de los virus de ARN; esta familia está compuesta de virus de humanos y animales y se divide en dos géneros. El primer género Mamastrovirus compuesto de virus humanos, felinos, ovinos, porcinos y bovinos, el segundo género Avastrovirus incluye astrovirus de pavos, patos y el virus de la nefritis aviar. En el mismo año se realizó la secuenciación completa del primer genoma de astrovirus (Jiang *et al.*, 1993). Así mismo, en 1997, se realizó la construcción del primer clon de ADNc del genoma completo de astrovirus serotipo 1. Para el año 2000 Méndez-toss y colaboradores reportaron un nuevo serotipo HAstV-8. (Jiang *et al.*, 1993; Geigenmüller *et al.*, 1997; Méndez-tosset *et al.*, 1997). Posteriormente, también se detectaron partículas de astrovirus en heces diafélicas de un gran número de mamíferos y aves (Gutiérrez *et al.*, 2005).

La vía de transmisión de Astrovirus es por vía oral-fecal ya sea directa o a través de fómites, que se han asociado a brotes gastrointestinales por la ingesta de alimentos (ostra) o aguas contaminadas. La incidencia de astrovirus ocurre durante todo el año, pero se observa una alta incidencia en temporada invernal (Fauquier- Sánchez *et al.*, 2005).

Los métodos utilizados para el diagnóstico representan un gran cambio de los conocimientos sobre la epidemiología de gastroenteritis por Astrovirus. Estudios realizados con microscopia electrónica han detectado menos del 1% de Astrovirus en niños con diarrea. El uso de anticuerpos monoclonales ha demostrado que estos virus son una causa frecuente de diarrea en niños a nivel mundial (Lee and Kurtz, 1994).

El primer estudio realizado para la detección del virus por medio de inmunoelectromicroscopia (IEM) realizado en niños tailandeses menores de cinco años se detectó astrovirus en el 9% de los casos. Otros estudios de seroprevalencia indicaron que más del 80% de niños mayores a cinco años tienen anticuerpos contra Astrovirus (Madanet *et al.*, 2003). Este mismo estudio sugiere que la incidencia de Co-infección con virus o bacterias es alta. Astrovirus causa entre el 3 y 5% de hospitalización por diarrea, estas infecciones son más frecuente en niños de 1 a 3 años (Fauquier- Sánchez *et al.*, 2005). Entre las características importantes de astrovirus es que afecta a niños menores de dos años, y tiene una amplia distribución mundial y puede presentarse solo o co-infecciones con otros virus entéricos o bacterianos (Gutiérrez *et al.*, 2005).

ESTRUCTURA

Astrovirus es un virus sin envoltura, de simetría icosaédrica, mide aproximadamente 28 -30 nm de diámetro (Fig. 2). Su cápside se asemeja a la

figura de una estrella de 5 o 6 puntas. Posee un genoma de ARN monocatenario lineal, de polaridad positiva, de aproximadamente 6,17 Kb. Para la cepa humano MBL-1^a 7.72kb para DAstV-2 excluyendo la cola poli A en el extremo 3' (Guix, 2003). El ARN extraído de partículas de astrovirus, así como ARN transcrito a partir de una copia genómica de longitud completa de ADN complementario (cDNA) clonada, son capaces de iniciar un

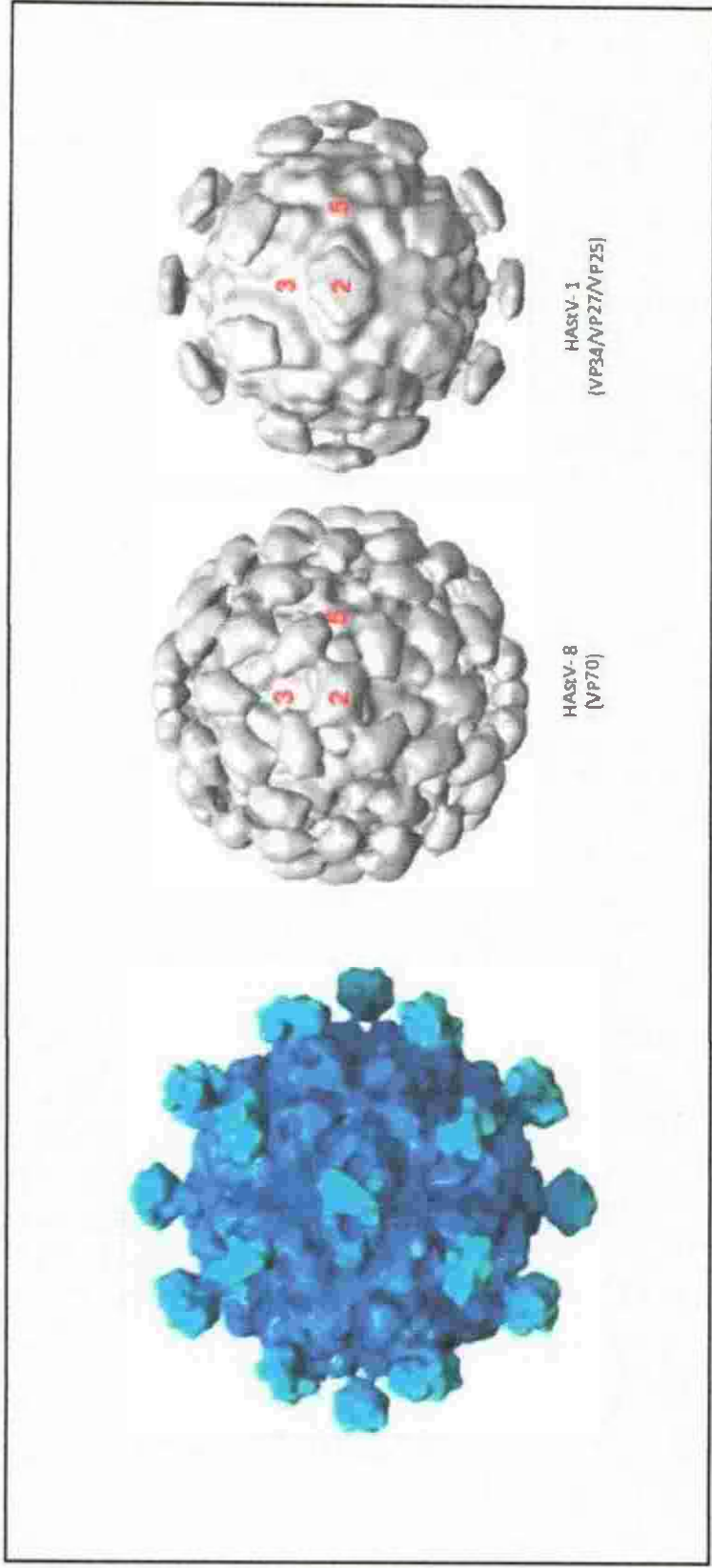


Fig 2. Esquema de estructura tridimensional obtenida por criomicroscopía electrónica del HAsV (Tomado y adaptado de Fields Virology, 2013).

una infección productiva en células cultivadas, aunque con diferentes eficiencias (Méndez and Arias, 2007). El genoma de astrovirus está constituido por una región no traducidas en el extremo 5' y 3' (UTR), tres marcos de lectura abiertos ORFs, estos están situadas en el extremo 5' del genoma, designado ORF1a y ORF1b codifica proteínas no estructurales, que están involucradas en la transcripción y replicación del genoma del virus, en base a la secuencia que contienen (Fig. 3). La variación de longitud ORF1a en HAstV es debido principalmente a inserciones presentes cerca del extremo 3' de ORF1a. ORF2 se encuentra en el extremo 3' del genoma, codifica poliproteínas de la cápside (Méndez and Arias, 2007; Siroket *al.*, 2002).

Los marcos de lectura ORF1a y ORF1b se solapan en 10 a 148 nucleótidos (nt) en el genoma del virus de mamíferos y entre 10 y 45 nt en los virus aviares. La región de solapamiento contiene una señal esencialmente para la traducción del ARN polimerasa viral a través de un mecanismo de desplazamiento del marco. Finalmente, una región UTR-3' corta, seguida de una cola poli-A de aproximadamente 30 nucleótidos. La porción C-terminal de la proteína de la cápside presenta mayor variabilidad de secuencia que la N-terminal. Esta variabilidad es la que define los distintos genotipos asociados a los virus aislados hasta el momento (Siroket *al.*, 2002).

Se han identificado dos especies de ARN de sentido positivo en células infectadas de astrovirus; el ARN genómico de longitud completa y un ARN

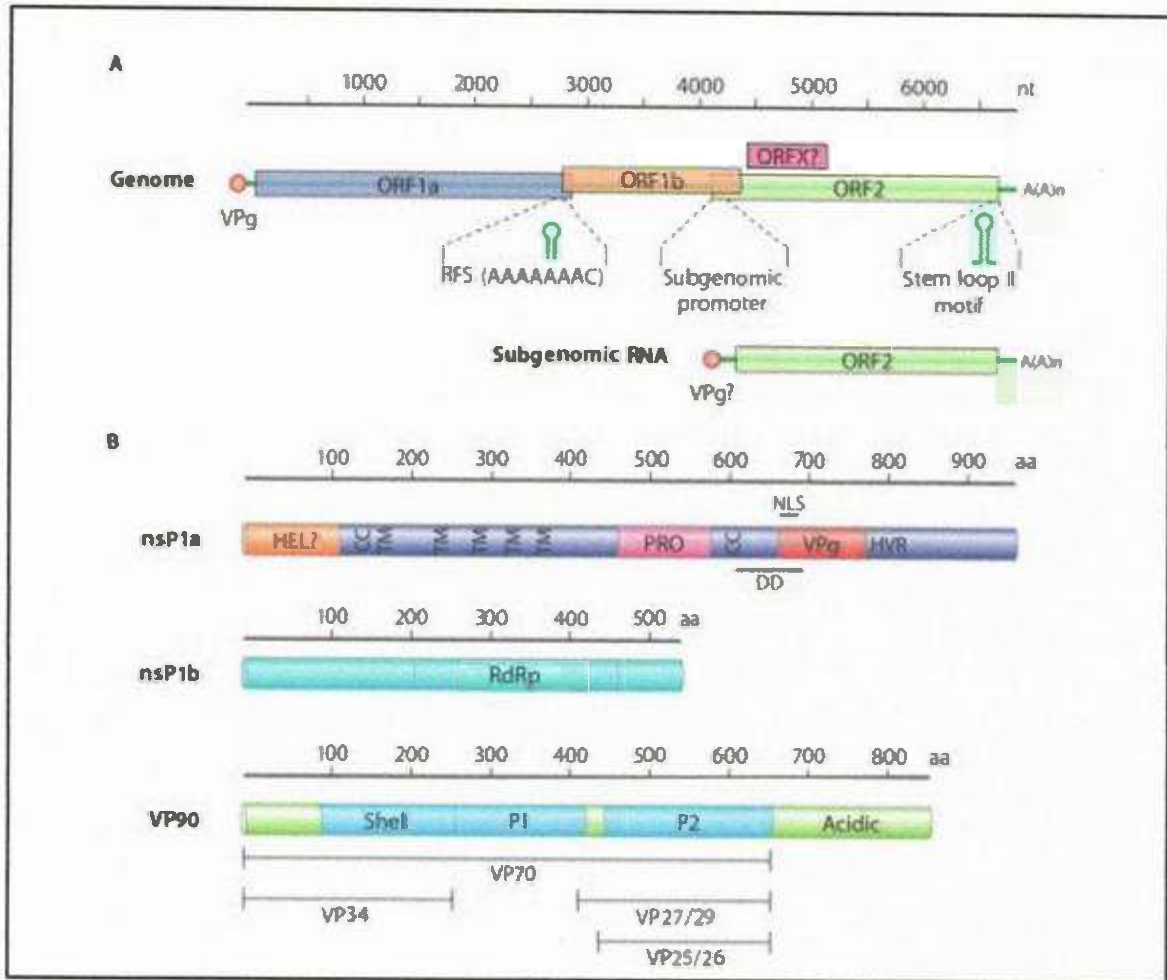


Fig. 3. Descripción gráfica del genoma de Astrovirus (A). Organización del genoma y las poliproteínas de AstV. (B). Organización genómica de gran, con los marcos de lectura (ORFs) (Boschet *et al.*, 2014).

subgenómico (ARNsg) de aproximadamente 2.4 Kb. Este sitio basando en el sitio de iniciación de la transcripción determinado para el ARNsg en HAstV-1 y HAstV-2. Los marcos de lectura ORF1b y ORF2 se presentan con una superposición de 8nt; sin embargo la longitud de esta superposición puede variar, y no está presente en astrovirus de patos (Por sus siglas en inglés, DAstV). La secuencia es altamente conservada alrededor del codón de inicio ORF2 se ha sugerido que parte del promotor para la síntesis de la ARNsg, como se describe para Alfvirus. Sin embargo esta región difiere en la longitud y secuencia entre los otros virus de mamíferos y aves (Gutiérrez *et al.*, 2005). Esta secuencia conservada muestra identidad parcial con el extremo 5' del ARN genómico ARNg, o que sugiere que tiene un papel importante para la síntesis de tanto ARNg y ARNsg. El terminal de ORF de 19 nt y el adyacente 3'-UTR está muy conservada entre los mamíferos (Méndez and Arias, 2007).

Estructura de HAstV Serotipo 1.

Estudios de crioelectromicroscopía demostraron que las partículas de astrovirus serotipo 1 constan de una cápside central de 33 nm de diámetro decorada con 30 espículas diméricas que se extienden 5nm desde la superficie de la cápside dando un tamaño de la partícula vírica de 43 nm (Matsui and Greenberg, 2001). El serotipo 1 es el más detectado en la mayoría de los estudios con un porcentaje que va desde 45% al 92%.(Fauquier- Sánchez,*et al.*, 2005).

Estructura de HAstV Serotipo 2

El serotipo 2 de astrovirus presenta una espícula protuberantes en la superficie haciendo que el diámetro total del virión alcance los 41 nm, mientras que si no se consideran dichas espículas, el diámetro del virión es de unos 30 nm. Comprobando que el tratamiento alcalino de las muestras induce la aparición de la morfología estrellada en los viriones. (Matsui and Greenberg, 2001). El serotipo 2 es el segundo más identificado en un 35% de cepas de México (Guix, 2003).

Poliproteína no estructural ORF1a.

La poliproteína codificada a partir del ORF1a (nsP1a) consta entre 920 y 935 aminoácidos según el serotipo de astrovirus. En el extremo amino-terminal de la poliproteína se han identificado varios dominios transmembrana que puede estar implicada en el anclaje del complejo de replicación del ARN vírico a membranas celulares (Jianget *al.*, 1993; Jonassenet *al.*, 2003).

En la parte central de la poliproteínas se encuentra un motivo de proteasa viral perteneciente al grupo de las 3C-like serineproteases que poseen un elevado grado de homología con las proteasas de dos virus de familia *Caliciviridae*: como es el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo, y calicivirus felino (Jianget *al.*, 1993) la tríada catalítica está formada por los aminoácidos His461, Asp489 y Ser551. En el extremo carboxi-terminal se ha identificado la presencia de una señal de localización nuclear (NLS) aunque su significado biológico en el

ciclo replicativo de AstV no está claro (Jianget *al.*, 1993). Esta zona de la Poliproteína también se ha descrito la presencia de un epítopo inmunoreactivo (Matsuiet *al.*, 1993)

Finalmente, se destaca la presencia de una región hipervariable (HVR) rica en inserciones y deleciones en el extremo carboxi-terminal y que en un principio se asoció a la adaptación de astrovirus a determinadas líneas celulares (Willcockset *al.*, 1994) y más adelante se ha relacionado con un posible papel en la replicación de ARN vírico (Guixet *al.*, 2004)

Poliproteína no estructural del ORF1b

Codificada por una poliproteína (nsP1b) de entre 515 y 519 aminoácidos dependiendo del serotipo de astrovirus. Estas poliproteínas destacan principalmente la presencia de ARN polimerasa perteneciente al supergrupo I según la clasificación de Koonin (1991), aunque aún no se ha caracterizado por completo. Se ha propuesto que este lugar activo de esta ARN polimerasa correspondería a la secuencia aminoácido Y374, G375, D376 y D377 altamente conservada en astrovirus humano y animales (Carter y Willcocks, 1996)

A pesar de que esta poliproteína posee un potencial codón de inicio de traducción, se ha demostrado que la síntesis de la poliproteína tiene lugar tras un fenómeno de *ribosomal frameshifting* que se produce en la región de solapamiento entre el ORF1a y ORF1b de este modo se forma una superproteína que engloba el ORF1a y ORF1b (nsP1a/nsP1b) y que es

procesada posteriormente en las dos poliproteínas nsP1a y nsP1b (Jiang *et al.*, 1993; Marczinke *et al.*, 1994).

