



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

**“ANÁLISIS MOLECULAR DE CEPAS DE ROTAVIRUS
EN NIÑOS CON GASTROENTERITIS EN EL HOSPITAL
GENERAL NAVOJOA Y EL HOSPITAL INFANTIL DE OBREGÓN”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

PRESENTAN

**MARÍA ELENA DORALI ESPINOZA GONZÁLEZ
GUADALUPE DE JESÚS QUINTERO OCHOA**

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 María Elena Doralí Espinoza González y Guadalupe De Jesús Quintero Ochoa, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.



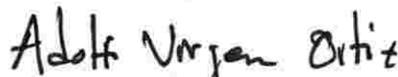
Dra. Guadalupe González Ochoa
Presidente



QB. Rosa Amelia Vázquez Curiel
Secretario



QB. Micaela Verdugo Pacheco
Vocal



Dr. Adolfo Virgen Ortiz
Suplente

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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



M.C. Ramona Icedo García

JEFA DE DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

AGRADECIMIENTOS

A Dios por mostrarme que día a día, con perseverancia, humildad, Paciencia y sabiduría todo es posible.

Con cariño y aprecio a mi Directora de Tesis DR. Guadalupe González Ochoa, quién con sus conocimientos y apoyo supo guiar el desarrollo de la presente tesis desde el inicio hasta su culminación.

A Cada uno de mis maestros de la Universidad de Sonora, de los campus Hermosillo y Navojoa, por sus enseñanzas brindadas, de todos me llevo algo especial, y sé que de todo lo aprendido jamás olvidare.

A mis Sinodales Dr. Adolfo Virgen Ortiz, Q.B. Rosa Amelia Vázquez Curiel y Q.B. Micaela Verdugo Pacheco, quienes me asesoraron y aportaron valiosos comentarios durante la realización del proyecto.

A los Hospital General de Navojoa y Hospital General de Cd. Obregón por prestarnos sus instalaciones y aceptando nuestro proyecto de investigación en especial a los químicos encargados de los laboratorios de los hospitales, Q.B José Guadalupe Arce Ibarra y Q.B. *Omar Javier Navarro Miranda* que consintieron y apoyaron la realización de este trabajo.

A mi compañera Guadalupe de Jesús Quintero Ochoa, por apoyar y formar parte de este proyecto de Investigación.

A mi Familia que hizo el esfuerzo de apoyarme, motivarme y darme la mano para la culminación de mi carrera universitaria.

Con cariño a mis amigas Marlene y Lucy, que la distancia y el tiempo no es motivo de separación, ahora me toca a mí plasmar en esta tesis mi agradecimiento, de igual forma como ellas lo hicieron en su momento en su tesis.

¡Gracias a todas aquellas personas que de una manera u otra forma nos ayudaron en la realización de esta tesis ¡

María Elena Dorali Espinoza González

DEDICATORIA

A MI FAMILIA.

A MI MADRE Sra. DORA LETICIA GONZÁLEZ, Que es un ser maravilloso en mi mundo Gracias por brindarme tu amor, por guiar mi camino animándome a continuar hasta culminar una meta más en mi vida brindándome tu apoyo Incondicional.

A MIS HERMANOS RUBY E ISSAC ESPINOZA, Por su apoyo en todo momento, gracias por su paciencia y cariño brindados, en especial hacia mi hija que durante mi carrera profesional han manifestado con sus cuidados y atenciones.

A mi compañero de Vida MOISES HERNANDEZ, Por tu paciencia, tu comprensión, tú que preferiste sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío, gracias, por tu compañía, eres el mejor amigo, eres el mejor padre, el mejor esposo, Te Amo.

Para mi pequeña hija Nohemi Yareli Hernández Espinoza, con el corazón lleno de tristeza tuve que robarte horas, días de convivencia y de juegos

para poder terminar mi carrera, a ti mi niña por ser mi motivación, mi
Alegria, mi inspiración día a día, tu que me has enseñado lo más valioso de
esta vida, te ama tu madre mi niña.

A ustedes les dedico mi trabajo, Gracias por su constante apoyo, por el
tiempo de familia que en algún momento hemos sacrificado, para la
culminación de mi carrera Universitaria.

María Elena Dorali Espinoza González

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo y antes que nadie, agradezco a papá Dios por el montón de bendiciones recibidas y por permitirme concluir una etapa profesional más en mi vida.

A mi alma mater, la Universidad de Sonora, por brindarme las herramientas necesarias, para lograr ser una profesionista.

Al Dr. Adolfo Virgen por proporcionarme un lugar en su laboratorio, para que el proyecto pudiera llevarse a cabo, por su disponibilidad y apoyo en todo momento.

A la maestra Rosa Amelia y maestra Micaela, miembros del jurado, por sus observaciones y consejos durante la realización del proyecto.

Al Hospital General de Navojoa, así como al Químico José Guadalupe Arce Ibarra, por las facilidades otorgadas, para el muestreo durante todo el periodo.

A mi asesora de tesis, que se convirtió en mi madre adoptiva de verano y de por vida, lo siento madre ya no podrá deshacerse de mí, gracias Dra. Guadalupe González Ochoa por todo tu apoyo, por la PACIENCIA, por compartir tus conocimientos y demostrarme lo interesante que es la

investigación, pero sobre todo por ser mi amiga y alentarme a seguir adelante.

A mis amigos Servando y Víctor Manuel por aguantarme durante todos estos años (tarea nada fácil), por los desvelos, por las dudas resueltas, por el apoyo moral, por esas largas conversaciones, risas y carcajadas compartidas, por los berrinches que tuvieron que soportar y por el montón de playlist escuchados, mil gracias por estar cuando los necesito, los quiero chicos.

A mis amigas Alma, Shayo Torrecillas y Polet, gracias por tantos años de amistad, que a pesar de no vernos seguido, la comunicación continua. Gracias por su apoyo, por siempre levantarme el ánimo cuando lo necesito y hacerme sentir mejor, por aguantarme todo este tiempo y escucharme aun cuando no tengo nada bueno que decir. Son unas muy buenas amigas y las quiero muchísimo.