Poliproteína estructural ORF2

La poliproteína codificada por el ORF2 tiene un tamaño variable según el serotipo de astrovirus que oscila entre 782 y 796 aminoácidos. En un estudio realizado por Wang y colaboradores (2001), la secuencia de ORF2 fue dividida en cuatro regiones. La región I, abarca la secuencia entre los aminoácidos 1 y 415, es la que está más conservada entre todos los serotipos del virus. En esta región existe una zona rica en residuos básicos que se ha relacionado con el empaquetamiento de ARN vírico (Geigenmüller *et al.*, 2002)

La región II entre los aminoácidos 416 y 648, presentan un ligero grado de variabilidad entre los diferentes serotipos mientras que la homología dentro de cada serotipo es elevada. La región III desde el residuo 649 al 707 es la zona con mayor grado de variabilidad entre los diferentes serotipos con presencia de inserciones o deleciones. Por último la región IV desde residuo 708 al final, vuelve a presentar un elevado grado de similitud entre todos los serotipos (Belliot *et al.*, 1997; Bass and Qiu., 2000)

El procesamiento de la poliproteína es de 87-90 kDa obtenida por la traducción de ORF2, así como el ensamblaje de las proteínas dando lugar a la cápside vírica, se considera que la cápside vírica madura e infecciosa está compuesta por tres proteínas mayoritarias con un tamaño de 35-32 kDa (VP34), 31-37

(VP29) y 26-24 kDa (VP26) (Willcockset *al.*, 1990; Monroe *et al.*, 1991; Belliotet *al.*, 1997; Bass and Qiu., 2000). VP34 está codificada a partir del extremo amino-terminal del ORF2 mientras que VP26 parece ser una versión truncada por el extremo amino-terminal de VP29 codificada a partir de la parte central del ORF2 (Sánchez-Fauquieret *al.*, 1994; Belliotet *al.*, 1997).

CLASIFICACIÓN

Las diferentes cepas de AstV se han clasificado en serotipos mediante técnicas de inmunomicroscopia electrónica o de inmunofluorescencia. Los diversos serotipos descritos, presentan un antígeno de grupo común y ninguno parece tener actividad cruzada con ninguna cepa de animales (Madanet *al.*, 2003).

Los Astrovirus humanos han sido clasificados antigénicamente en 8 tipos denominados HAstV 1 a 8, de estos el tipo predominante es el HAstV 1 (Fauquier- Sánchez *et al.*, 2005). Por otro lado, los genotipos de Astrovirus humanos son HAstV 1 (que incluye los 8 serotipos o astrovirus "clásicos"), HAstV 6 (cepa MLB), HAstV 8 (cepas HMO-A y VA1) y HAstV 9 (cepas HMO-B, HMO-C y VA2). Mientras que la relación de los genotipos clásicos de astrovirus con la gastroenteritis está bien definida, aún se desconoce en papel que juegan los genotipos de astrovirus no clásicos (Gutiérrez *et al.*, 2005).

CICLO REPLICACIÓN

Astrovirus interactúa con receptores específicos en la superficie celular por medio de un dominio de unión en la proteína de la cápside, siendo luego transportada al citoplasma donde sufre un proceso de descapsidación liberando el genoma al citosol (Sirko, 2003).

Después de la entrada de astrovirus a las células, el ARN genómico se traduce luego en una poliproteína precursora que se extiende posteriormente en las proteínas necesarias para la replicación del genoma del virus y el ensamble de los virus de la progenie (Fig. 4) (Méndez *et al*, 2013).

Los marcos de lectura ORFs situadas en el extremo 5' del genoma, designados ORF1a y ORF1b, codifican proteínas no estructurales que están involucradas en la transcripción del ARN y la replicación basada en los motivos de secuencia que contiene. La tercera ORF, que se encuentra en el extremo terminal 3' del genoma, designado ORF2, ARNs genómicos y subgenómicos y codifica las proteínas de la cápside (Méndez *et al*, 2013).

Una vez sintetizada la ARN- polimerasa viral, el genoma parental puede empezar a replicarse, sucediendo este proceso en el citoplasma. El ensamblaje de las nuevas partículas, la maduración de las proteínas virales y la replicación son procesos que ocurren casi simultáneamente. Existe todo un conjunto de intermediarios de morfogénesis conformado por partículas inmaduras en

distintos estudios. El genoma sea incorporado dentro de la partícula a nivel de algunos de dichos intermediarios. La salida del virus se realiza por lisis celular (Sirko, 2003).

Una vez convertido el ARN genómico (ARNg) y procesamiento proteolítico de la proteína no estructural, se forma un complejo de replicasa viral, que utiliza el ARNg para la producción de larga duración ARN de sentido negativo. Se detecta de 6 a 12 horas de la infección. La proteína no estructural de la proteína nsp1a/4 (corresponde al extremo C- terminal de nsp1a) se ha demostrado que se requiere para la replicación del virus. Transcripción de ARNg y ARNsg parte de un promotor interno de larga duración de sentido negativo de ARN, se detecta a partir de 8 horas después de la infección en el complejo de replicación para cambiar la síntesis de cadena negativa de sentido positivo y síntesis de ARNg (Méndez *et al*, 2013).

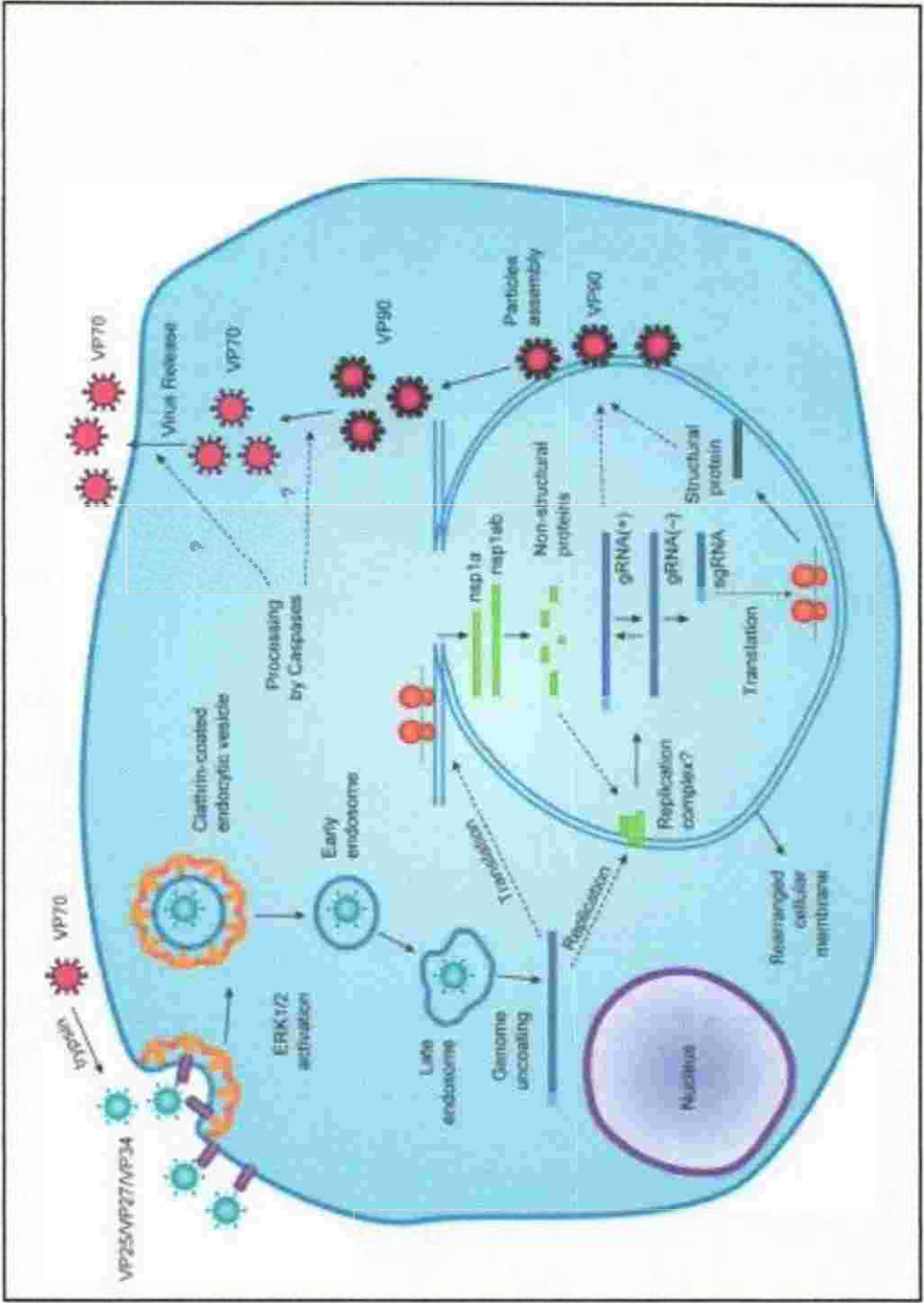


Fig 4. Ciclo de replicación de Astrovirus (Bosh et al., 2014)

PATOGÉNESIS

Astrovirus representa un problema de salud pública, se asocia en gran proporción a casos de gastroenteritis en niños y en adultos inmunocomprometidos. A pesar de su impacto en la salud humana, se conoce muy poco acerca de su patogénesis. Lo anterior puede deberse a que se carece de un modelo animal de experimentación y la dificultad de propagar astrovirus *in vitro* (Boshet *et al.*, 2014).

En estudios realizados con Astrovirus que afectan a animales se ha observado una atrofia en las vellosidades intestinales e infiltraciones inflamatorias; así como la disminución de los disacáridos y producción de diarrea osmótica (Bosch *et al.*, 2014). La distribución de enfermedades diarreicas por AstV revela que en climas templados, la mayoría de las infecciones son por este virus, son determinados en su mayoría en invierno, mientras que en climas tropicales se detecta durante todo el año (Gilbert *et al.*, 2007).

El período de incubación por este HAstV se ha establecido de 3-4 días aunque puede ser de 24 a 36 horas, y de la enfermedad de 2 a 3 días, normalmente la enfermedad es leve y autolimitada, pero puede ser persistente y grave en pacientes inmunocomprometidos. HAstV causa deposiciones líquidas, vómitos, dolor abdominal y deshidratación, la severidad de la enfermedad es menor que rotavirus. (Cabello *et al.*, 2002; Varela *et al.*, 2007).

El mecanismo de transmisión más frecuente es por contacto directo por vía fecal-oral, siendo más frecuente la transmisión nosocomial (Gilbert *et al.*, 2007). En heces de niños infectados de AstV se ha detectado excreción viral hasta dos semanas antes del comienzo de los síntomas (Varela Martínez *et al.*, 2007).

En brotes epidemiológicos de infecciones por astrovirus se ha comprobado la diseminación persona-persona, o alimentos como ostras, es controvertido, también se ha publicado que la supervivencia de AstV en agua potable. La importancia de la infección nosocomial es la diarrea por este virus, se plantea también como en el caso de rotavirus la posibilidad de transmisión aérea. (Sánchez-Fauquier *et al.*, 2005). La incidencia de astrovirus se presenta en niños principalmente durante los primeros años de edad con más frecuencia entre los seis y dieciocho meses. Algunos estudios indican que del 24 al 74% de las infecciones por este virus es asintomático (Sánchez-Fauquier *et al.*, 2005)

La infección por astrovirus aparentemente se restringe a enterocitos. En un estudio donde se incluyeron individuos con infección sintomática por HAstV, se detectaron partículas virales en la parte inferior de las vellosidades epiteliales, en la superficie del epitelio y en macrófagos en la lámina propia (Mitchel, 2002).

Aunque existen pocos datos al respecto, algunos estudios sugieren que a pesar de la severidad de la diarrea causada por HAstV, solo se observan cambios morfológicos menores y poco específicos a nivel intestinal. Con respecto a los procesos inflamatorios se ha observado una respuesta moderada. Estos

resultados aparentemente demuestran una pobre contribución del daño histológico e inflamatorio en la diarrea por astrovirus (Bosch, 2014).

Hasta el momento no se ha encontrado una relación entre la gastroenteritis severa y alguno de los diferentes grupos de astrovirus (Clásicos, MLB y VA1). Sin embargo, existe evidencia de que HAstV-3 puede estar asociada a gastroenteritis severa y un alto número de partículas virales fecales en comparación con los otros genotipos (Caballero *et al.*, 2003)

ROTAVIRUS

GENERALIDADES.

Rotavirus humano fue descubierto en 1973, por medio de Microscopia electrónica (por sus siglas en ingles EM) partículas virales en un corte histológico de capa delgada de mucosa duodenal. Posteriormente, el virus fue identificado en las heces por medio de EM. Las partículas visualizadas en las heces de los niños presentaban un tamaño aproximado de 70nm. Debido a su estructura en forma de rueda estas partículas virales se nombraron como de rotavirus (Bishop *et al.*, 1973).

Rotavirus se ha caracterizado por ser un agente etiológico importante de diarrea grave en lactantes y niños durante los primeros 2 años de vida, tanto en países desarrollados como en vías del desarrollo. En la actualidad, este virus ha superado sistemáticamente en importancia a otros agentes etiológicos conocidos de diarrea grave (Cabello *et al.*, 2002)

ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

Rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae* del género rotavirus, tiene una estructura icosaédrica carente de envoltura, de un tamaño de 70nm de diámetro compuesta por tres capas proteicas concéntricas, esta a su vez de

proteínas virales (VP). El genoma viral consiste en 11 segmentos de ácido ribonucleico (ARN), de doble cadena (dcARN) que codifica para seis proteínas estructurales (VPs) y cinco no estructurales (NSPs) (Fig. 5) (Estes *et al.*, 2007). En la capa proteica externa está conformada por 780 copias de glicoproteína VP7 (37 kDa) y 60 picos ganchos formados por dímero de proteínas virales de adherencia VP4 (87 kDa). Esta es cavidad de tripsina pancreática en VP5 y VP8. Se observa en superficie 132 canales acuosos que atraviesan la capa externa (VP7) e intermedia (VP6) uniendo el medio externo viral con el core. La transcripción de partículas realizada por la ARN polimerasa puede ser expulsada por estos canales. Capa intermedia compuesta por 260 trimeros VP6 (41 kDa) ordenado como un enrejado. La capa interna está estructurada por 60 dímeros de proteínas VP2 (102 kDa) VP1 y VP3 unidas al RNA viral de doble cadena (Tabla 4) (Arias *et al.*; 2001; Siroket *et al.*, 2008).

Rotavirus se clasifican en grupos, serotipos y genotipos. La proteína VP6 es la determinante de la reactividad antigénica de grupo. Actualmente se reconocen 8 grupos (A-H) (Molinari *et al.*, 2014). El grupo A se caracteriza por causar gastroenteritis en niños. Los del grupo B han sido identificados en brotes epidémicos de diarrea grave en adultos. El grupo C se ha detectado en casos de diarrea aguda esporádica infantil en varios países. El resto de los grupos (D-H) ha sido relacionado solo con infecciones en animales (Riechman, 2007).

La clasificación en serotipos y genotipos se determina en base a las proteínas de la cápside externa VP7 (denominada serotipo/genotipo G por ser una glicoproteína) y VP4 (serotipo/genotipo P por ser sensible a proteasas) (Román Riechmann, 2007). Hasta ahora se conocen 27 serotipos G y 15 serotipos P. Por otro lado, el análisis de

Tabla 4.

Descripción de cada una de las proteínas y los genes de rotavirus, su función y localización en la

Segmentos del ARN (gen)	Tamaño (pares de bases)	Proteínas	Peso molecular KDa	Localización	Función
1	3302	VP1	125	Vértices del núcleo	ARN polimerasa ARN-dependiente
2	2690	VP2	102	Forma la capa interna del núcleo	Estimula la ARN replicasa viral
3	2591	VP3	88	Vértices del núcleo	Enzima guaniltransferasa de ARNm
4	2362	VP4	87	Protuberancias superficiales	Ataque celular. Virulencia
5	1611	NSP1	59	No estructural	No es esencial en el crecimiento del virus
6	1356	VP6	45	Cápside interna	Estructural y antígeno específico de cada especie
7	1104	NSP3	37	No estructural	Aumenta la actividad del ARNm viral y finaliza la síntesis de proteínas celulares
8	1059	NSP2	35	No estructural	NTPasa involucrada en el empaquetamiento de ARN
9	1062	VP7	36 y 34	Superficie	Estructural y neutralizadora de antígenos
10	751	NSP4	20	No estructural	Enterotoxina
11	667	NSP5 NPS6	22	No estructural	Moduladora de la unión del ARNsc y ARNdc

estructura viral

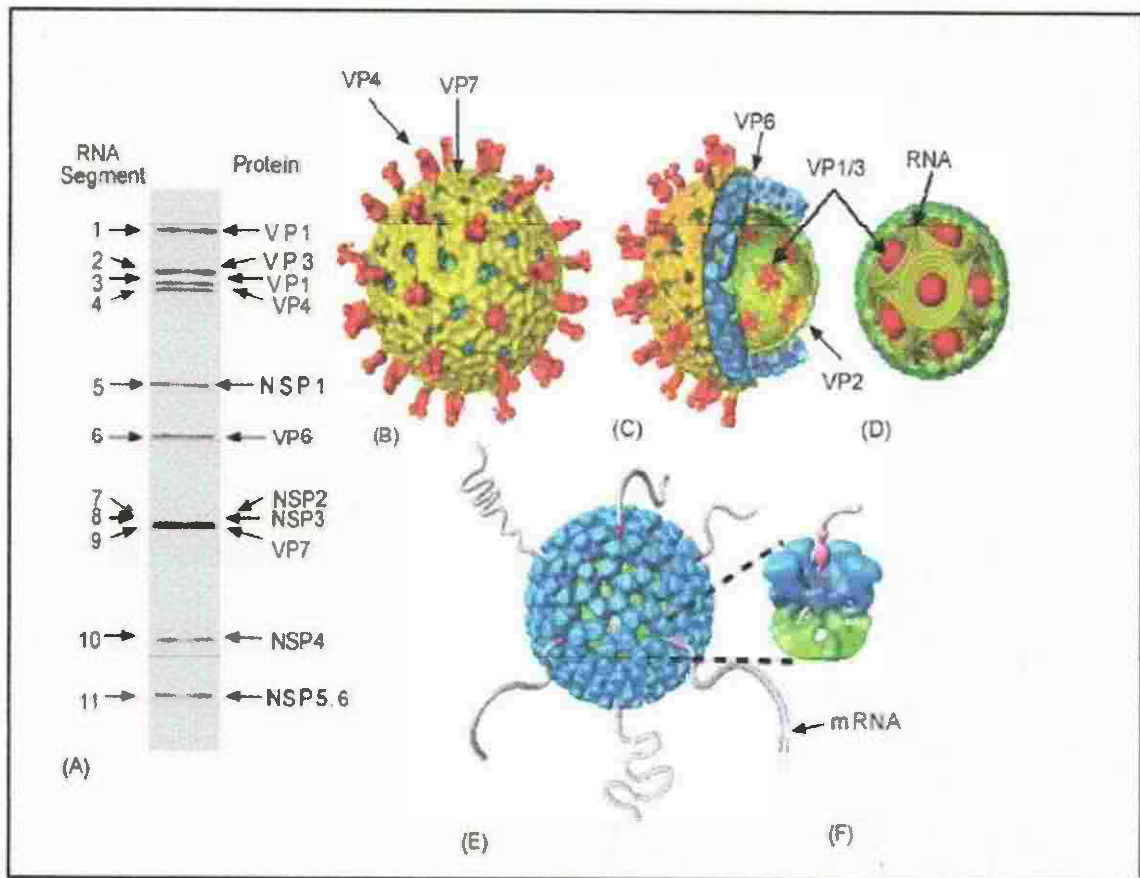


Fig5. Características estructurales de los rotavirus. (A) Perfil electroforético de los 11 segmentos de dsRNA que constituyen el genoma rotaviral. (B) Esquema a partir de crio Microscopía Electrónica (crio-EM) de una partícula de triple capa proteica (TLP). La proteína VP4 en forma de espícula está coloreada en naranja y la capa proteica de VP7 en amarillo. (C) Un corte de la TLP permite observar las capas internas: proteína VP6 en azul y VP2 en verde, además de las enzimas transcripcionales VP1 y VP3 en rojo e incrustadas en VP2 con un plegamiento de 5 ejes. (D) Esquema de la organización del genoma rotaviral, los segmentos están representados como espirales cónicas invertidas alrededor de las enzimas transcripcionales. (E y F) Modelo construido a partir de crio-EM de una partícula de doble capa proteica (DLP) en proceso de transcripción, en el que simultáneamente se liberan los transcritos de mRNA por los canales localizados en los vértices de los cinco ejes del icosaedro de la DLP (Jayaram *et al.*, 2004).

secuencia genética revela la existencia de 27 genotipos G y 35 genotipos P (Estes *et al.*, 2007; Riechmann, 2007; Matthijnssens *et al.*, 2011).

Por otro lado, el grupo de trabajo de clasificación de rotavirus (por sus siglas en inglés, (RCWG) sugiere la clasificación de este virus en base al análisis de la secuencia nucleotídica de cada uno de los genes, los diferentes genotipos y su denominación se describen en la tabla 5 (Matthijnssens *et al.*, 2011).

EPIDEMIOLOGIA

La infección por Rotavirus (RV) es la principal causa de gastroenteritis grave en los lactantes y niños pequeños a nivel mundial se estima que 453,000 muertes fueron causados por RV (Tate *et al.*; 2010) (Fig. 6). El riesgo de muerte de niños con gastroenteritis por rotavirus en países en vías del desarrollo es mayor, el riesgo de contraer esta infección es similar en todos los niveles socioeconómicos (Parashar *et al.*, 2006).

Rotavirus representa el 30% y 50% de las enfermedades gastrointestinales y se considera la causa más importante de gastroenteritis aguda en bebés y niños pequeños en países desarrollados y países en vías del desarrollo a nivel mundial. La alta incidencia ocurre entre los 6 y 24 meses de edad del infante (Parashar *et al.*, 2006; Palumbo *et al.*, 2009; Tate *et al.*, 2012).

Más del 50% de las infecciones por rotavirus se atribuyen a G1P[8]. La mayoría del resto a G2P[8], G4P[8] y G2P[8]. La cepa G1P[8] es identificada comúnmente en África, América y Europa, G2P[4] en el Mediterráneo oriental y G9P[8] en el suroeste de Asia y en el occidente del pacifico (Berger, 2015).

Tabla 5.

Clasificación de rotavirus en base a su genoma, corte de identidad nucleotídica de genotipo para cada uno de los genes de rotavirus

Producto del Gen	% corte de identidad	Genotipo (n)*	Descripción del producto del gen
VP7	80	G(27)	Proteína Glicosilada
VP4	80	P(35)	Sensible a Proteasa
VP6	85	I(11)	Cápside Intermedia
VP1	83	R(4)	RNA polimerasa dependiente de RNA
VP2	84	C(5)	Núcleo (Core)
VP3	81	M(6)	Metiltransferasa
NSP1	79	A(14)	Antagonista de Interferon
NSP2	85	N(5)	NTPasa
NSP3	85	T(7)	Estimulador (enhancer) de Transcripción
NSP4	85	E(11)	Enterotoxina
NSP5	91	H(6)	Proteína fosforilada (Phosphoprotein)

*Número de genotipos
(Tomado y modificado de Matthijnssens *et al.*, 2008)

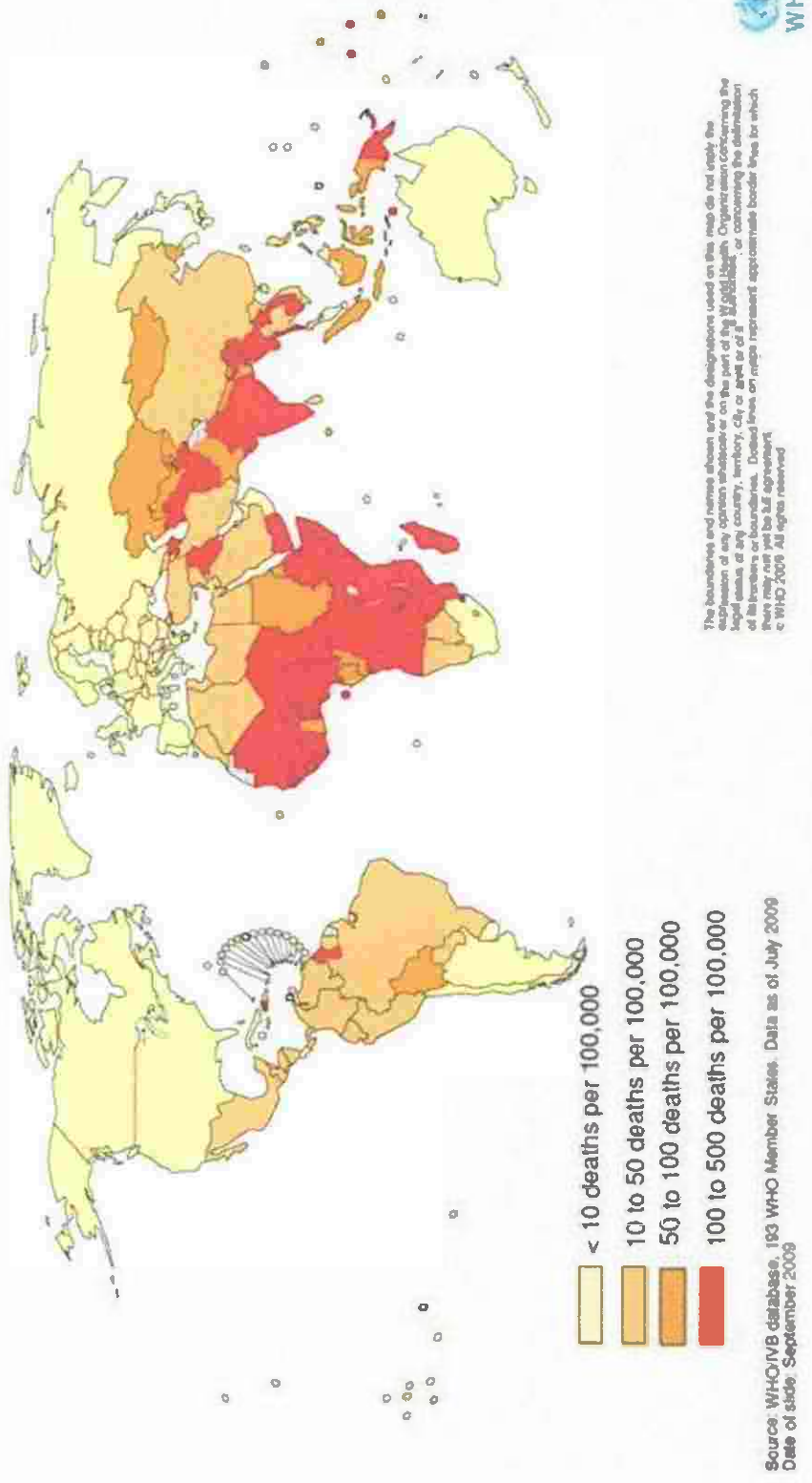


Fig 6. Incidencia de rotavirus, la intensidad de color se asocia a zonas de mayor incidencia y mortandad.

CICLO DE REPLICACIÓN

La infección por rotavirus *in vivo* está restringida a las células de las puntas de las vellosidades del intestino delgado, lo que sugiere la existencia de receptores específicos del huésped. El virus penetra hacia el interior de la célula huésped, la partícula viral pierde las proteínas de la capa externa (Fig. 7). Aunque el momento preciso y el mecanismo de este evento se desconocen, la remoción de la capa externa resulta en la activación de la transcriptasa viral (López and Arias 2010).

Después de la internalización del virus al citoplasma celular, el genoma viral es transcrito a partir de partículas que carecen de la capa externa (por sus siglas en inglés DLPs). El inicio de la síntesis de los mensajeros virales se lleva a cabo dentro de las DLPs, por medio de la acción concertada de la transcriptasa viral VP1 y la guanililtransferasa VP3. Los ARN mensajeros (ARNm) sintetizados sirven dos funciones: 1) son traducidos para sintetizar las proteínas virales, y 2) son empleados como plantillas para sintetizar el ARN de doble cadena que constituirá el genoma de la progenie viral. Una vez que se acumula una masa crítica de proteínas virales, en las células infectadas se forman grandes inclusiones citoplásmicas llamadas viroplasmos y se ha propuesto que es en estas estructuras donde las partículas con dos capas (formadas por VP2 y VP6) se ensamblan y donde se lleva a cabo la replicación del ARN viral (Sirok, 2008).

La traducción de los ARNm de los rotavirus se efectúa tanto en polisomas libres como unidos al retículo endoplásmico. Un aspecto particular de la infección por rotavirus consiste en que, a medida que progresa la síntesis de las proteínas virales, se disminuye la síntesis de las proteínas celulares (López and Arias, 2010).

La descapsidación del genoma se lleva a cabo mediante la interacción de los segmentos de ARNm con las proteínas de la nucleocápside. Una vez que la nucleocápside se ha formado, los segmentos de ARNm son internalizados. Durante estos eventos participan algunas de las proteínas no estructurales del virus, que se encuentran asociadas a las partículas virales, que se conocen como intermediarios de replicación. La adición de trímeros de la proteína VP6 a las nucleocápsides, lleva a la formación de una partícula mayor que tiene actividad de replicasa y de transcriptasa. Una vez que las DLPS han sido formadas y que se ha replicado completamente el genoma, estas partículas migran hacia el retículo endoplásmico donde el virus adquiere la capa externa de proteínas (Buston, 2008).

Dos de las proteínas del virus son sintetizadas en asociación con el retículo endoplásmico (RE) y están glicosiladas: La proteína estructural VP7, la cual forma la capa externa del virus, es sintetizada en el RE y se mantiene asociada a la membrana, orientada hacia el lumen del RE; la proteína no estructural NSP4 es también una proteína glicosilada residente del RE, la cual tiene al

menos un dominio transmembranal, por lo que el extremo carboxilo está orientado hacia el citoplasma. Este dominio citoplásmico funciona como receptor de las partículas con doble capa, interaccionando directamente con VP6. Además, NSP4 interacciona con la proteína VP4, la cual forma parte de la capa externa del virus. La interacción de NSP4 con VP6 y VP4 media la gemación de las partículas de doble capa hacia el interior del RE; durante esta gemación, las partículas adquieren una cubierta lipídica temporal que se pierde durante el viaje de las partículas hacia el interior del RE, y a la vez, mediante un mecanismo aún desconocido, se ensamblan las proteínas de la capa externa, lo que resulta en la formación de las partículas virales maduras con sus tres capas de proteína. Finalmente los virus maduros se liberan al medio mediante la lisis de la célula (Siroket *al*, 2008; López and Arias, 2010).

Durante la infección, todas las proteínas virales se acumulan en el viroplasma, a excepción de las dos glicoproteínas (VP7 y NSP4), que se localizan en el RE, y las proteínas no estructurales NSP1 y NSP3, que se localizan de una manera puntuada distribuidas en el citoplasma celular en asociación con el citoesqueleto. Además de las interacciones entre proteínas del citoesqueleto con las proteínas virales NSP1 y NSP3, se ha propuesto la existencia de otras interacciones. Se ha encontrado que la proteína no estructural NSP3 se une a los mensajeros virales reconociendo específicamente las cuatro últimas bases (...GACC3') de la región conservada del extremo 3' de los ARNs (Siroket *al*, 2008; López and Arias, 2010).

La proteína no estructural NSP1 interacciona con los 34 nucleótidos del extremo 5' del ARNm viral, y con el citoesqueleto, y se ha propuesto que pudiera bloquear la traducción de una fracción de los ARNm virales, conduciéndolos al viroplasma y secuestrándolos para servir como plantados para la síntesis de la doble cadena del ARN.

Se ha observado que los complejos NSP1-ARNm-NSP3 se asocian con las proteínas estructurales VP1 y VP3. Dado que VP1 reconoce el extremo 3' (UGUGACC-3') del ARNm, región que se sobrepone con la reconocida por NSP3, y VP3 reconoce el extremo 5', se ha sugerido que NSP1 y NSP3 son desplazadas competitivamente por VP1 y VP3, y con este proceso quizá se concluye la translocación de los ARNm al viroplasma, donde continua la morfogénesis de las partículas virales (López and Arias, 2010).