A mi compañera de tesis María Elena Doralí Espinoza González.

Agradezco a todas y cada una de las personas que se han cruzado en mi vida, porque cada una de ellas me aportó una nueva experiencia, un nuevo conocimiento, una nueva perspectiva y me enriquecieron como persona.

Lupita Q.O

DEDICATORIAS.

A mis padres, al Sr. José Trinidad Quintero Partida por ser mi mejor amigo, por apoyarme siempre a cumplir mis sueños y realizar mis ocurrencias, por siempre estar al pie del cañón y alentarme a seguir adelante, por ser el mejor papá que Dios me pudo haber dado. A la Sra. Ana Alicia Ochoa Félix, que te puedo decir madre mía que no sepas ya, gracias por ser tan terca y darme esos empujonzotes, sin ti no lo hubiera logrado. Los AMO muchísimo a los dos, han sido un gran ejemplo para mí, todo lo que soy y llegare a ser, es gracias a ustedes, a su apoyo, mil gracias por todos los sacrificios que han hecho para que yo lograra llegar hasta aquí. Me tarde pero... LO LOGRAMOS..!

A mi hermana Natalia Carolina, te quiero mucho, sabes que a pesar de todo cuentas conmigo incondicionalmente, gracias por ser mi compañera de viaje, apoyarme, escucharme y aguantarme durante todo este tiempo.

A mis hermanitos Gabriela y Manuel, por esas tardes de juego, por el montón de ocurrencias y risas compartidas, por esos pequeños grandes abrazos que mejoran cualquier día. Gracias por enseñarme a ser paciente. Los quiero mucho mis pequeños engendros.

A mi prima Erika, por ser más bien como mi hermana, sabes que te quiero mucho y siempre cuentas conmigo.

A mi tía Lupe, que también ha sido una mamá para mí, gracias por sus consejos, por sus abrazos, por enseñarme que siempre es para adelante, que para atrás ni para agarrar vuelo.

A mi *bachert* (él sabe quién es), que llegó a mi vida con tanta fuerza, se metió sin permiso y se ganó un lugar muy especial en mi corazón; siempre dándome lo mejor de sí mismo, sin pedir nada a cambio; gracias por tu apoyo incondicional y motivaciones, por todos y cada uno de los momentos vividos a tu lado. Sabes que a pesar de todo, siempre habrá algo que nos una, porque entre tú y yo existe una gran conexión. Corazón con corazón siempre.

Lupita Q.O.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE GRÁFICOS.....	xvi
OBJETIVOS.....	xvii
RESUMEN.....	xviii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES.....	3
2.1 Cuadro Clínico de la Gastroenteritis.....	5
2.1.1 Fisiopatología y Clasificación de la diarrea.....	5
2.2 Patógenos Asociados a Enfermedades Diarreicas.....	8
3. GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS.....	9
3.1 Estructura de la partícula viral.....	11
3.2 Ciclo replicativo de rotavirus.....	11
3.3 Clasificación de rotavirus.....	14
3.3.1 Genotipos de rotavirus comúnmente reportados a nivel mundial	15
3.4 Fisiopatología de la gastroenteritis por rotavirus.....	17
3.5 Vacunas contra rotavirus: Historia y presente.....	18
3.5.1 Rotarix: vacuna Monovalente.....	22
3.5.2 Rotateq: vacuna pentavalente recombinante bovino-humana...	23
3.6 Rotavirus: variaciones genéticas y rearreglos.....	23

4.0 MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
4.1 Muestreo y severidad de la gastroenteritis.....	26
4.2 Detección de rotavirus.....	27
4.3 Extracción de RNA	28
4.3.1 Método fenol-cloroformo.....	28
4.3.2 Método Trizol.....	28
4.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	30
4.5 Síntesis de Cdna.....	31
4.6 Amplificación de los genes que codifican para VP4 y VP7.....	31
4.7 Genotipificación de VP4 y VP7.....	32
5.0 RESULTADOS.....	36
5.1 Área de muestreo	36
5.2 Análisis de la Severidad de la Gastroenteritis.....	36
5.3 Detección de rotavirus.....	37
5.4 Detección del genoma de rotavirus por electroforesis.....	42
5.5 Amplificación y genotipificación de VP7.....	43
5.6 Amplificación y genotipificación de VP4.....	46
6.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	48
7.0 LITERATURA CITADA.....	51
ANEXO 1.....	58
ANEXO 2.....	59

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág
1.- Patógenos causantes de gastroenteritis agudas.....	10
2.- Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la amplificación del gen de VP7 y su genotipificación.....	34
3.- Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la amplificación del gen de VP4 y su genotipificación.....	35
4.- Municipios que pertenecen a la Secretaría de Salud Pública, Jurisdicciones IV y V en el sur de Sonora.....	38
5.- Número de muestras obtenidas en el Hospital del Niño y la Mujer y en el Hospital General de Navojoa.....	39
6.- Incidencia por edad y síntomas de los menores con gastroenteritis incluidos en el estudio.....	40
7.- Análisis de severidad de la gastroenteritis en menores de 5 años, positivos y negativos para rotavirus.....	42
8.- Amplificación y genotipificación del gen que codifica para VP7 de rotavirus.....	45
9.- Amplificación y genotipificación del gen que codifica para VP4 de rotavirus.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1.-Esquema de rotavirus ma duro.....	13
2.- Ciclo replicativo de rotavirus.....	16
3.- División jurisdiccional de la secretaria de salud pública en el estado de Sonora.....	38
4.- Pruebas rápidas de detección de rotavirus.....	41
5.- Corrimiento electroforético característico del rotavirus del grupo A	44
6.- Amplificación y genotipificación de VP7.....	45
7.- Amplificación y genotipificación de VP4.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico	Pág.
1.- Distribución a nivel mundial de genotipos humanos de rotavirus	20

OBJETIVO GENERAL

Identificar los genotipos de las cepas de rotavirus que infectan a niños con gastroenteritis atendidos en el Hospital General Navojoa y Hospital del Niño y la Mujer de Obregón.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la incidencia de rotavirus en niños menores de cinco años hospitalizados por gastroenteritis.
2. Evaluar la severidad de la gastroenteritis por rotavirus.
3. Identificar los genotipos de las cepas de rotavirus circulantes en el hospital general Navojoa y Hospital General Obregón.