PATOGÉNESIS

Los pacientes con infección por rotavirus presentan deposiciones líquidas abundantes. El periodo de incubación oscila entre 1-3 días. El espectro clínico presentan límites amplios: puede cursar de manera asintomática, dar lugar a una diarrea acuosa con duración limitada hasta una diarrea severa con vómito, fiebre y deshidratación. La severidad de las manifestaciones clínicas depende del serotipo, la edad y condiciones previas de salud. La excreción del virus por heces precede en varios días al inicio de la enfermedad y puede continuar

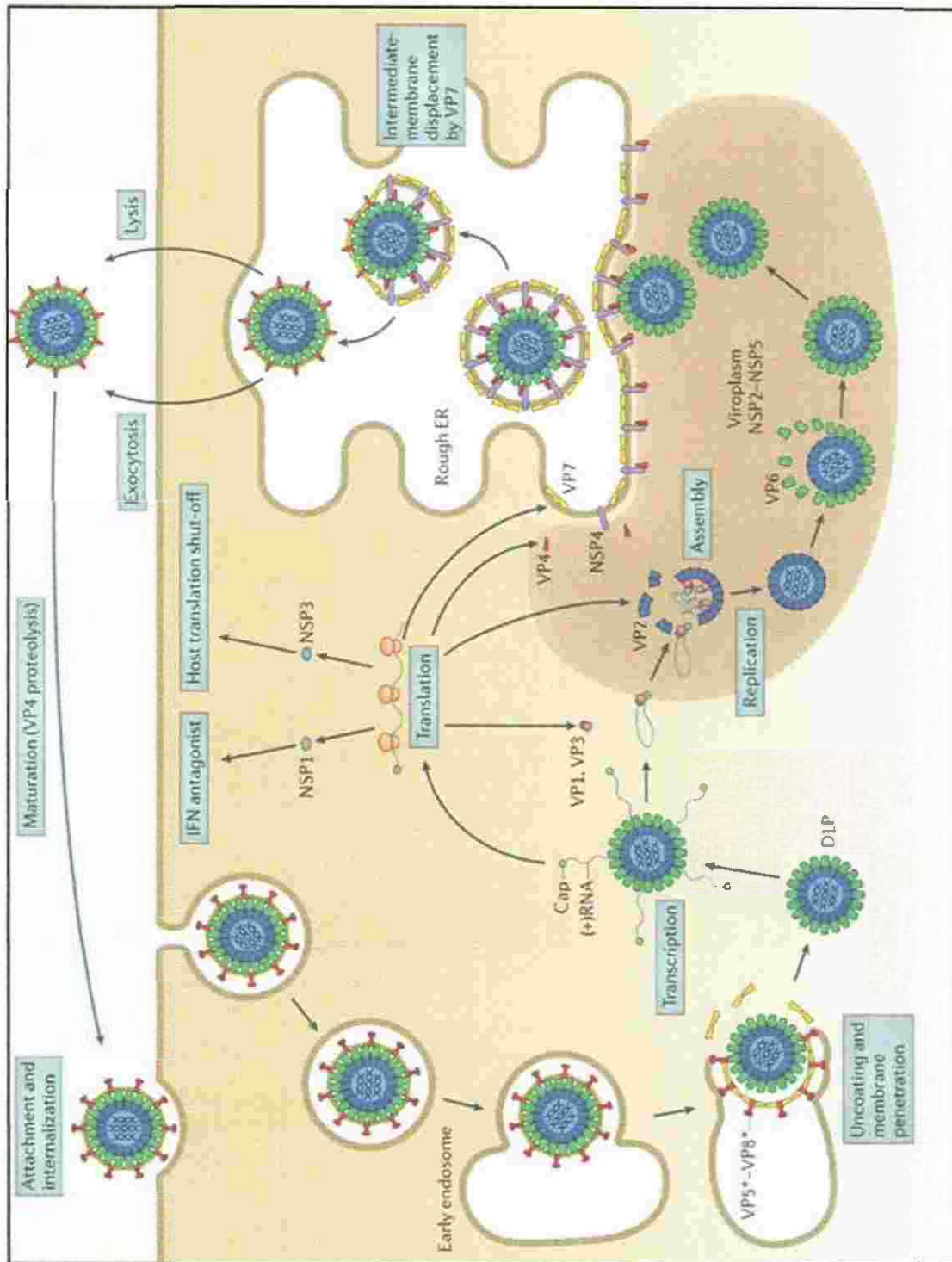


Fig 7. Ciclo de replicación de rotavirus.

hasta por 8 días a 10 días después de que los síntomas han desaparecido (Cabello *et al* 2002; Siroket *al*, 2010; García, 2015).

En lactantes y pre-escolares, los síntomas se inician abruptamente con diarrea, que puede ser explosiva e intensidad variable. Las evacuaciones son generalmente acuosas, sin sangre, sin moco. Fiebre alta de hasta 39°C, la pérdida de líquido es por lo regular del 5 al 10% del peso corporal, en ciertos casos se presenta deshidratación severa tanto en niños como en adultos (Cabello *et al*; 2002).

Rotavirus (RV) infecta a las células de las vellosidades del intestino delgado. Se multiplican en el citoplasma de los enterocitos y lesiona sus mecanismos de transporte. La proteína no estructural NSP4, se ha caracterizado como una enterotoxina viral que activa la secreción al desencadenar una vía de transducción de señal. Las células lesionadas se desprenden hacia la luz del intestino y liberan grandes cantidades de virus, que estos aparecen en las heces (hasta 10^{12} partículas por gramo de heces). La excreción viral suele persistir durante 2 a 12 días en pacientes. En ocasiones la diarrea por rotavirus se debe a alteraciones de la absorción de sodio y glucosa a medida que las células lesionadas en las vellosidades son reemplazadas por células inmaduras de las criptas que no absorben (Jawetz *et al.*, 2011).

VACUNAS

En los últimos años la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Alianza Global para Vacunas e Inmunización (GAVI) y el Programa para Tecnología Apropriada para la Salud (PATH), entre otras agencias internacionales, han considerado el desarrollo y la introducción de una vacuna frente a rotavirus como uno de los objetivos, creado un programa de vacunas cuyo principal objetivo es acelerar la disponibilidad de vacunas económicamente accesibles cuyo uso resulte apropiado en los países en desarrollo (Riechmann, 2006).

Las primeras vacunas se realizaron en el decenio de 1980, 10 años después del descubrimiento de RV (Martí, 2011). Estas vacunas se basaron en el modelo jenneriano y utilizaron cepas de RV animales de fácil crecimiento que las cepas humanas y naturalmente atenuadas (Riechmann,2006).

En 1983 se realizó el primer ensayo clínico con una vacuna monovalente de la cepa RIT 4237 de rotavirus bovino atenuado. La cepa bovina crecía bien en cultivo y se atenuaba de forma natural en los humanos, pero probablemente estaban demasiado atenuados, por lo que su replicación era baja, al igual que la respuesta inmunitaria que generaba, con una eficacia protectora escasa variable, como se observó en estudios posteriores. En 1985, Kapikian, del Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos, identificó una cepa de

rotavirus del mono Rhesus que constituyó la vacuna RRV (Reasortante Rhesus-Human) (Riechmann, 2006; Martí, 2011).

En 1998 la agencia de administración de fármacos y alimentos (FDA) de Estados Unidos (E.U.) autorizó la primera vacuna tetravalente (RotaShield) (G1-G4) fue obtenida por recombinación genética entre las cepas animales (Rhesus) y humana (Martí, 2011). RotaShield se incorporó al calendario de vacunación sistemática de E.U. a inicios de 1999, se administraba por vía oral en tres dosis a los 2, 4 y 6 meses de edad. A mediados del año, el centro de control de enfermedades (por sus siglas en inglés CDC) recomendó la interrupción de la vacuna ya que el sistema de reportes de adversidades en las vacunas (por sus siglas en inglés VAERS) envió un comunicado tras 15 casos de invaginación intestinal asociadas posiblemente a la vacuna. Meses más tarde del mismo año el consejo del comité de prácticas de inmunización (por sus siglas en inglés, ACIP) y la CDC suspendieron definitivamente la vacuna tras investigaciones realizadas en E.U. (Martí, 2011; Kapikian, 2011).

Posteriormente GlaxoSmithKline desarrolló una nueva vacuna monovalente a partir de una cepa humana atenuada G1P[8] (Rix 4414) (Fig 8a). Rotarix se aprobó en México en 2004 autorizado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). En el 2008 fue aprobada por la FDA. La vacuna ha demostrado su eficiencia frente a los serotipos G3, G4 y G9, compartir con la cepa P[8] y frente a cepas G2P[4] (Desselberger *et al.*, 2009).

Durante el mismo periodo, Merck desarrollo una vacuna pentavalente recombinante Bovina-Humano (Rotateq) que contiene 5 cepas de rotavirus bovino WC3, con un gen que codifica la proteina VP7 de HRV (Rotavirus Humano G1, G2, G3, y G4 y la quinta expresa el genotipo VP4 P[8] (Fig. 8b)(Kapikian, 2011).

México fue uno de los primeros países en incorporar la vacuna contra rotavirus en el calendario de vacunación sistemática infantil. Como resultado se observó que a los 2 años de la introducción de la vacuna se redujo la mortandad de niños menores de dos años en un 66% de los casos y en un 68% los casos de mortandad de niños de 12 a 23 meses de edad (WHO, 2011).



a)



b)

Fig 8. Vacunas contra rotavirus a) Vacuna monovalente Rotarix desarrollada por GlaxoSmithKline b) Vacuna pentavalente bovina-humano Rotateq desarrollada por Merck.

METODOLOGÍA

Se obtuvieron un total de 100 muestras de heces de niños con gastroenteritis durante el periodo de Agosto del 2012 a Agosto del 2013 del Hospital General de Navojoa y Hospital Infantil del Cd. Obregón. Los criterios que se tomaron fue la edad del menor (menor de 5 años), sintomatología que el menor presentaba (fiebre, vómito, deshidratación). Las muestras se recolectaron en los hospitales ya mencionados y se transportaron al laboratorio donde se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Fisiología y Biología Molecular JL302 de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

DETECCIÓN DE ROTAVIRUS Y ASTROVIRUS

Para la determinación de la presencia de rotavirus a cada uno de las muestras se les realizo el test de Rotavirus/Adenovirus del kit comercial SD Rota/adeno Rapid Test (SD Bioline). Por su parte, la detección de astrovirus se realizó mediante RT-PCR.

EXTRACCIÓN DE RNA

Para la extracción de ácidos nucleicos del genoma de rotavirus y astrovirus, se usó el método de Trizol® (Invitroge, LsReagent), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, mismas que se describe brevemente a continuación. A 200 µl de la suspensión de heces en Buffer fosfatos (PBS) al 20% se adicionó 500µl de Trizol® (Invitroge, LsReagent), posteriormente se homogenizó en vortex 10 ocasiones con intervalos de 3 a 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

Trascurrido el tiempo se le agregaron 100µl de cloroformo, se homogenizó nuevamente por vortex por 10 ocasiones con intervalos de 3 a 5 segundos y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C (Centrifuga LabNet International Inc®.). Terminado el proceso de centrifugación se observó dos fases, la fase acuosa y la fase orgánica, donde cuidadosamente de la fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo y etiquetado correctamente y se le adicionó 400µl de alcohol isopropílico, se homogenizó suavemente por inversión en 10 ocasiones, incubando a -20°C durante 1 hora, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C (Centrifuga LabNet International Inc®.) Se observó una pastilla de pellet donde cuidadosamente se retira el sobrenadante, después se adicionó 1 ml de etanol absoluto, homogenizando suavemente por inversión,

después se centrifugó a 12,000 rpm por 7 minutos a 4°C (Centrifuga LabNet International Inc®.) se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de RNA en 1 ml de etanol al 70%, se homogenizó por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos (Centrifuga LabNet International Inc®). Se retiró el sobrenadante completamente, que no queden residuos de alcohol y se dejó secar la pastilla de RNA en campana de flujo laminar (Labconco, purifierbiological safety cabinet®) por un tiempo de 10-30 minutos. La pastilla de RNA se resuspendió en 20µl de agua miliQ y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Suspensión de heces que se tiene en PBS al 20%, en un tubo eppendorf de 1.5; se le adicionó 500 µl de Trizol® (Invitrogen, LS Reagent), se homogenizó vía vortex 10 ocasiones con intervalos de 3 a 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Trascorrido el tiempo se le agregaron 100µl de cloroformo, homogenizando nuevamente por vortex en intervalos por 10 ocasiones con intervalos de 3 a 5 segundos y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se centrifugó a 12,000 RPM durante 15 minutos a 4°C (Centrifuga LabNet International Inc®.). Terminado el proceso de centrifugación se observó dos fases, la fase acuosa y la fase orgánica, donde cuidadosamente de la fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo y etiquetado correctamente y se le adicionó 400µl de alcohol isopropílico, se homogenizó suavemente por inversión en 10 ocasiones,

incubando a -20°C durante 1 hora, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C (Centrifuga LabNet International Inc®.) Se observó una pastilla de pellet donde cuidadosamente se retira el sobrenadante, después se adicionó 1 ml de etanol absoluto, homogenizando suavemente por inversión, después se centrifugó a 12,000 rpm por 7 minutos a 4°C (Centrifuga LabNet International Inc®.) se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de RNA en 1 ml de etanol al 70%, se homogenizó por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos (Centrifuga LabNet International Inc®). Se retiró el sobrenadante completamente, que no queden residuos de alcohol y se dejó secar la pastilla de RNA en campana de flujo laminar (Labconco, purifierbiological safety cabinet®) por un tiempo de 10-30 minutos. La pastilla de RNA se resuspendió en 20µl de agua miliQ y se almaceno a -20°C hasta tu posterior uso.

SÍNTESIS DE cDNA.

El RNA de las muestras positivas para rotavirus y las muestras a analizar para astrovirus se sometió a una retrotranscripción para la determinación de VP4 y VP7 y para astrovirus con las siguientes condiciones: Se preparó una mezcla con un primer extremo 0.1µm (Con2, VP4R o VP4B para el gen VP4; End9, 9CON2 o VP7R para VP7 y MON 270 o MON 348 para astrovirus)(Tabla 6) y 2 µl de RNA genómico de rotavirus o astrovirus, para tener como volumen final de 3.0µl. Esta mezcla se colocó en un termociclador (Applied Biosystem) a 95°C por 5 minutos, después se incubó en hielo por 5 minutos. Posteriormente, a esta

reacción se le adicionó una segunda mezcla que contenía: Buffer 5X (Tris-HCl, 250 mM; KCl 375 mM; MgCl₂ 15mM; DTT 50 mM), dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 10 mM y 2 U de transcriptasa reversa (M-MLV Reverse Transcriptase, PROMEGA®). Para un volumen final de 10µl. El contenido de esta mezcla se le adicionó a la mezcla inicial (conteniendo el RNA y el oligonucleótido correspondiente), posteriormente se sometió a 42°C por 60 minutos, seguido de 5 minutos a 95°C (Gentschet *al.*, 1992; Gouvea *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2000).

AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES VP7 Y VP4 DE ROTAVIRUS Y LA REGIÓN ORF1b Y ORF2 DE ASTROVIRUS.

El cDNA obtenido de la retrotranscripción se sometió a una Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la finalidad de amplificar el gen completo de VP7 y VP4, para optimizar la amplificación de los genes de VP4 y VP7 por PCR se utilizaron tres distintos juegos de oligonucleótidos. La mezcla se preparó de la siguiente manera: Buffer 1X (Green GoTaq, PROMEGA), MgCl₂ 10 mM, los oligonucleótidos sentido 25 micromolar (Beg9, 9CON1 o VP7F para VP7; CON3, VP4F o VP4A para VP4; y MON 269 o MON 340 para astrovirus), y los primers antisentido (End9, 9CON2 o VP7R para VP7; CON2, VP4R o VP4B para VP4 y MON 270 o MON 348 para astrovirus)(Tabla 6), dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 2.5 mM, 1 unidad de GoTaq polimerasa (Promega) y 1 microlitro de cDNA para un volumen final de 12.5 microlitros, se colocó en un

termociclador (AppliedBiosystem) (Gentschet *al.*, 1992; Gouvea *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2000).

Para el caso de VP7 la reacción de PCR se sometió a un ciclo de 95°C por 3 minutos, a 30 ciclos de 3 etapas de 95°C por 45 segundos, 42°C por 30 segundos y 72°C por 90 segundos y finalmente un ciclo de 72°C por 10 minutos. Por su parte las condiciones a las que se sometió la reacción de PCR para VP4 fueron similares en tiempo y temperatura excepto por la temperatura de alineación de los oligonucleótidos que en este caso fue de 50°C. Para astrovirus se utilizaron las mismas condiciones que VP4 (Gentschet *al.*, 1992; Gouvea *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2000). El producto de PCR se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, en un buffer tris acetato EDTA (TAE) a un voltaje de 100 volts por 45 minutos y se visualizó al teñirlo con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) en exposición a luz ultravioleta en el transluminador (Bio-ImagingSystemsMiniBis Pro).

Tabla 6.

Lista de oligonucleótidos utilizados para la síntesis de cDNA y la amplificación de los genes de VP7 y VP4 rotavirus

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Posición	Amplificación en pb
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAAATTCCTGCTGG	1 a 20	1062
End9	GGTCACATCATAAATTCTAATCTAAG	1044 a 1062	
9CON1	TAGCTCCTTTTAATGTATGG	36 a 57	904
9CON2	GTATAAAATACTTGCCACCA	922 a 941	
VP7F	ATGTATGGTATTGAATATACCAC	51-72	881
VP7R	AAC TTGCCACCA TTTT TCC	914-932	
Oligonucleótido para VP4	Secuencia 5'-3'	Posición	Amplificación en pb
CON3	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	11 a 32	876
CON2	ATTTGGGACCATTTATAACC	868 a 887	
VP4F	TATGCTCCAGTNAATTGG	132-149	663
VP4R	ATTGCATTTCTTCCATAATG	775-795	
VP4A	TGGCTTCGTTCAATTTATAGACA	11-32	1084
VP4B	CTAAATGCTTTGAATCATCCCA	1072-1094	

Tabla 7.

Lista de oligonucleótido utilizado para la síntesis de cDNA y la amplificación de la región ORF1a y ORF2 de Astrovirus

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Posición	Amplificación en pb
Mon269	CAACTCAGGAAACAGGGTGT	4526-4545 nt	449 ORF 2
Mon270	TCAGATGCATTGTCATTGGT	4955-4974 nt	
Mon340	CGTCATTATTTGTTGTCATACT	1260 nt	289
Mon348	ACATGTGCTGCTGTTACTATG	1470 nt	

PURIFICACIÓN DE PRODUCTO DE PCR

Para la purificación del producto de PCR tanto para VP7, VP4 de rotavirus y astrovirus se utilizó un kit de purificación de ácidos nucleicos Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La metodología se describe brevemente a continuación: se agregó en partes iguales la solución MembraneBindingSolution a la amplificación de PCR. Después se pasó a la purificación de DNA por centrifugación. Donde se ensambla la minicolumna en el tubo colector, se le agregó el producto de PCR y se dejó incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se centrifugó la mini columna a 14,000 RPM por 1 minuto (Centrifuga LabNet International Inc®). Posteriormente se removió y se descartó el líquido del tubo colector, y se volvió a colocar la mini columna en el tubo. Se lavó la mini columna con 700µl de MembraneWashSolution (Wizard SV Gel and PCR Clean-up System®) y se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto, se descartó el líquido resultante, este mismo lavado se realizó con 500µl de la solución membranewashsolution (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System®) y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos (Centrifuga LabNet International Inc®). Por último, se transfirió la SV Minicolumn (Wizad SV Gel and PCR Clean-Up System®) a un tubo eppendorf previamente etiquetado, se le agregó 50µl de Nuclease-Free Water (Wizar SV Gel and PCR Clean-Up System®) y se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Finalmente se almaceno a -20°C hasta su uso.

CLONACIÓN

Para clonar los genes de rotavirus y astrovirus se realizó la ligación de gen de VP4, VP7 o la región ORF1a y ORF2 en el vector de clonación pGEM-T (Promega ®). El procedimiento realizado se describe brevemente a continuación. Para la realización de ligación se combinó el vector de clonación pGEMT y el gen a clonar en una relación 1:3 (Tabla 8). La mezcla se homogenizó por medio de pipeteo y se dejó incubar por 1 hora a una temperatura de -20°C. Posteriormente se prosiguió con la transformación de células competentes JM109.

Tabla 8.
Reacción de ligación

	1RX
2X Buffer T4	5.0 µl
Vector pGEM	0.5 µl
Producto de PCR	2.5 µl
DNA T4 ligasa	1.0 µl
H2O	1.0 µl
Total	10 µl

La reacción de ligación se centrifugó 1 minuto a 14,000 rpm (Centrifuga LabNet International Inc®). Dos microlitros de la reacción de ligación se transfirieron aun tubo eppendorff de 1.5 y se adicionaron 50 µl de bacterias competentes JM109 (Promega®) se homogenizó suavemente y se dejó incubar en hielo por

30 minutos. transcurrido el tiempo se dio un shock térmico por 90 segundos en un baño María a 42°C y rápidamente se incubó en hielo por 2 minutos, después se agregaron 400 µl de caldo LB al tubo, se incubó por 1.5 horas a 37°C con agitación aproximadamente 150 rpm (ShakingIncubator®). Posteriormente, la mezcla se plaqueó con varilla de vidrio en placas de agar LB con antibiótico (100 mg/mL) se dejó incubando toda la noche a 37°C, aproximadamente 12 a 18 horas (ShakingIncubator®).

PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

De las placas de LB se seleccionó una clona y se inoculó en 3 ml de caldo LB con antibiótico y se incubó toda la noche a 37°C con una agitación aproximada de 200 rpm (ShakingIncubator®). Para la purificación del plásmido se utilizó el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA PurificationSystem®, se realizó en dos fases, la primera la producción del lisado donde se tomara 2 ml de caldo LB que se incubó anteriormente. Se centrifugó de 1 a 2 minutos a 21°C a 10,000 rpm (Centrifuga LabNet International Inc®.) y se retiró el sobrenadante por completo cuidando de no remover el pellet de bacterias. Este pellet se resuspendió en 250 µl de Cellresuspension solución (Wizard plus SV Minipreps DNA PurificationSystem®). Posteriormente se agregó 250 µl de Celllysis solution (Wizard Plus SV Minipreps DNA PurificationSystem®) y se mezcló por inversión el tubo en 4 ocasiones, se incubó a temperatura ambiente en un lapso de 1 a 5 minutos debe aclararse. Pasado el lapso de tiempo se le adicionó 10 µl de

AlkalineProteaseSolution (Wizar plus SV Minipreps DNA PurificationSystem®) y se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. La siguiente fase en la purificación del plásmido donde el lisado claro obtenido en la primera fase se pasó a una minicolumna previamente colocada en un tubo colector, se centrifugó la minicolumna con el sobrenadante a una velocidad máxima por 1 minuto (Centrifuga LabNet International Inc®), del tubo colector se descartó lo filtrado y se le agregó 750µl de Columna WashingSolution (Wizar Plus SV Minipreps DNA PurificationSystem®) y se centrifugó a una velocidad máxima por un minuto (Centrifuga LabNet International Inc®). Se descartó nuevamente el sobrenadante, se repito el lavado anterior pero ahora con 250µl de Columna WashingSolution (Wizar Plus SV Minipreps DNA PurificationSystem®) y se centrifugó a una velocidad máxima por un tiempo de 5 minutos (Centrifuga LabNet International Inc®). Se descartó lo filtrado y ahora la columna se pasó a un tubo eppendof de 1.5 previamente etiquetado. Para poder eluir el DNA de la columna, se le adicionó 100µl de Water free DNAsas (Wizar Plus SV Minipreps DNA PurificationSystem®) en el centro de la columna con mucho cuidado de no tocar la membrana, finalmente se centrifugó a una máxima velocidad por 1 minuto a una temperatura ambiente (Centrifuga LabNet International Inc®). Por último se retiró la minicolumna y el plásmido purificado se almacenó a -20°C hasta su uso.

SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIA

Para la confirmación de la purificación de las muestras se realizó una electroforesis de agarosa al 1.5%. Obtenidas las muestras purificadas estas se cuantificaron en el nanodrop a una frecuencia de 260 con un margen de lectura 280. En un volumen final de 16 μ l en un tubo eppendorf, se le agrego 10pmoles del oligo para secuenciar (1 μ l de solución de oligo 10uM pmol/ μ l). Y se enviaron al servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos. Para el análisis de secuencia se utilizó el software Mega 6.

RESULTADOS

El propósito de este estudio fue caracterizar, mediante técnicas de biología molecular, las variantes genóticas de rotavirus y astrovirus presentes en el área de estudio. En total se analizaron 100 muestras de heces de niños con gastroenteritis atendidos en el Hospital General de Navojoa y en el Hospital del Niño y la Mujer de Cd. Obregón. Las muestras fueron recolectadas durante el periodo de Agosto del 2012 a Agosto del 2013.

DETECCIÓN DE ROTAVIRUS Y ASTROVIRUS

De las muestras de heces se detectó rotavirus en 14% de los casos. Esta detección se realizó previamente mediante el test rápido comercial SD Rota/Adeno Rapid Test (SD Bioline®) por Quintero y Espinoza en 2013. En este trabajo nos enfocamos en la caracterización y análisis de las secuencias positivas para rotavirus. Por otro lado, los casos de gastroenteritis se detectaron mediante RT-PCR. Se detectaron 7(7/100) muestras positivas para Astrovirus..

DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIA DE LA REGIÓN ORF1b Y ORF2 DE ASTROVIRUS

Para determinar las muestras positivas para Astrovirus, se realizó directamente la síntesis de cDNA a partir del RNA genómico, posteriormente se amplificó la

región ORF1a y ORF2 de Astrovirus, para esto se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos (Tabla 11). El resultado indicó la presencia de un total de 4 muestras amplificadas con el oligonucleótido MON269/MON270 y tres muestras amplificadas con el oligonucleótido MON340/MON348 (Tabla 11). En total se detectó Astrovirus en 5 (5/100, 7%) de las muestras analizadas (Fig. 12). Así mismo, se detectó un caso de coinfección de Astrovirus y Rotavirus.

Por otro lado, se secuenciaron dos de las muestras positivas para Astrovirus, en una de las muestras amplificó la región fue ORF1b y en otra la región ORF2. Del análisis de secuencia, una muestra presentó una identidad del 98% con HAstV-2 (KP064287) y otra de las muestras presentó una identidad de 98% con HAstV-6.



Fig. 9 Amplificación de astrovirus regiones ORF1a y ORF2, Carril-1 Mpb, MON340-MoN348, carril-2 (269 pb), MON269-MON270, carril 3 y 4 (449 pb), en los carriles 5 y 6 la amplificación con MON269-270 se encuentran entre 500 y 400 pb, tomando como positivas para astrovirus.

Tabla 9.

Amplificación de la fracción ORF2 y ORF 1a para Astrovirus con el número de muestras amplificadas.

OLIGONUCLEOTIDOS	Amplificación (pb)	MUESTRAS
MON269-MON270	449	3
MON340-MON348	289	2
Total		5

AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE VP7 Y VP4 DE ROTAVIRUS

Para amplificar el gen de VP7 y de VP4 se utilizaron tres diferentes juegos de oligonucleótidos respectivamente (Tabla 10). La amplificación del gen de VP7 se realizó en 6 (6/14, 43%) de las muestras positivas para rotavirus (Fig.10a).

Tabla 10.

Muestras amplificadas con los diferentes juegos de oligonucleótidos para el gen de VP7

JUEGOS DE OLIGONUCLEOTIDOS	Tamaño del producto de PCR (pb)	MUESTRAS AMPLIFICADAS
Beg9-End9	1062	4
9CON1-9CON2	904	2
VP7F-VP7R	881	0
9CON1-Beg9	1026	1
Total		6

Por otro lado, para VP4 también se utilizaron tres distintos juegos de oligonucleótidos específicos (Tabla 11). En los resultados se observó que el gen

GENOTIPOS DE ROTAVIRUS Y ANÁLISIS DE SECUENCIA ANÁLISIS DEL GEN QUE CODIFICA PARA VP7

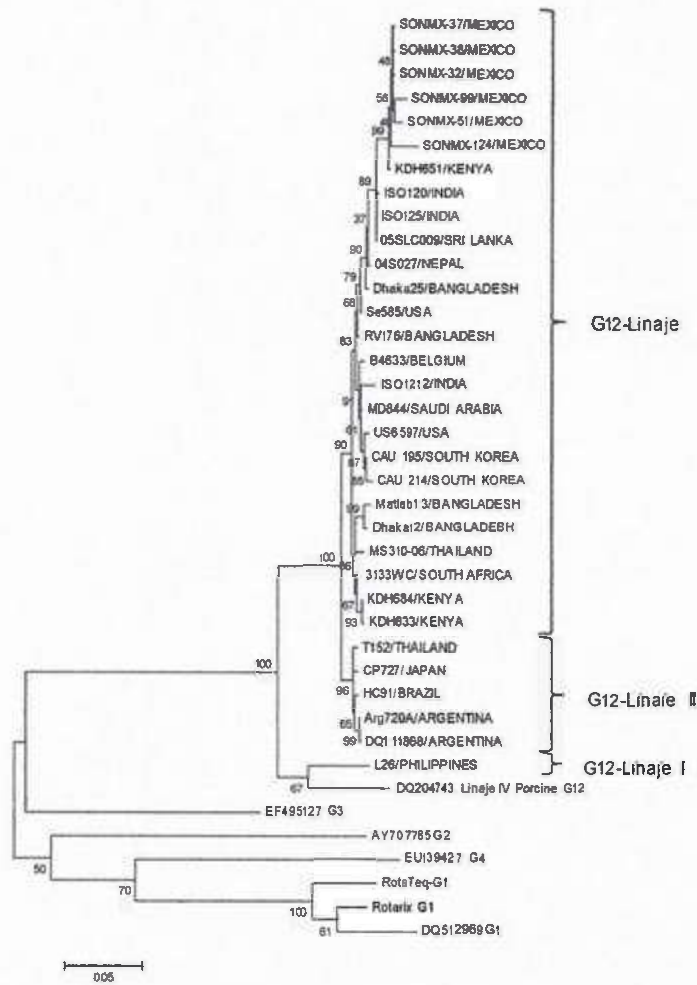
De las muestras amplificadas el análisis de secuencia reveló la presencia de rotavirus genotipo G12P[8] en 4 (4/14, 28.5%) de las muestras, G12P[?] en 2 (2/14, 14.3%) y G?P[8] en 3 (3/14, 21.42%) de las muestras positivas para rotavirus. Las muestras secuenciadas se subieron a la página del centro nacional de información Biotecnológico (por sus siglas en inglés NCBI) y quedaron registradas con los siguientes códigos de acceso: SONMX-32 (KP119464), SONMX-37 (KP119465), SONMX-38 (KT852964), SONMX-51 (KT852965), SONMX-99 (KP119466), SONMX-124 (KP119467).

Por su parte, el análisis de secuencia del gen de VP7 genotipo G12 reportado en este estudio mostró una identidad de secuencia de 98-99% de cepas de rotavirus G12 reportadas en Kenya (AB861961), India (EU016453), y Sri Lanka (AB306268) (Ahmed *et al.*, 2010; Komoto *et al.*, 2014). El análisis filogenético del gen VP7 mostró que el genotipo G12 se agrupa en el linaje III (Fig.11a). La alineación de antígenos de genotipo G12 de VP7, se reveló algunas variaciones de aminoácidos con respecto al genotipo G1 de Rotarix® y RotaTeq® (Fig.11b).

ANÁLISIS DEL GEN QUE CODIFICA PARA VP4

El análisis de secuencia de la región VP8* de la proteína VP4 demostró una identidad de 99% con cepas de rotavirus de Kenya (AB861959), Uganda (KJ753730), Sur Africa (KJ752364) y Buthan (AB905370). Por otro lado, el

a)



b)

Strain	G/Linaje	7-1a										7-1b					7-2										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
Rotarix	G1	T	T	N	G	E	Q	S	V	V	D	K	Q	N	N	T	K	D	Q	N	S	E	A	E	A	E	A
RotaTeq	G1					D														S							
L26	G12/I	N	T	P	D		D	A		N			D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
Arg720A	G12/II	S	T	P	D		D	A					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
HC91	G12/II	S	T	P	D		D	A					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
T152	G12/II	S	T	P	D		D	A					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
CP727	G12/II	S	T	P	D		D	A					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
KDH651	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
ISO125	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
05SLC009	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
04S027	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
Dhaka25	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
B4633	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
Se585	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
3133WC	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
SONMX-32	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
SONMX-37	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
SONMX-39	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
SONMX-51	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
SONMX-99	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
SONMX-124	G12/II	S	T	P	D		D	S					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A
DQ204743	G12/IV	N	T	P	D		D	A					D	N	Q	Q	N	S				E	A	E	A	E	A

Fig. 11 Análisis de secuencia y filogenético del gen VP7 de genotipo G12. a) Análisis filogenético de la secuencia de nucleótido del gen VP7 de cepas de rotavirus genotipo G12 reportadas en este estudio (SONMX-32, SONMX-37, SONMX-38, SONMX-62, SONMX-99, SONMX-124), junto con cepas de referencia descargados desde la base de datos GenBank (Anexo 1). El árbol filogenético se construyó en base al método de maximum likelihood. El valor estadístico se determinó mediante el método bootstrap (1000 repeticiones). b) Alineación de residuos antígenos de la región VP7 de cepas de rotavirus genotipo G12.

análisis filogenético de VP4 revelo la presencia de diferentes linajes del genotipo P[8] (Fig.12a). Las cepas aisladas en el presente estudio se agruparon en el linaje V, mientras que otras secuencias reportadas previamente en México (aisladas en 2005, 2007 y 2008) se agruparon en diferentes linajes. Por otro lado, la secuencia de aminoácidos deducida de la región antigénica de VP8* reveló la presencia de variaciones de la secuencia en algunos epítopes antigénicos conocidos en comparación con rotavirus genotipo P[8] de las cepas vacunales de Rotarix® y RotaTeq® (Fig. 12b).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizaron cepas de Astrovirus y Rotavirus en niños menores de 5 años con gastroenteritis. En el caso de Astrovirus se encontraron cepas de genotipo HastV-2 y HastV-6 en el área de estudio. Algunos reportes de astrovirus realizados en la India sugieren una incidencia del 34% en niños menores de dos años, resultados similares se reportaron en Brasil (Ramírez *et al.*, 2014). En México, la incidencia de HAstV-2 se estima en un 35% (Méndez and Arias, 2007).