RESUMEN

Rotavirus es uno de los agentes infecciosos asociados a gastroenteritis en niños menores de cinco años. La incidencia por rotavirus se da por igual en países desarrollados y en vías de desarrollo, sin embargo, los índices de mortandad se incrementan en éstos últimos. Rotavirus se asocia a casi medio millón de muertes de niños cada año a nivel mundial. La gastroenteritis por rotavirus se asocia a diarrea aguda, y en algunos casos vómito y fiebre. La diarrea profusa suele traer como consecuencia una pérdida rápida de líquidos y por consiguiente un deshidratación que de no ser atendida oportunamente puede causar la muerte del menor infectado. Las vacunas contra rotavirus han mostrado ser eficientes y seguras. Y aunque no evitan el proceso infeccioso, si se les ha relacionado con la modulación de la severidad de la gastroenteritis. En el presente estudio se realizó un análisis de la incidencia de rotavirus y la severidad de la gastroenteritis, con la finalidad de determinar la incidencia de rotavirus en la región de estudio y la severidad de cada uno de los casos. Para tal efecto, se recolectaron muestras de heces fecales de niños menores de cinco años atendidos en el Hospital General de Navojoa y el Hospital Infantil de Cd. Obregón. Rotavirus se detectó en 14 de las 100 muestras analizadas, mismas que se asociaron a 98 casos de gastroenteritis por la detección de dos menores con casos de reinfección en un lapso de dos meses. De acuerdo al análisis en base a la escala de Ruuska y Vesikari, la severidad de la gastroenteritis por rotavirus se relacionó solamente con casos leves a moderados. Por otro lado, a las muestras positivas para rotavirus se les realizó una extracción de ARN y posteriormente se sometieron a una RT-PCR (retrotranscripción) y una PCR para identificar el genotipo de VP4 y VP7. Los resultados mostraron la presencia de 3(21%) genotipos G1P[8], 2(14%) G2P[8], 1 (7%) G3 sin caracterizar genotipo P, también se observó la presencia de dos (14%) coinfecciones entre G1/G2P[8] y G2/G4P[8], el resto de las muestras no fue genotipificado. El presente trabajo es el primero en determinar la incidencia de rotavirus en el área de estudio, así mismo, marca la pauta entre la era antes y después de la vacuna de rotavirus. En este aspecto se puede observar una marcada disminución de incidencia y severidad de los casos de gastroenteritis por

rotavirus después de la introducción de la vacuna. Es importante continuar con este tipo de análisis para monitorear la incidencia de rotavirus y la evaluar continuamente la eficiencias de las vacunas contra rotavirus actualmente disponibles.

1. INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis aguda (GEA) se mantiene en primer lugar a nivel mundial como una de las enfermedades que predominan durante la infancia, principalmente en los países que se encuentran en vías de desarrollo (Pérez *et al*, 2011). Anualmente los menores de 5 años, presentan aproximadamente tres episodios de diarrea aguda, siendo los menores de 1 año los más susceptibles a la incidencia como a la mortalidad por la patología diarreica (Farthing and Salam, 2012).

La gastroenteritis puede estar causada por bacterias, parásitos y virus enteropatógenos, entre los más destacados de estos últimos se encuentran, rotavirus, adenovirus, astrovirus y calicivirus, los cuales se relacionan aproximadamente con el 80% de los cuadros gastrointestinales (Domínguez *et al*, 2009; Hernández, 2011).

Rotavirus es un agente infeccioso responsable de gastroenteritis en niños menores de cinco años. La diarrea por rotavirus es más severa que la causada por otros agentes infecciosos (Ruuska and Vesikari, 1991). Su incidencia se da por igual a nivel mundial, tanto en países desarrollados

como en vías de desarrollo, aunque el 80% de las muertes se da en países subdesarrollados. A nivel mundial rotavirus causa alrededor de 600,000 muertes de niños al año (Desselberg et al, 2009).

La gastroenteritis ocasionada por rotavirus es más frecuente durante la temporada invernal. Dentro de las manifestaciones clínicas más frecuentes de la gastroenteritis, se encuentran diarrea, vómito, fiebre, dolor abdominal y en algunos casos deshidratación, que pone en riesgo la vida del menor (Hernández, 2011; Ramig, 2004).

En México en el año 2006 se adicionó al programa nacional de vacunación la vacuna Rotarix® (GSK) y posteriormente la vacuna Rotateq (Merck). Ambas vacunas han mostrado ser seguras y eficientes en disminución de la severidad de la gastroenteritis (WHO, 2007). Sin embargo, las características propias de rotavirus cuyas variantes genotípicas y antigénicas pueden cambiar de una temporada a otra, han dado la pauta para continuar con el análisis molecular de cepas de rotavirus circulantes. A su vez, este tipo de análisis puede ser importante para evaluar la eficacia de las vacunas actualmente disponibles. Por tal motivo, en este estudio se analizó la severidad de la gastroenteritis por rotavirus y los diferentes genotipos circulantes en la región sur del estado de Sonora, México.

2.0 ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES

La gastroenteritis se define como una inflamación intestinal, puede ser ocasionada por agentes infecciosos o sus toxinas (Riechmann *et al*, 2010). Actualmente la European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) y European Society of Paediatric Infectious Diseases (ESPID), describen la gastroenteritis aguda como una disminución en la consistencia de las heces (blandas o líquidas) aunado a un aumento en el número de deposiciones (más de 3 en 24 horas), con o sin fiebre y/o vómito, con una duración menor a 7 días y nunca mayor de 14 días (iPagés *et al*, 2010).

Las enfermedades gastrointestinales son un problema mundial, primordialmente en países en vías de desarrollo, en donde los índices de mortalidad son elevados. En Asia, África y Latinoamérica, se estima que aproximadamente el 50% de niños menores de 5 años fallece a causa de la gastroenteritis aguda. En la mayoría de los casos los factores socioeconómicos y nutricionales influyen mucho en la mortandad infantil por gastroenteritis (Martínez, 2008). De acuerdo a la OMS las muertes

ocasionadas por enfermedades diarreicas, en realidad son a causa de la deshidratación provocada por la pérdida de líquidos en evacuaciones frecuentes (WHO, 2013).

De acuerdo a datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la UNICEF, cada año a nivel mundial, ocurren dos mil millones de casos por enfermedades diarreicas. Esto a su vez se asocia a la muerte en 1.9 millones de niños menores de 5 años, principalmente en países en vías de desarrollo (Farhing and Salam, 2012). En el 2004 las enfermedades diarreicas representaron la tercera causa de muerte en países de bajos ingresos, ocasionando el 6.9% de los fallecimientos. De los 1.5 millones de niños que perecieron por enfermedades diarreicas en 2004, el 80% era menor de 2 años (WHO, 2013).

En México, la salud pública se ve afectada por las enfermedades gastrointestinales, las cuales representan una de las principales causas de consulta médica, el Instituto Mexicano del Seguro Social, brindó 2 millones 188 consultas por enfermedades gastrointestinales, solo en 2008, y en 2003, un estudio gubernamental reportó 4,556 decesos causados por infecciones intestinales. Aunque las enfermedades gastrointestinales afectan a toda la población en general, los grupos más vulnerables son los menores de 5 años y ancianos (Hernández, 2011). En la actualidad se ha logrado disminuir los índices de mortalidad en los países en vías de desarrollo, esto se debe a la distribución y uso de soluciones de

rehidratación oral, aumento en las tasas de lactancia materna, y a una mayor cobertura del programa de vacunación (Farthing and Salam, 2012).

2.1 Cuadro Clínico de la Gastroenteritis

La gastroenteritis se asocia a una amplia variedad de síntomas que pueden ser consecuencia de una infección por virus, bacterias o parásitos (Steiner and Guerrant, 2010). Con excepción de la gastroenteritis causada por *Helicobacter pylori*, el término gastroenteritis se asocia a diarrea, vómito y en algunos casos fiebre relacionadas con infecciones no inflamatorias en la parte superior del intestino delgado o inflamatorias en el colon (Morris *et al*, 1994; Hostettler, 2004; Steiner and Guerrant, 2010).

2.1.1 Fisiopatología y clasificación de la diarrea

El tracto gastrointestinal cuenta con una amplia capacidad de absorción de fluidos y electrolitos, diariamente se expone a alrededor de 8-9 litros de fluidos y de éstos solo 100-200 ml se excretan en heces (Hodges and Gill, 2010). Este proceso se asocia al transporte de sodio y potasio y otros procesos celulares (Field, 2003). Algunos de los procesos de transporte celular asociados con el flujo de agua son CFTR (por sus siglas en inglés: Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), el canal activado de

cloro y calcio (CLCA), intercambio de Na^+/H^+ - isoforma NH_3 y el transportador dependiente de sodio y glucosa (SGLT1) (Field, 2003).

Esas elaboradas vías de transporte son reguladas por varios neurotransmisores, hormonas, mediadores de inflamación y algunos contenidos intraluminales (Field, 2003). Algunos patógenos entéricos pueden alterar el balance de fluidos y como consecuencia se induce un proceso de pérdida de líquidos y diarrea (Field, 2003).

La OMS se refiere a la diarrea como el aumento en las deposiciones en la frecuencia normal (más de 3 en 24 horas) de heces sueltas o líquidas (WHO, 2013). Los episodios de diarrea pueden clasificarse, en base a su duración, en tres categorías: Diarrea aguda, que se asocia a 3 o más deposiciones acuosas, disminuidas de consistencia, en las 24 horas previas; diarrea persistente, la cual se relaciona con episodios de diarrea de inicio agudo y que dura más de 14 días; y diarrea crónica, donde los episodios de diarrea que se presentan por un tiempo de 14 días a cuatro semanas (Frank-Briggs, 2012; Lee *et al*, 2012).

La diarrea también se puede clasificar como no inflamatoria, inflamatoria o invasiva. La diarrea inflamatoria es causada por microorganismos productores de enterotoxinas o por virus que infectan sin causar inflamación o destrucción de la mucosa intestinal. La diarrea inflamatoria es causada por microorganismos productores de toxinas, por bacterias no

invasivas o invasivas que inducen una reacción inflamatoria (Berkes *et al*, 2003; Navaneethan and Giannella, 2008).

La fisiopatología de las enfermedades diarreicas puede estar relacionada con diferentes procesos como, la osmosis, secreción activa, secreción y motilidad alterada. La diarrea osmótica se debe a un exceso de solutos no absorbibles y osmóticamente activos en el lumen (Putignani and Menichella 2010). La diarrea secretora es causada por una sobrestimulación de la capacidad secretora del tracto intestinal; esto se caracteriza por un gran volumen de heces y podría ser inducida por enterotoxinas bacterianas, hormonas, ácidos biliares dihidroxilados, ácidos grasos hidroxilados y mediadores de la inflamación (Berkes *et al*, 2003). La diarrea exudativa se presenta cuando la función de barrera del epitelio intestinal se ve comprometida por la pérdida de células epiteliales o la interrupción de la unión estrecha, en este caso, la acumulación de agua, electrolitos, moco y algunas veces glóbulos rojos y blancos en el lumen intestinal es común (Berkes J *et al*, 2003). La diarrea asociada de la motilidad alterada se debe a un aumento o disminución de la motilidad en el intestino; motilidad baja puede resultar en sobrecrecimiento bacteriano, que puede producir la diarrea (Berkes J *et al*, 2003).