De los ocho tipos de astrovirus HastV-1 es considerado el más prevalente y HastV-6, 7 y 8, no son detectados comúnmente (Mustafa *et al.*, 2000; Guixet *al.* 2002; Méndez-Tosset *al.* 2004). En 1993 se determinó por primera vez la secuencia del genoma de longitud completa para HastV (HastV-2) (Guo *et al.*, 2010). Posteriormente, estudios realizados en Novosibirsk, Russia, reportaron las variaciones genéticas de HastV-2 subgenómicos y entre otros genotipos HastV-4 y HastV-8 (Babkin *et al.*, 2014). Por su parte, HastV-6 se ha identificado como causante de brotes esporádicos de gastroenteritis aguda a nivel mundial (Guo *et al.*, 2010). En el 2007 un estudio realizado en China, sugiere que esta cepa podría epidemiológicamente relevante (Gouet *al.*, 2010). Esto indica que los estudios genómicos son importantes para la comprensión y evolución molecular entre los genotipos de HAstV.

Por otro lado, entre los genotipos de VP7 de rotavirus que más se ha reportado comúnmente a nivel mundial se encuentra G1, G2, G3, G4 y G9. Algunos de los genotipos reportados esporádicamente son G5, G8 y G12. (Rahman *et al.*, 2007; Santos and Hoshino, 2005). En este estudio se detectaron cepas de rotavirus G12P[8], la incidencia de estas cepas se han reportado previamente en países como Kenya, India, Sri Lanka y Rochester y se ha considerado como un genotipo de rotavirus emergente a nivel mundial. En el presente trabajo se reporta la presencia de rotavirus G12 por primera vez en México.

El análisis de secuencia deducida de aminoácidos de las cepas G12 aisladas en este estudio y las cepas vacunales reveló variaciones de aminoácidos en regiones de importancia antigénica en VP7. Estudio realizado en Indonesia en el 2010, pacientes que estaban infectados con la cepa de rotavirus G12, presentaba diarrea y vómito, deshidratación y desnutrición, fueron hospitalizados durante 6 días, y fue dado de alta después de haberse recuperado (Aspiroz *et al.*, 2010). En el estudio realizado los pacientes eran ambulatorios e incluso algunos de los infantes ya habían sido vacunados contra rotavirus, esto indica que las vacunas actuales podrían no ser tan eficientes ante infecciones de rotavirus G12.

La detección de cepas de Rotavirus y Astrovirus emergentes deja en claro la necesidad de más estudios de monitoreo epidemiológico y caracterización molecular de estos virus. En el caso de astrovirus se requiere de más estudios

para establecer claramente el papel de las variaciones de genotipo de HAstV en la gastroenteritis aguda. Por otro lado, la presencia de cambios en las regiones antigénicas de las cepas G12P[8] reportadas en este estudio con respecto a las cepas vacunales, señala la necesidad de evaluar continuamente la eficiencia de la vacuna y valorar nuevas estrategias de prevención.

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se reportó, por primera vez, la detección de rotavirus emergente genotipo G12 en México. El análisis de secuencia deducida de aminoácidos de las cepas G12P[8] reportadas en este estudio y de las cepas vacunales mostró la presencia de variaciones de aminoácidos en regiones antigénicas tanto de VP7 como VP4. Este análisis indica que las vacunas actuales pueden estar perdiendo eficacia contra cepas genotipo G12; sin embargo, se requieren más estudios al respecto para comprobar esta hipótesis.

Por otra parte, la incidencia de astrovirus en los casos de niños con gastroenteritis fue del 5% (5/100), esto coincide con lo reportado previamente en otros estudios. El análisis de genotipos reveló la presencia de Astrovirus genotipo-6 en una de las muestras. Este genotipo es poco común y se considera un genotipo emergente asociado a gastroenteritis aguda en niños.

Debido a lo anterior, es recomendable continuar en la búsqueda y caracterización molecular de variantes de Rotavirus y Astrovirus en la región de estudio. Éste tipo de análisis de monitoreo epidemiológico puede contribuir con la evaluación de la eficiencia de las vacunas actuales y con el planteamiento de nuevas estrategias preventivas contra enfermedades gastrointestinales de origen viral.

BIBLIOGRAFÍA

Adsarias, F. R., Deya, M. A., (2008). Principios y manejos de la gastroenteritis aguda en pediatría Vall D' HebronHospital. ISBN: 978-84-8473-869-5.

<https://www.gastroinf.es/sites/default/files/files/Protocolos%20SEGHNP.pdf>

Bellido, J.B., (2007), 6ª. Monografía de la sociedad española de epidemiología. Epidemiología de la Gastroenteritis aguda víricas. Aspectos Actuales; 2007; ISBN: 84-96277-12-7; 37-39.

Caballero, S., GuixW. M., El-Senousy I. C.,Pinto, R. M.and Bosch, A (2003). Persistent Gastroenteritis in Children infected with Astrovirus: Association with serotype-3 strain. Journal of Medical virology 71:245-250. DOI: 10.1002/jmv.10476. 2003

Cabello, R., Benavente, I. F.,*Síndrome Diarrea infecciosa*. Médica Panamericana, 2002. Pág. 84-87.

Cortes, E. J., Curnst, A. Tate, E. J., Cortese, M. M. (2011). Rotavirus vaccine and Health care utilization for Diarrhea in U.S. Children. N. Engl. J. Med. 2011; 365:1108-1117.

Campins M. M., Moraga-Liop, F. (2011) Vacunas antirrotavirus un largo y difícil camino. GastroenterolHepatol. 2011; 34(10): 694-700.

Carter, M. J. & M. M. Willcocks. 1996. The molecular biology of astroviruses. Arch. Virol. 12(Suppl):277-285.

Gavilan M., García A. B, González M. R. (2010). Gastroenteritis aguda. Protocolos diagnosticos-Terapeuticos de la AEP. Infectiología pediátrica. 2010. <http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/gea.pdf>

Knipe, D. M. Howley, P. M., Cohen, J. I., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Racaniello, V. R., Roizman, B. *FIELDS VIROLOGY*, sixth Edition. Volume one. 2013.

Knipe, D. M. Howley, P. M., Cohen, J. I., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Racaniello, V. R., Roizman, B. *FIELDS VIROLOGY*, sixth Edition. Volume two. 2013.

Gabbay, B., Alexandre, C. Y., Olivera D. (2007). First detection of a human astrovirus type 8 in a child with diarrhea in Belém, Brazil: comparison with other strain worldwide and identification of possible three lineages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, vol. 102(A): 531-524, June 2007.

Geigenmüller, U., N. H. Ginzton, & S.M. Matsui. 1997. Construction of a genome-length cDNA clone for human astrovirus serotype 1 and synthesis of infectious RNA transcripts. *J. Virol.* 71:1713-1717.
Geigenmüller, U., N. H.

Ginzton, & S. M. Matsui. 2002b. Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. *J. Gen. Virol.* 83:1691-1695.

Guix A. S. La proteína nsP1a/4 y el ciclo Biológico de Astrovirus: aplicación en epidemiología molecular. Universidad de Barcelona. 2003.

Gutiérrez M. F., Matiz A., Ulloa J. C. y Alvarado M. (2015). Astrovirus (HAstV) como agente causal de diarrea en niños colombianos: siete años de estudio. *Nova-publicidad científica* ISSN: 1974-2470 vol. 3, 2015

Jayaram, H., Estes, M. K., Venkataram P. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Viruses Research* 101: 67-81. 2004

Jiang, B., Monroe, S. S., Koonin E. V., Stine, S. E., & Glass, R. I. (1993). RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10539-10543. 1993

Jonassen, C. M., Jonassen, T. O., Sveen, T.M., & Grønder, B. (2003). Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. *Virus Res.* 91:195-201. 2003

Komoto, S., Wandera A.E. Shah M.O. (2014) Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8] Rotavirus strains that have emerged in Kenya: Identification of porcine-like NSP4 genes. *Infection, Genetics and Evolution* 27 (2014) 277–293. [doi:10.1016/j.meegid.2014.08.002](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.002)

Koonin, E. V. 1991. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 71:2197-2206.

Lee, T. W. & J. B. Kurtz. 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol. Infect.* 112:187-193

Lee, T. W. & Kurtz, J. B. 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol. Infect.* 112:187-193. 1994

Hernandez, C. C., Aguilera A. M. (2003). Situación de las enfermedades gastrointestinales in México. *Enf. Inf. Microbiol*, 31 (4): p. 137-151. 2003

Herrmann, J. E., Hudson, R. W., Perron-Henry, D. M., Kurtz, J. B., & Blacklow, N. R. 1988. Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 158:182-185. 1988

Stephen Berger. *Rotavirus Global status Gideon E-book series*. 2015. Gideon Informatics, Inc. Pág.4-9.

Medici, M. C., Tummolo, F., Caldero A. (2009). MLB1 astrovirus in children with gastroenteritis Italy; emerging diseases. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 20, No. 1. 2014

Mietzner. A T., Books F. G., Morse A. S., *Microbiologia Medica*. 25a ed. 2011. P 510-511.

Mendez E, Arias CF, Astroviruses; In: Knipe DM, Howley PM, Griffin. De, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al., editors. *Fields Virology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. P. 981-10.

Mudan, S., 2003: Molecular characterization of Astroviruses by transcriptase PCR and sequence analysis. Comparison of clinical and environmental isolates from south Africa. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 747-74-53. 2003

Murray P. P., Rosenthal S.K., Pfaller A. M. *Microbiologia Medica*, 7a edición. 2013. P. 541-546.

I.Pagés, C. J.; Allué P. I. (2010). Guía de práctica clínica gastroenteritis aguda en niños; Guía multidisciplinaria SEGHP-SEIP. Sociedad española de infectología pediátrica (SEIP); 2010.

Finkbeiner, S., Binh-Minh L., Holtsloru, R. (2009). Detection of newly described Astrovirus MLB1 in stool samples from children. Vol 15, no 3, 2009.

Ramirez, R. Ry, J. (2014). Prevalencia de astrovirus en pacientes con enfermedad diarreica aguda del hospital Sona Rafael de Turija (Colombia). Saldd Soc. UPTC. 2014; 1 (1): 26-30.

Román R. E. (2006) Vacunación frente a Rotavirus Bol. PEDIATR 2006; 46: 185-191.

Ryan J. K., Ray G.C. *Sherris Microbiologia Medica*. Quinta edición .Mc Graw Hill Interamericana Editores . 2011 Pág. 209-213.

Méndez, E. M. P.Salas-Ocampo, E., Munguía, M. E., & Arias C. F. 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. J. Virol. (En prensa).

Méndez-Toss, M., Romero-Guido P., Munguía M. E., Méndez E., & Arias C. F. 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. J. Gen. Virol. 81:2891-2897. 2000

Mitchell D.K. Astrovirus gastroenteritis. (2002). *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:1067-9.

Sánchez-Fauquier, A., Carrascosa A. L., Carrascosa, J. L., Otero, A., Glass, R. I., López, J. A., San Martín, C., & Melero, J. A. (1994). Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology* 201:312-320. 1994

Sánchez –Fauquier, A., Roman E., Colima J. (2005) Características clínicas y microbiológicas de gastroenteritis por astrovirus control de calidad SEIMCp:1-8. 2005.

Sebire, N. J., Malone, J. and Cubitt W. D. (2004). Pathology of astrovirus associated diarrhea in a paediatric marrow transplant recipient. *J. Clin. Pathol.* 2004; 57(9): 1001-1003.

Sirok, A., V. Le pera, Sandind. *Agentes virales de gastroenteritis* capítulo 29, 519-529, 2003.
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/virusgastroenteritis.pdf>

VerelaMartinezMaria del Carmen. *Gastroenteritis aguda vírica. Centro nacional de epidemiologia instituto de san Carlos III.* Emisa. Cap 1, 19-21. 2007

Yalda, A. L. (2014). Etiología y Manejo de la gastroenteritis aguda infecciosa en niños y adultos *Rev. Med. Clin. Condes*; 25(3) 463-472. 2014.

ANEXOS

Código de acceso a la secuencia al Banco de genes (por sus siglas en inglés NCBI) para VP7 genotipo G12.

SONMX-32 (KP119464), SONMX-37 (KP119465), SONMX-38 (KT852964), SONMX-51 (KT852965), SONMX-99 (KP119466), SONMX-124 (KP119467), KDH651 (AB861961), ISO125 (EU016497), ISO120 (EU016451), 05SLC009 (AB306268), 04S027(AB263987), Dhaka25(DQ146654), Se585/USA(AJ311741),RV176 (DQ490556),B4633(DQ146643), ISO1212(EU016460), MD844 (AB269689), US6597 (FJ152121), CAU 195 (EF059916), CAU 214(EF059917), MatLab13(DQ146676), Dhaka12(DQ146665), MS310-06(AB436814), 3133WC(HQ657154), KDH684(AB861972), KDH633(AB861950), CP727 (AB125852), T152 (AB071404), HC91 (AY855065), Arg720A (EU496257), ARGENTINA (DQ111868) and L26 (M58290).

Código de acceso para la secuencia de VP4 genotipo P[8] al banco de genes (siglas en ingles NCBI).

SONMX-32 (KP119460), SONMX-37 (KP119461), SONMX-39 (KT852962), SONMX-62 (KT852963), SONMX-124 (KP119463), KDH651(AB861959), DPRU75 (KJ752364), DPRU4620 (KJ753730), BTN-120 (AB905370), HR-15 (KJ855216), Ro4439 (JN711100), RT095-07 (JQ069655.1), UK-HLD (JX411972), VU08-09-40 (KC442932), VU08-09-39 (JF790352), R1949 (HM035525), 1670SR (KJ412735), Arg7500 (JN088445), M12-15 (KC484719), GRAVP430 (AB553325), 8340 (JN580414), BE00097(JN258920), STHY125 (JX470501), MX07-623 (JX012339), MX07-588 (JX012338), MX07-577 (JX012337), MX07-575 (JX012336),MX07-553 (JX012335), MX07-550 (JX012334), MX05-276 (JX012333), MX05-227 (JX012332), MX05-100 (JX012331), MX05-54 (JX012330), MX08-737 (HQ585866), MX08-680 (HQ585865), MX08-674 (HQ585864), MX08-740 (FJ665391), MX08-659 (FJ665390), MX07-557 (FJ665389), MX07-555 (FJ665388), MX07-554 (FJ665387), MX07-532 (FJ665386), MX07-531 (FJ665385), MX05-68 (FJ665384), MX05-87 (FJ665383), MX05-51 (FJ665382), MX05-43 (FJ665381), MX04-29 (FJ665380), SC0028_P[6](KC814598) and KJ940075(SC19868_P[4]).

Nucleotide

GenBank

Human rotavirus A strain SONMX-32/G12P[8] structural protein VP7 (VP7) gene, complete cds

GenBank: KP119464.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS KP119464 1062 bp RNA linear VRL 14-MAR-2015
 DEFINITION Human rotavirus A strain SONMX-32/G12P[8] structural protein VP7 (VP7) gene, complete cds.

ACCESSION KP119464

VERSION KP119464.1 GI:766752760

KEYWORDS

SOURCE Human rotavirus A

ORGANISM [Human rotavirus A](#)
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus;
 Rotavirus A.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1062)

AUTHORS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M.,
 Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.

TITLE Detection of emerging rotavirus strains G12P[8] in Mexico

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1062)

AUTHORS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M.,
 Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (07-NOV-2014) Departamento de Ciencias Quimico Biologicas
 y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Blvd. Lazaro Cardenas,
 Navojoa, Sonora 85890, Mexico

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..1062
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /strain="SONMX-32/G12P[8]"
 /isolation_source="stool sample"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="2013"
 /note="genotype: G12"

[gene](#)

49..1029

[CDS](#)

49..1029
 /gene="VP7"
 /codon_start=1
 /product="structural protein VP7"
 /protein_id="A2519021.1"
 /db_xref="GI:766752761"
 /translation="MYGIEYTTILFLISIIILNYILKSIITNMDFIYRFLLIWVIL
 LPFIEAQNYGNIPIITGSMDTAVVNSTQQENFMSTLCLLYPSSVTEITOPWNTL
 SQLFLTKGWPVNSVYFKSYADISSFSVDPQLYCDYNIVLIQYQNSLALDVSELADLIL
 NEWLCPMDVTLVYYQQTQAEANKWISMGESCTVKVCPNLTQTLGIGCTTDDVITFEFV
 ANAEKLVITOVVDGVDVNHKINIVNTCTIRNYKKGPRNENVAIIQVGSDDVIOITADPT
 TIPQTERMMRINWKKWQVFYTVVDYINQIQVMSKRSLNSAAFYRI"

ORIGIN

```

1  ggctttaaaa gagagaattt ccgctggct  agcggttagc tcctttaat  gtatggatt
61  gaataatacca caattctaac  cttttgata  tcaattatc  tattgaacta  tatattaaaa
121  tcaataacta  atatgatgga  ttttatcata  tctcggttt  tactaatagt  tgtcatcata
181  ctgccattta  ttgaagctca  aaattatgga  ataaatctc  caataacagg  ttctatggat
241  accgcatatg  taaactctac  acaacaagag  aattttatga  cttccacttt  atgcttatat
301  tatccaagtt  cagtcacgac  tgaataaact  gatccccgact  ggacgaacac  actgtcacia
361  cttttcctga  ctaaggatg  gccggtaaat  tccgtctact  tcaagagtta  tgctgatata
421  tctctcttct  ctgtagatcc  gcagttgtat  tgtgattata  atattgtgtt  aatacagttc
481  caaaattcat  tagcgttaga  tgtctcagaa  cttgctgatt  taattttaaa  tgaatggtta
541  tgtaatacga  tggagctaac  gttgtactat  tatcaacaga  cagatgaagc  gaataaatgg
601  atatcaatgg  gagaatcatg  tacagttaaa  gtatgtccct  taaatacaca  aacttagga
661  attggatgta  cgacaaccga  cgtcacaca  tttgaagagg  tagcaaatgc  ggaaaaatta
721  gtaataactg  acgtcgtgga  tggagtcaat  cataagatta  atattacagt  gaatacatgt
781  actatacggg  attataaaaa  attaggaccg  agagaaaatg  tagcaattat  acaagttggt

```

11/12/2015

Human rotavirus A strain SONMX-32/G12P[8] structural protein VP7 (VP7) - Nucleotide- NCBI

```
841 agttctgacg tcatagacat aacagcagat ccaacaacga taccacaac tgaaagaatg
901 atggaataa actggaaaaa atggtggcag gtgtttata ccgtagtaga ttacataaat
961 caaatagtc aggtaatgc caaacgatca agatcactaa attcagctgc tttttactac
1021 agaatttaga tatagcttag attagaattg tatgatgtga cc
```

//

Nucleotide

GenBank

Human rotavirus A strain SONMX-37/G12P[8] structural protein VP7 (VP7) gene, complete cds

GenBank: KP119465.1

[FASTA](#) [Graphics](#)
[Go to:](#)

LOCUS KP119465 1062 bp RNA linear VRL 14-MAR-2015
 DEFINITION Human rotavirus A strain SONMX-37/G12P[8] structural protein VP7 (VP7) gene, complete cds.
 ACCESSION KP119465
 VERSION KP119465.1 GI:766752764
 KEYWORDS .
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM [Human rotavirus A](#)
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus; Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1062)
 AUTHORS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M., Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.
 TITLE Detection of emerging rotavirus strains G12P[8] in Mexico
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1062)
 AUTHORS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M., Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-NOV-2014) Departamento de Ciencias Quimico Biologicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Blvd. Lazaro Cardenas, Navojoa, Sonora 85890, Mexico
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1062
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /strain="SONMX-37/G12P[8]"
 /isolation_source="stool sample"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="2013"
 /note="genotype: G12"
 40..1029
 /gene="VP7"
 CDS 40..1029
 /gene="VP7"
 /codon_start=1
 /product="structural protein VP7"
 /protein_id="A1S19092.1"
 /db_xref="GI:766752765"
 /translation="MYGIEYTTIL TFL ISILLNVIKLSITNMDFIYRFLIIVWII LPFIEAQNYGINLPITGSMDTAYVNSTQQENFMSTLCLYPPSSVTTEITOPDWNTL SQLFLTKGWPNVSVVFKSYADISSFSVDPQLYCDYNIIVLIQYQNSLALOVSELADLIL NEWLCPMDVTLYYYQQTDEANKWISMGESC TVKVCPLNTQTLGIGCTT TDVITFEEV ANAEKLVITD VVDGVNHHKINITVNTCTIRNCKKLGPRENIAI IQVGSDDVIDITADPT TIPQTERMMRINWKKWQVFYTVVDYINQIVQVMSKRSRSLNSAAFYYRI"
 ORIGIN
 1 ggctttaaaa gagagaattt ccgtctgctt agcggtagc tcttttaaat gtatggtatt
 61 gaataatacca caattctaac ctttttgata tcaattatct tattgaacta tatattaata
 121 tcaataacta atatgatgga ttttatcata tatcggtttt tactaatagt tgcacata
 181 ctgccattta ttgaagctca aaattatgga ataaatcttc caataacagg ttctatggat
 241 accgcatatg taactctac acaacaagag aattttatga ctccacttt atgcttatat
 301 tatccaagtt cagtcacgac tgaataaact gatcccgact ggacgaacac actgtcacia
 361 cttttcctga ctaaaggatg gccggtaaat tccgtctact tcaagagtta tgcgtgata
 421 tcgtccttct ctgtagatcc gcagttgtat tgtgattata atattgtgtt aatacagtac
 481 caaaattcat tagcgttaga tgtctcagaa ctgctgatt taattttaa tgaatggtta
 541 tgtaatccga tggacgtaac gttgtactat tatcaacaga cagatgaagc gaataaatgg
 601 atataatcgg gagaatcatg tacagttaaa gtatgtcctt taatacaca aactttagga
 661 attggatgta cgacaaccga cgtcacaca tttgaagagg tagcaaatgc ggaaaaatta
 721 gtaataactg acgtcgtgga tggagtcaat cataagatta atattacagt gaatacatgt
 781 actatacggg attgtaaaaa attaggaccg agagaaaata tagcaattat acaagtgggt

11/12/2015

Human rotavirus A strain SONMX-37/G12P[8] structural protein VP7 (VP7) - Nucleotide- NCBI

```
841 agttctgacg tcatagacat aacagcagat ccaacaacga taccacaac tgaaagaatg
901 atgcgaataa actggaaaaa atggggcag gtgtttata ccgtagtaga ttacataaat
961 caaatagttc aggtaatgtc caaacgatca agatcactaa attcagctgc tttttactac
1021 agaatttaga tatagcttag attagaattg tatgatgga cc
```

//

Nucleotide

GenBank

Human rotavirus A strain SONMX-99/G12P[8] structural protein VP7 (VP7) gene, complete cds

GenBank: KP119466.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS KP119466 1062 bp RNA Linear VRL 14-MAR-2015
 DEFINITION Human rotavirus A strain SONMX-99/G12P[8] structural protein VP7 (VP7) gene, complete cds.
 ACCESSION KP119466
 VERSION KP119466.1 GI:766752768
 KEYWORDS .
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM *Human rotavirus A*
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus; Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1062)
 AUTHORS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M., Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.
 TITLE Detection of emerging rotavirus strains G12P[8] in Mexico
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1062)
 AUTHORS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M., Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-NOV-2014) Departamento de Ciencias Quimico Biologicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Blvd. Lazaro Cardenas, Navojoa, Sonora 85890, Mexico
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1062
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /strain="SONMX-99/G12P[8]"
 /isolation_source="stool sample"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="2013"
 /note="genotype: G1z"
 gene 49..1029
 /gene="VP7"
 cds 49..1029
 /gene="VP7"
 /codon_start=1
 /product="structural protein VP7"
 /protein_id="AJS19093.1"
 /db_xref="GI:766752769"
 /translation="MYGIEYTTIL TFLISILLNYILKSITNMMDFIIYQFLLIWVIL
 LPFIEAQNYGILNLPITGSMDTAYVNSTQQENFMTSLCLYPPSSVTTEITOPDWTNLT
 SQLFLAKGWPNVSVVFKSYADISSFSVDPQLYCDYNIVLIQYQNSLALDVSELADLIL
 NEWL CNPMDVTLYYYQQTDEANKWISMGESC TVKVCPLNTQTLGIGCTTTDVTTFEEV
 ANAEKLVITD VVDGVIHKINITVNTCTIRNCKLGPRENVAIIQVGSDDVLDITADPT
 TIPQTERMMRINWKKWQVFYTVVDYINQIVQVMSKRSRSLNLAIFYRI"

ORIGIN
 1 ggctttaaaa gagagaattt ccgtctggct agcggttagc tccttttaat gtatggatt
 61 gaataatacca caattctaac ctttttgata tcaattattc tattgaacta tataataaaa
 121 tcaataacta atatgatgga ttttatcata tatcagtttt tactaatagt tgtcatcata
 181 ctgccattta ttgaagctca aaattatgga ataaatcttc caataacagg ttctatggat
 241 accgcatatg taaactctac acaacaagag aattttatga cttccacttt atgcttatat
 301 tatccaagtt cagtcacgac tgaataaact gatccccgact ggacgaacac actgtcacia
 361 cttttctctg ctaaaggatg gccggtaaat tccgtctact tcaagagtta tgcgtagata
 421 tcgtccttct ctgtagatcc gcagttgtat tgtgattata atattgtgtt aatacagtac
 481 caaaattcat tagcgttaga tgtctcagaa cttgctgatt taattttaaa tgaatggtta
 541 tgtaatccga tggacgtaac gttgtactat tatcaacaga cagatgaagc gaataaatgg
 601 atatcaatgg gagaatcatg tacagttaaa gtatgtccct taaatacaca aactttagga
 661 attggatgta cgaacaaccg cgtcacaca tttgaagagg tagcaaatgc ggaaaaatta
 721 gtaataactg acgtcgtgga tggagtcac cataagatta atattacagt gaatacatgt
 781 actatacga attgtaaaaa attaggaccg agagaaaatg tagcaattat acaagtgggt

11/12/2015

Human rotavirus A strain SONMX-99/G12P[8] structural protein VP7 (VP7) - Nucleotide - NCBI

```
841 agttctgacg tcttagacat aacagcagat ccaacaacga taccacaaac tgaaagaatg
901 atgcgaataa actggaaaaa atggtggcag gtgttttata ccgtagtgga ttacataaat
961 caaatagttc aggtaatgtc caaacgatca agatcactaa acttagctgc tttttactac
1021 agaatttaga tatagcttag attagaattg tatgatgtga cc
```

//

Nucleotide

GenBank

Human rotavirus A strain SONMX-124/G12P[8] structural protein VP7 (VP7) gene, complete cds

GenBank: KP119467.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS KP119467 1062 bp RNA linear VRL 14-MAR-2015
 DEFINITION Human rotavirus A strain SONMX-124/G12P[8] structural protein VP7 (VP7) gene, complete cds.

ACCESSION KP119467
 VERSION KP119467.1 GI:766752772

KEYWORDS

SOURCE Human rotavirus A

ORGANISM [Human rotavirus A](#)
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus;
 Rotavirus A.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1062)

AUTHORS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M.,
 Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.
 TITLE Detection of emerging rotavirus strains G12P[8] in Mexico
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1062)

AUTHORS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M.,
 Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-NOV-2014) Departamento de Ciencias Quimico Biologicas
 y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Blvd. Lazaro Cardenas,
 Navojoa, Sonora B5890, Mexico

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES

source

Location/Qualifiers
 1..1062
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /strain="SONMX-124/G12P[8]"
 /isolation_source="stool sample"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="2013"
 /note="genotype: G12"

[gene](#)

49..1029

/gene="VP7"

[CDS](#)

49..1029

/gene="VP7"

/codon_start=1

/product="structural protein VP7"

/protein_id="AJS19094.1"

/db_xref="GI:766752773"

/translation="MYGIEYTTILFLIAIILLMYVLKSTITNMMDFIYQFLIIVVIL
 LPFIEAQNYGILNLPITGSMDTAYVNSTQQENFMTSTLCLYPPSSVTEITDPDWTNL
 SQLFLTKGWPNVSVYFKSYADISSFSVDPQLYCDYINIVLKQYQNSLALDVSELADLIL
 NEWLCNPMOVTLYYYQQTDEANKWISMGESCTVKVCLPLNTQLGIGCTTDTVTTFEEV
 ANAEKLVITDVVVDGVNHKINITVNTCTIRNCKKLGPRENVAIIQVGSDDVIDITADPT
 TIPQTERMIRINWKKWQVFYTVVDYINQIVQVMSKRSESLNSAAFYVRI"

ORIGIN

```

1 ggctttaaaa gagagaattt cgtctggct agcggtagc tcctttaaat gtatggatt
61 gaatatacca caatcctaac ctttttaata gcgattatcc ttttaatgta tgtattaaaa
121 caataacta atatgatgga ttttatcata tatcagtttt tactaatagt tgtcatcata
181 ctgccattta ttgaagctca aaattatgga ataaatcttc caataacagg ttctatggat
241 accgcatatg taaaccttac acaacaagag aattttatga cttccacttt atgcttatat
301 tatccaagtt cagtcacgac tgaataaact gatcccgact ggacgaacac actgtcacia
361 cttttcctga ctaaaggatg gccagtaaat tccgtctact tcaagagtta tgcgtgata
421 tctgtccttc ctgtagatcc gcagttgtat tgtgattata atattgtgtt aaaacagtac
481 caaaattcat tagcgttaga tgtctcagaa cttgctgatt taattttaaa tgaatggtta
541 tgtaatccga tggacgtaac gttgtactat tatcaacaga cagatgaagc gaataaatgg
601 atatcaatgg gagaatcatg tacagttaaa gtatgtccct taaatacaca aacttttaga
661 attggatgta cgacaaccga cgtcacaaca tttgaagagg tagcaaatgc ggaaaaatga
721 gtaataactg acgtcgtgga tggagtcaat cataagatta atattacagt gaatacatgt
781 actatacaga attgtaaaaa attaggaccg agagaaaatg tagcaattat acaagtgggt

```

11/12/2015

Human rotavirus A strain SONMX-124/G12P[8] structural protein VP7 (VP7 - Nucleotide- NCBI

```
841 agttctgacg tcatagacat aacagcagat ccaacaacga taccacaaac tgaagaatg
901 atacgaataa actggaaaaa atgggtggcag gtgttttata ccgtagtaga ttacataaat
961 caaatagttc aggttatgtc caaacgatca gaattactaa attcagctgc tttttactac
1021 agaatttga tatagcttag attagaattg tatgatgtga cc
```

//

Nucleotide

GenBank

Human rotavirus A strain SONMX-32/G12P[8] structural protein VP4 (VP4) gene, partial cds

GenBank: KP119460.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS KP119460 665 bp RNA linear VRL 14-MAR-2015
 DEFINITION Human rotavirus A strain SONMX-32/G12P[8] structural protein VP4 (VP4) gene, partial cds.
 ACCESSION KP119460
 VERSION KP119460.1 GI:766752730
 KEYWORDS .
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM [Human rotavirus A](#)
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus; Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 665)
 AUTHORS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M., Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.
 TITLE Detection of emerging rotavirus strains G12P[8] in Mexico
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 665)
 AUTHORS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M., Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-NOV-2014) Departamento de Ciencias Quimico Biologicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Blvd. Lazaro Cardenas, Navojoa, Sonora 85890, Mexico
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..665
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /strain="SONMX-32/G12P[8]"
 /isolation_source="stool sample"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="2013"
 /note="genotype: P[8]"
[gene](#) <1..>665
 /gene="VP4"
[CDS](#) <1..>665
 /gene="VP4"
 /codon_start=1
 /product="structural protein VP4"
 /protein_id="AJS19087_1"
 /db_xref="GI:766752731"
 /translation="YAPVNWGHGEINDS TTVEPILDGPVQPTTFTPTPTOYWILINSNT NGVVYESTNNGDFWT AVIAVEPHVNPVDRQYNVFGENKQFNVRNOSDKWKFLEMRGS SQTOFYNRRRLTSTOKLVGLKYGGRIWTFHGETPRATTDSSNTANLNGISITIHSEFYIIPRSQESKCKNEYINGLPPIQNTRNVWPLSLSSRSIQYKRAQVNEOITISKTLWK EMQ"