2.2 Patógenos Asociados a Enfermedades Diarreicas.

Actualmente se reconocen más de 20 microorganismos causantes de gastroenteritis aguda (GEA), dentro de los patógenos se encuentran virus, bacterias y parásitos (Tabla 1), que pueden estar presentes en agua y alimentos contaminados (Pérez *et al*, 2011).

En la etiología bacteriana los agentes predominantes causantes de GEA son: *E coli*, *Shigella*, *Salmonela*, *Yersinia*, *Vibrio cholerae*; dentro de los principales parásitos se encuentran *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*; describiendo su fisiopatología de forma muy general, estos patógenos pueden producir diarrea mediante tres mecanismos: secreción, disrupción de la mucosa intestinal e invasión tisular, lo que ocasiona una disminución en la absorción de electrolitos y pérdida de agua, así como la pérdida de las hidrolasas en la superficie de las vellosidades intestinales provocando una deshidratación (Riechmann *et al*, 2010).

La gastroenteritis de origen viral es la más común y se asocia al 70% de los casos. Los principales virus responsables de GEA son: Calicivirus, Astrovirus, Adenovirus y Rotavirus. Éste último causa alrededor del 80% de diarreas agudas en menores de 5 años. En México la gastroenteritis aguda, por agentes virales es la de mayor prevalencia, en comparación con bacterias y parásitos, donde se ha observado un decremento en las muertes infantiles (Esparza-Aguilar *et al*, 2009).

3. Gastroenteritis por rotavirus

Rotavirus es el agente causal de gastroenteritis, anualmente produce 500,000 muertes por año, el 90% de las defunciones de niños con GEA ocasionada por rotavirus, ocurre en Asia y África, y alrededor de 2 millones de infantes son hospitalizados cada año a nivel mundial. Rotavirus infecta a niños de entre 6 y 24 meses, sin embargo los niños mayores también pueden infectarse (Hyser and Estes, 2009).

La mayoría de los niños al cumplir 5 años ya han sido infectados por una o varias cepas de rotavirus y presentan signos serológicos de la infección. Los lactantes (0-3 meses) son asintomáticos a las infecciones por rotavirus, ya que durante los primeros meses de vida, la madre les confiere anticuerpos a través de la leche materna, a menos que el niño este inmunodeprimido o sus intestinos no estén del todo maduros, será susceptible a infectarse. Los adultos también pueden ser afectados por rotavirus, solo que en ellos la sintomatología no se manifiesta, siempre y cuando su sistema inmune no se encuentre inmunocomprometido (Tamayo and Moreno, 2007)

Tabla 1. Patógenos causantes de gastroenteritis agudas*.

Bacterias	Virus	Parásitos
<i>Escherichia coli</i> , productora de diarrea	Rotavirus	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	Norovirus(Calcivirus)	<i>Giardia intestinalis</i>
<i>Vibrio cholerae</i> O1*	Adenovirus (Serotipo 40/41)	<i>Microsporida*</i>
<i>Vibrio cholerae</i> O139	Astrovirus	<i>Entamoeba histolytica</i>
Especie <i>Shigella</i>	Citomegalovirus*	<i>Isospora belli*</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		<i>Cyclospora cayetanesis</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>		<i>Dientamoeba Fragili</i>
<i>Campylobacter coli</i>		<i>Blastocystis hominis</i>
<i>Campylobacter upsaliensis</i>		<i>Helmintos</i>
<i>Salmonellae</i> no tifoidea		<i>Strongyloides stercoralis</i>
<i>Clostridium difficile</i>		<i>Angiostrongylus costaricensis</i>
<i>Yersinia enterocolica</i>		<i>Schistoma marisoni</i> , <i>S. japonicum</i>
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		

* Farthing y Salam (2012) Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología.

La transmisión de rotavirus es la vía fecal-oral. Durante la infección se excretan grandes cantidades de partículas virales (10^{10} partículas por gr de heces), la dosis mínima infectiva es de 10 a 100 partículas infectivas, para evitar la propagación es importante lavarse las manos y aumentar las medidas higiénicas (de Pediatría, 2006).

3.1. Estructura de la partícula viral

El genoma de rotavirus es de 18,522 pares de bases, codifica para 6 proteínas estructurales denominadas VP1-VP7 (*viral protein*, por sus siglas en inglés) (Fig. 1) y 6 proteínas no estructurales NSP1-NSP3 (del inglés *non-structural protein*) (Estes and Cohen 1989). A excepción del gen 11 que tiene dos marcos de lectura y codifica para dos de las proteínas no estructurales NSP5 y NSP6, el resto del genoma codifica solo para un gen, presentando un corrimiento electroforético muy característico (López and Arias, 2001).

3.2 Ciclo replicativo de rotavirus

Rotavirus se internaliza en la célula de forma directa a través de la proteína VP4 o por un proceso de endocitosis. Al entrar a la célula pierde la capa externa, esto se debe a la baja concentración de calcio (Ruiz *et al*, 1996) (Fig. 2). Las proteínas VP4 y VP7 se desestabilizan, dando lugar a las partículas virales de doble capa, donde se activa el proceso de

transcripción del RNA mensajero, que dirigirá la síntesis de las seis proteínas estructurales y de las seis proteínas no estructurales (Estes, 2001; Cohen *et al*, 1979).

En el core, las proteínas VP1 y VP3 son las responsables de la transcripción, incorporación de nucleótidos, así como la formación del cap en el extremo 5' del RNAm, solo que a diferencia de los RNAm celulares, carecen de poli-A en el extremo 3' (Bustos, 2008).

Transcurridas de 3 a 4 horas, después de la infección, se forman viroplasmos en el citoplasma, que son estructuras electrodensas compuestas de grandes cantidades de RNA y proteínas virales, se ha propuesto que es ahí donde se lleva a cabo la replicación del genoma viral, así como la selección y empaquetamiento del genoma (López and Arias, 2001; Bustos, 2008). Los viroplasmos son formados por las proteínas NSP2 y NSP5, con la ausencia de cualquiera de ellas, las estructuras no tendrían lugar y se interrumpiría el ciclo replicativo (González *et al*, 1998; Fabbretti *et al*, 1999; Vende *et al*, 2002).

Para la síntesis de la hebra negativa de RNA, se utiliza como molde el RNAm, que conformara el RNAdc. Una secuencia consenso presente en el extremo 3' del RNAm actúa como la señal en cis requerida para la síntesis de la cadena negativa del RNA genómico (Patton *et al*, 1996). Las partículas subvirales formadas, migran hacia el retículo endoplásmico para

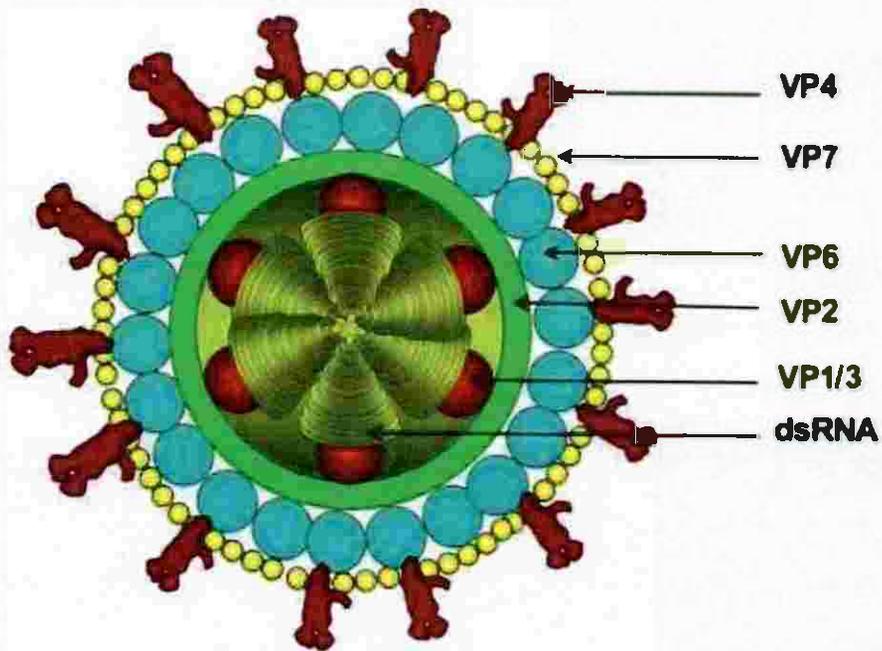


Fig. 1. Esquema de rotavirus maduro, con sus tres capas; las espículas rojas representan VP4, mientras que las perlas amarillas VP7 (capa externa/TLP), las bolas azules son la capa intermedia/DLP donde se encuentra VP6 y la capa verde representa el core donde se ubican las proteínas VP1, VP2, VP3 y el dsRNA compacto (Ruiz *et al*, 2009).

3.3.1 Genotipos de rotavirus comúnmente reportados a nivel mundial

Actualmente se conocen 23 genotipos G y 32 genotipos P en todo el mundo (Mukherjee and Chawla-Sarkar 2011; Alam *et al*, 2013). Las combinaciones de estos genotipos, causantes de gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años a nivel mundial son G1P[8], G2P[4], G3P[8], y G4P[8] representando el 90% del total de los aislamientos; siendo la primera combinación (G1P[8]) la de mayor prevalencia en todo el mundo (Gráfico 1) (Sánchez-Fauquier, *et al*, 2006). Aunque también pueden darse infecciones mixtas, las más frecuentes son G1/G8 y G1/G2, debido a la enorme diversidad que presentan los rotavirus humanos por su genoma segmentado, que genera la frecuencia de las cepas dominantes y combinaciones inusuales (Dennehy, 2008).

En México las cepas circulantes, que se aíslan con mayor frecuencia son G1, G3, G2, G4 y G9 (Esparza-Aguilar *et al*, 2009). Para poder definir la diversidad de las cepas circulantes de una región, es importante realizar una genotipificación de las proteínas externas de la cápside VP4 y VP7 (Romero *et al*, 2007). Rotavirus es específico, pero puede surgir una transmisión entre especies, provocando combinaciones inusuales con los genotipos G/P, ya sea por transmisión directa de animales a humanos, o recombinaciones de cepas entre ellos (O’Ryan, 2009; Kellner, 2005). Tal es el caso de las