ORIGIN
 1 tatgctccag tcaattgggg tcatggagaa ataatgatt caaccacagt ggaaccaatt
 61 ttagatggtc cttatcaacc tactacattt acaccaccta ctgattactg gatacttatt
 121 aactcaata caaatggagt agtatacgag agtaccgaata atggtgactt ttggactgca
 181 gtcatgtcag ttgaaccgca cgtcaatcca gtagatagac aatataatgt atttggtgaa
 241 aataaacaat ttaattgaag aaatgattca gataaatgga agtttttaga aatgtttaga
 301 ggcagtagtc aaactgactt ttataataga cgtacactaa ctctgatac taaactcgtg
 361 ggaatattaa aatatggtgg aagaatatgg acatttcag gtgaaacacc gagggctact
 421 actgatagtt caaacactgc aaattgaaac ggtatatcaa ttacaattca ttcagaattt
 481 tatattattc caaggtccca agagtctaag tgaatgaat atattaacaa tggctacca
 541 ccaattcaaa atactagaaa tgtagtacca ttatcgttat catctagatc tatacagtat
 601 aagagagcac aagttaatga agacattaca atttcaaaga cttcattatg gaaagaaatg
 661 caata

//

Nucleotide

GenBank

Human rotavirus A strain SONMX-37/G12P[8] structural protein VP4 (VP4) gene, partial cds

GenBank: KP119461.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS KP119461 665 bp RNA linear VRL 14-MAR-2015
 DEFINITION Human rotavirus A strain SONMX-37/G12P[8] structural protein VP4 (VP4) gene, partial cds.
 ACCESSION KP119461
 VERSION KP119461.1 GI:766752734
 KEYWORDS
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM *Human rotavirus A*
 Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus; Rotavirus A.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 665)
 AUTHORS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M., Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.
 TITLE Detection of emerging rotavirus strains G12P[8] in Mexico
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 665)
 AUTHDRS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M., Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-NOV-2014) Departamento de Ciencias Quimico Biologicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Blvd. Lazaro Cardenas, Navojoa, Sonora 85890, Mexico
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..665
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /strain="SONMX-37/G12P[8]"
 /isolation_source="stool sample"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:10941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="2013"
 /note="genotype: P[8]"
[gene](#) <1..>665
 /gene="VP4"
[cds](#) <1..>665
 /gene="VP4"
 /codon_start=1
 /product="structural protein VP4"
 /protein_id="A1519088.1"
 /db_xref="GI:766752735"
 /translation="YAPVNWGHGE INDS TTVEPI LDG PYQPTTFTPTDYWILINSNT
 NGVVYESTNNGQFWTAVIAVEPHVNPVDRQYNVVFGENKQFNVRNDSKWKFLEMFRGS
 SYTDFYNRRTL TSDTKLVGILKYGGRIWTFHGETPRATTDSSNTANLNGISITIHSEF
 YIIPRSQE SKCNEYINGLPPIQNRNVVPLSLSSRSIQYKRAQVNEIDITISK TSLWK
 EMQ"

ORIGIN

```

1 tatgctccag tgaattgggg tcatggagaa ataaatgatt caaccacagt ggaaccaatt
61 ttgatggtc cttatcaacc tactacattt acaccaccta ctgattactg gatacttatt
121 aactcaata caaatggagt agtatacag agtacgaata atggtgactt ttggactgca
181 gtcaatgag ttgaaaccga cgtcaatcca gtagatagac aatataatgt atttggtgaa
241 aataacaat ttaatgtaag aatgatcca gataaatgga agtttttaga aatgtttaga
301 ggcagtagtc aaactgactt ttataataga cgtacactaa ctctgtatc taaactcgtg
361 ggaatattaa aatatggagg aagaatatgg acatttcag gtgaaacacc gagggctact
421 actgatagtt caaacactgc aaattgaac ggtatatcaa ttacaattca ttcagaattt
481 tatattattc caaggtccca agagtctaag tgtaatgaat atattaacaa tgggtcacc
541 ccaattcaaa atactagaaa tgtagtacca ttatcgtat catctagatc tatacagtat
601 aagagagcac aag ttaatga agacattaca atttcaaga cttcattatg gaaagaaatg
661 caata

```

//

Nucleotide

GenBank

Human rotavirus A strain SONMX-124/G12P[8] structural protein VP4 (VP4) gene, partial cds

GenBank: KP119463.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS KP119463 665 bp RNA linear VRL 14-MAR-2015
 DEFINITION Human rotavirus A strain SONMX-124/G12P[8] structural protein VP4 (VP4) gene, partial cds.

ACCESSION KP119463
 VERSION KP119463.1 GI:766752742

KEYWORDS .
 SOURCE Human rotavirus A
 ORGANISM [Human rotavirus A](#)

Viruses; dsRNA viruses; Reoviridae; Sedoreovirinae; Rotavirus; Rotavirus A.

REFERENCE 1 (bases 1 to 665)
 AUTHORS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M., Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.

TITLE Detection of emerging rotavirus strains G12P[8] in Mexico
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 665)
 AUTHORS Gonzalez-Ochoa,G., Quintero-Ochoa,G.J., Calleja-Garcia,P.M., Rosas-Rodriguez,J.A., Tamez-Guerra,P. and Virgen-Ortiz,A.

TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-NOV-2014) Departamento de Ciencias Quimico Biologicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Blvd. Lazaro Cardenas, Navojoa, Sonora 85890, Mexico

COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..665
 /organism="Human rotavirus A"
 /mol_type="genomic RNA"
 /strain="SONMX-124/G12P[8]"
 /isolation_source="stool sample"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:109941"
 /country="Mexico"
 /collection_date="2013"
 /note="genotype: P[8]"
[gene](#) <1..>665
 /gene="VP4"
[CDS](#) <1..>665
 /gene="VP4"
 /codon_start=1
 /product="structural protein VP4"
 /protein_id="AJS19090.1"
 /db_xref="GI:766752743"
 /translation="YAP VNWGHGEINDSTTVEPILDGPYQP TTF TPPTD YWILINSNT
 NGVVESTNNGOFWTA VIA VEPHVNVPDRQYNVFGENK QFNVRNOSDKWKFLE MFRGS
 SQTFDFYNRRLTLS OTKLVGILKYGGRIWTFHGE TPRAT TSSNTANLNGISITIHSEF
 YIIPRSQE SKCNEYINNGLPPIQN TRNVVPLSLSSRSIQYKRAQ VNEOITISKTLWK
 EMQ"

ORIGIN
 1 tatgctccag tgaattgggg tcatggagaa ataatgatt caaccacagt ggaaccaatt
 61 ttagatggtc ctatcaacc tactacattt acaccaccta ctgattactg gatacttatt
 121 aactcaata caaatggagt agtatacag agtacgaata atggtgactt ttggactgca
 181 gtcatcgag ttgaaccgca cgtcaatcca gtagatagac aatataatgt atttggtgaa
 241 aataaacaat ttaatgtaag aaatgattca gataaatgga agtttttaga aatgtttaga
 301 ggcagtagtc aaactgactt ttataataga cgtacactaa ctctgatac taaactcgtg
 361 ggaatattaa aatattggtgg aagaatattg acatttcag gtgaacacc gagggctact
 421 actgatagtt caaacactgc aaatttgaac ggtatatcaa ttacaattca ttcagaattt
 481 tataattatc caagggtcca agagtctaag tgtaaatgat atattaaca tggctacca
 541 ccaattcaaa atactagaaa tgtagtacca ttatcgttat catctagatc tatacagtat
 601 aagagagcac aagttaatga agacattaca atttcaaga cttcattatg gaaagaaatg
 661 caata

//



El saber de mis hijos
hara mi grandeza

ANÁLISIS DE SECUENCIA DEL GEN QUE CODIFICA PARA VP7 DE ROTAVIRUS GENOTIPO G12 AISLADOS EN SONORA, MÉXICO.

Calleja-García PM, Quintero-Ochoa G de J, Tamez-Guerra P, Rosas-Rodríguez JA, Soñance-Organis JG, González-Ochoa G

lapcra@uvs.edu.ve@gmail.com

División de Ciencias e Ingenierías, Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur, Navojos, Blvd. Lázaro Cárdenas 100, Colonia, Francisco Villa, Navojos, Sonora, México. CP. 85890

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León,

Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, CP. 66451



INTRODUCCIÓN

Rotavirus es uno de los principales agentes virales causantes de gastroenteritis en niños menores de cinco años a nivel mundial (Tate *et al*, 2012). Entre los genotipos de rotavirus que se reportan comúnmente a nivel mundial están G1,G2,G3,G4 y G9. Algunos de los genotipos reportados esporádicamente son G5, G8, G12 (Rahman *et al*, 2007; Santos & Hoshino, 2005).

OBJETIVO

Analizar la secuencia del gen de VP7 de rotavirus G12 de muestras aisladas en el sur de Sonora.

MATERIAL Y MÉTODO



RESULTADOS

De un total de 100 muestras analizadas 14 (14%) fueron positivas para rotavirus. De éstas 6 (43%) fueron genotipo G12. El análisis de secuencia del gen de VP7 de rotavirus genotipo G12 reveló una homología de 98-99% con otras cepas de rotavirus G12 reportadas previamente en Kenya, India y Sri Lanka. Así mismo, el análisis filogenético mostró una asociación de las Cepas G12 reportadas en este estudio con cepas G12 de linaje III.

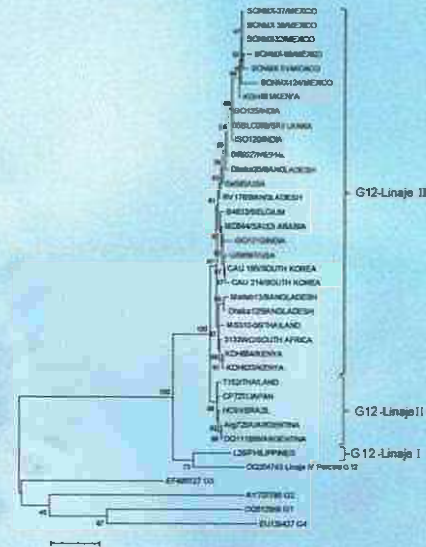


Fig. 1 Análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos del gen de VP7 de muestras reportadas en este estudio y de cepas de rotavirus G12 de referencia (Maximum Likelihood method, bootstrap de 1,000 repeticiones).

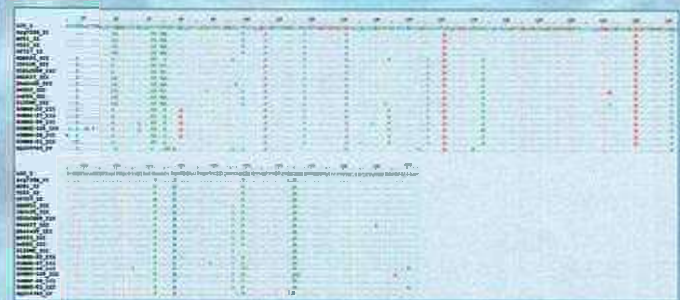


Fig. 2 Alineamiento de secuencia deducida de aminoácidos de VP7 genotipo G12 .

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se realizó el primer reporte de rotavirus G12 en México. Debido a la detección de cepas de rotavirus emergentes, es importante continuar con estudios de monitoreo de genotipos de rotavirus.

BIBLIOGRAFÍA

Tate JE, Burton Ah, Boschi-pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. 2008 estimate of world wide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The lancet infectious diseases*. 2012;12:136-41

Santos N, Hoshino y. Global distribution of rotavirus serotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine reviews in medical virology. 2005; 15:29-56.

Rahman M, Matthinssens J, Yang X, Deibeke T, Arijs, Taniguchi K et, al; evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotavirus, *journal of virology*. 2007; 81 :2382-90.



El saber de mis hijos
hara mi grandeza

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

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

División de Ciencias e Ingenierías, Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Campus Navojoa, Blvd. Lázaro Cárdenas 100, Colonia, Francisco Vñña, 85890 Navojoa, Sonora, México. Tel 01(642) 4259969.

* Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, CP 66451.



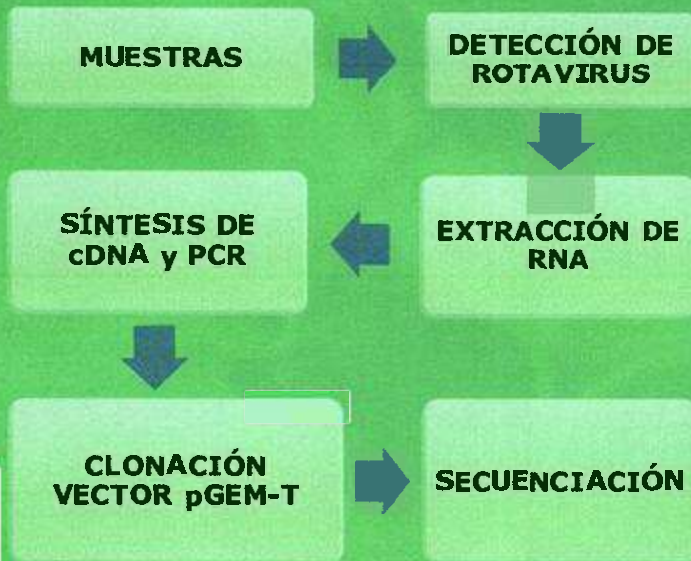
INTRODUCCIÓN

Rotavirus es uno de los agentes causales de gastroenteritis en niños (Tate *et al*, 2012). Parte de la clasificación de rotavirus se base al gen que codifica para VP4, hasta el momento se han descrito 35 genotipos de los cuales el genotipo P[8] es uno de los predominantes a nivel mundial (Argüelles *et al*, 2000, Alam *et al*, 2013).

OBJETIVO

Analizar la variabilidad del genotipo P[8] de rotavirus circulantes en el sur de Sonora, después de la introducción de la vacuna en México

METODOLOGÍA



RESULTADOS

De 14 muestras positivas para rotavirus 6 (43%) fueron genotipo P[8].

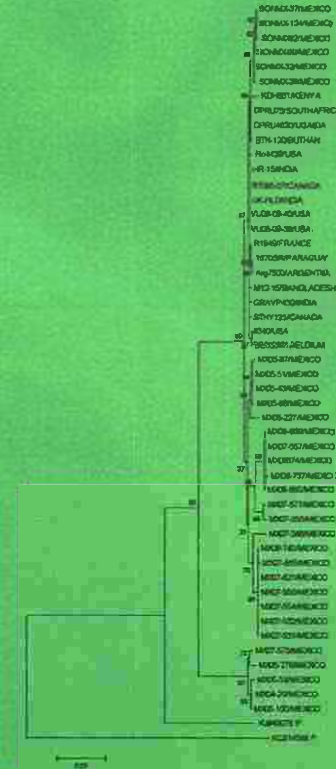


Fig 1. Análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos del gen VP4 genotipo P[8].

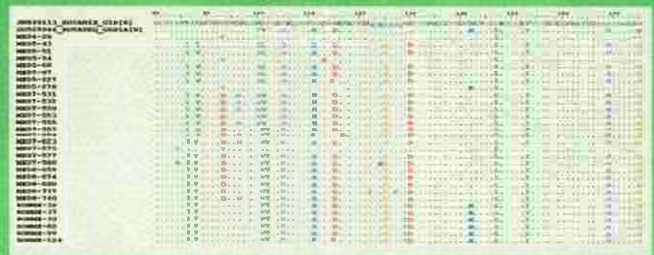


Fig 2. Análisis de la secuencia deducida de aminoácidos de VP4 genotipo P[8].

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La variabilidad intragenotípica del gen de VP4 de rotavirus fundamenta la necesidad de más estudios de monitoreo de distribución de genotipos de rotavirus en México.

BIBLIOGRAFÍA

- Argüelles MH, Villegas GA, Castello A, Abrami A, Ghiringhelli PD, Semorin L, Glikmann G 2000, VP7 and VP4 genotyping of human group A rotavirus in Buenos Aires Argentina. *J Clin Microbiol* 38: 252-259.
- Muhammad Masroor Alam, Adnan Khurshid, Shahzad Staukat, Raza Muhammad Suleman, Salmaan Sharif, Mehar Argez, Salmaan Akbar Malik, Tahir Masood Ahmed, Uzma Bashir Amir, Muhammad Naeem, Syed Sohail Zahoor Zaidi, *Epidemiology and genetic diversity of rotavirus strains in children with acute gastroenteritis in Lahore, Pakistan*, 2013, e67998.