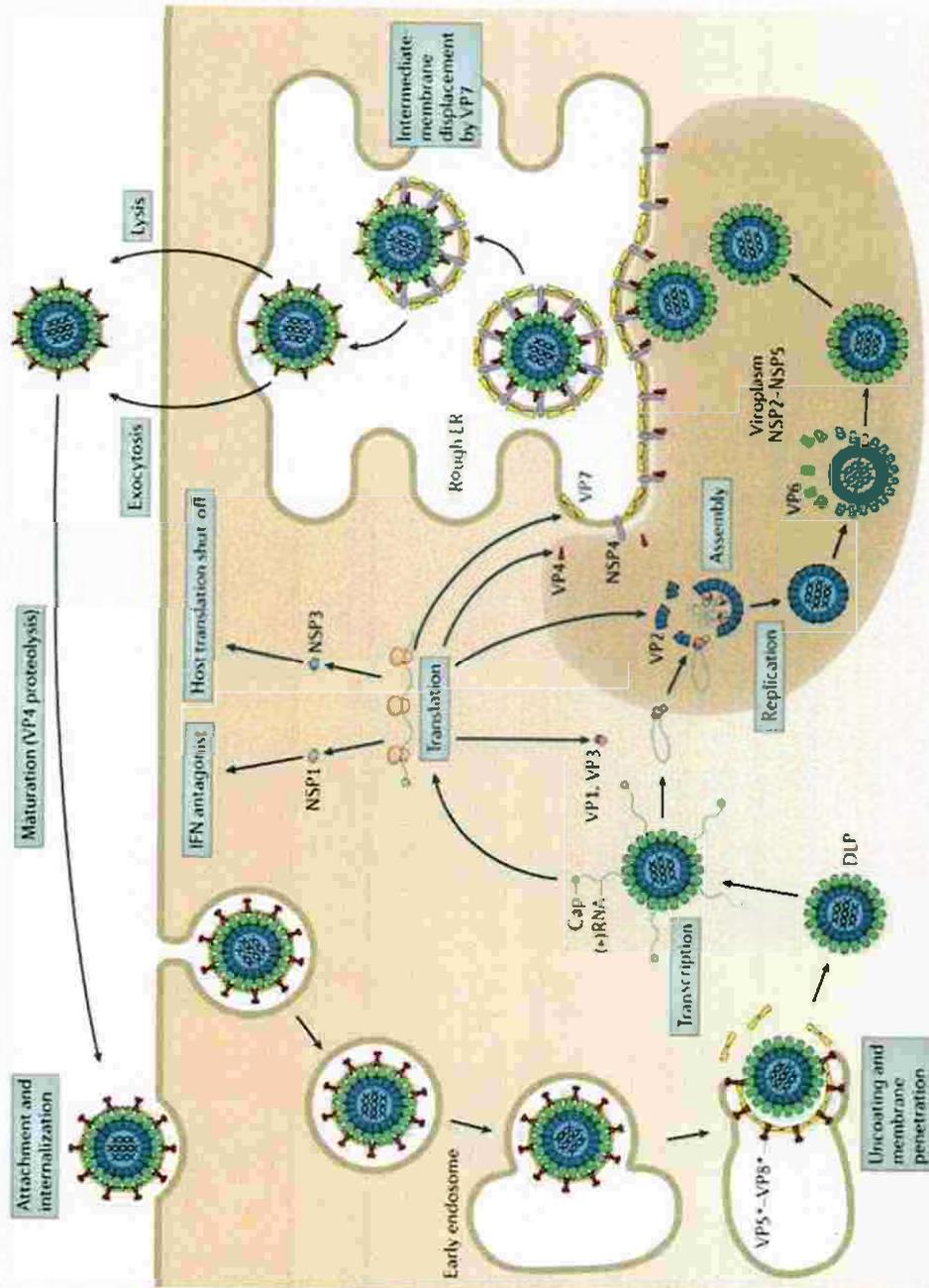


Fig.2 Ciclo Replicativo de Rotavirus (Trask et al, 2012)

combinaciones G5, G8, G12 y G9P[8] las cuales se consideran emergentes, y representan aproximadamente el 4% de los aislamientos (Chiappini *et al*, 2010; Dennehy, 2008).

3.4 Fisiopatología de la gastroenteritis por rotavirus

La gastroenteritis por rotavirus es muy común, en especial en la época invernal, que es cuando los casos aumentan. Cuando el niño ha sido infectado por rotavirus, transcurren de 24 a 48 horas, para que la sintomatología se presente de manera severa o no, ya que pudiera pasar desapercibida. La diarrea por rotavirus generalmente dura entre 4 y 7 días (Desselberger *et al*, 2009).

La infección por rotavirus tiene lugar en el intestino delgado, pudiéndose extender hasta el íleon. Rotavirus se adhiere a las microvellosidades del enterocito maduro, lo que sugiere que el virus presenta un tropismo restringido ya que únicamente infecta a estas células. La selectividad de rotavirus por los enterocitos, en parte depende, de la interacción del virus con sus receptores celulares. En algunos casos la diarrea puede deberse a la destrucción de las células infectadas en las puntas de las vellosidades intestinales; lo que a su vez ocasiona una alteración en la absorción, transporte de agua y electrolitos, generando un desequilibrio entre la absorción de carbohidratos (lactosa), así como de líquidos (Tamayo and Moreno, 2007).

La proteína no estructural NSP4 es la primera enterotoxina viral descrita, juega un papel muy importante dentro de la patogénesis de rotavirus, ya que ocasiona una alteración en el calcio intracelular del retículo endoplásmico hacia el citoplasma, generando un desbalance, que activa los canales de cloro, provocando un aumento en la secreción del ion cloro, incrementando la permeabilidad de la membrana para los electrolitos, dando lugar a la diarrea (González, 2012; Vizzi, 2009). Se ha asociado a NSP4 como inductora de diarrea, en ausencia de otras proteínas de rotavirus, además participa en el ensamblaje, maduración de los virus y penetración del mismo al retículo endoplásmico (Infante-Ramírez *et al*, 2007; Bustos *et al*, 2008; González, 2012).

3.5 Vacunas contra rotavirus: Historia y presente

La historia natural de la enfermedad muestra una alta incidencia de infecciones repetidas en los dos primeros años de vida, disminuyendo la gravedad del cuadro clínico con el número de infecciones, la gastroenteritis producida por rotavirus se le asocia a un mayor riesgo de deshidratación que la producida por otros microorganismos (Kapikian, 2011).

La primera vacuna bovina monovalente fue la RIT 4237, la cual introdujo 88 % de protección heterotípica contra diarrea severa por rotavirus, sin embargo, a pesar de los resultados alentadores en países desarrollados,

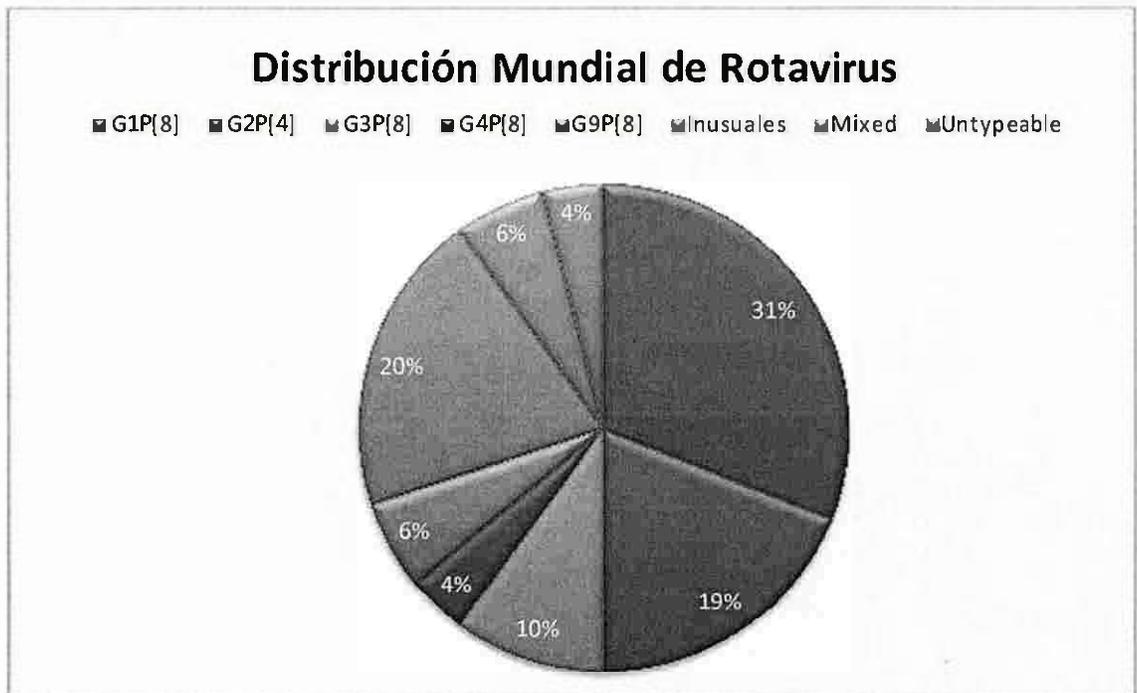
la vacuna fue detenida a principios de la década de 1980, cuando su eficacia protectora no pudo ser confirmada en estudios en fase realizados en países en vías de desarrollo (Vesikari, 2012, Parashar, 1998).

Las vacunas de cepas recombinantes animal-humana han sido elaboradas con el propósito de combinar la facilidad de cultivo del virus con especificaciones antigénicas de los serotipos de rotavirus predominantes. Después en 1998, la administración de Alimentos y Drogas de EUA aprobó la vacuna Rhesus- humana tetravalente, RotaShield, VRR-TV (fabricada por Wyeth Leder) esta vacuna incluía el serotipo G3 del virus rhesus, junto con G1 y G2 y G4 de origen humano (Ciarlet and Schödel, 2009; Desselberger, *et al* 2009).

Tres estudios los que evaluaron la eficacia protectora de RotaShield, el primero en periodo de dos años, tres dosis obtuvieron 57% y 82% de protección contra rotavirus. En el segundo realizado en EUA, la vacuna produjo un 49% de eficacia contra episodios diarreicos y un 80% de protección de casos severos por rotavirus y en todas las gastroenteritis de niños pequeños el 60%. RotaShield proporcionó tasas de protección de 88% contra diarrea severa, 755 contra deshidratación y también produjo 70% de reducción en las admisiones a hospitales (Parashar, 1998; Ciarlet and Schödel, 2009; Kapikian, 2011).

Gráfico 1

Distribución a nivel mundial de genotipos humanos de rotavirus, según el reporte de la red de vigilancia de la Organización Mundial de la Salud, 2010.



No obstante fue en Julio de 1999, a menos de un año de haber sido lanzada y de haberse aplicado 1.5 millones de dosis de vacunas RotaShield a aproximadamente 900.000 niños en EUA, la vacuna contra rotavirus RotaShield, fue suspendida por haber estado relacionada con casos raros de Invaginación Intestinal después de la primera dosis (Vesikari, 2012; Ciarlet and Schödel, 2009).

Después de haber sido analizadas en pruebas de fase 3 en alrededor de 70.000 niños, en el 2006, dos vacunas contra el rotavirus mostraron ser seguras y efectivas en los niños: Rotarix (GSK) y Rotateq (Merck) ambas con licencia en varios países (Bishop, 2009). Dichas Vacunas de administración vía oral segura y eficaz frente a la enfermedad, una monoValente humana atenuada y otra pentavalente bovina humana, las cuales la OMS recomienda la inclusión de esta vacuna en los programas de inmunización (WHO, 2011).

México fue uno de los primeros países en recibir la vacuna en el 2006; para la temporada de rotavirus del 2009, las tasas de mortalidad debidas a la enfermedad diarreica habían disminuido tanto en la población objetivo de la vacunación (niños menores de 11 meses, donde la tasa disminuyó en un 40%) y entre niños de uno y dos años de edad (casi en un 30%) (WHO, 2011).

3.5.1 Rotarix: Vacuna Monovalente

La cepa de rotavirus que dio origen a Rotarix (GSK) fue obtenida de un caso de gastroenteritis causado por rotavirus en un niño de Cincinnati, la compañía farmacéutica GlaxoSmithKline desarrolla la vacuna monovalente contra rotavirus de una cepa precursora atenuada G1P[8], comparte epítopes protectores, involucrados en neutralización de virus pertenecientes al grupo A (Vesikari, 2012; Desselberger, 2009). Ésta cepa fue pasada por cultivos de células Vero para su atenuación, obteniéndose la cepa vacunal RIX4414. Y posteriormente fue sometida a amplios estudios de seguridad. Hasta el día de hoy Rotarix (GSK) está autorizada en numerosos países de todo el mundo, conformada de 2 dosis vías orales, administrada a los 2-4 meses de edad (Vesikari, 2012).

La eficacia de la vacuna fue alta 87% frente a diarrea grave por rotavirus originada no sólo por cepas originales G1P8, sino también por cepas G3P [8], G4P [8] y G9 P[8]. La eficacia frente a las cepas G2P[4] fue del 45%, lo que indica que Rotarix (GSK) ejerce un efecto protector incluso en cepas que no muestran las mismas proteínas VP4 ni VP7, contiene el serotipo G1, virus que más circula en México. Por tal motivo, fue autorizada para su uso en México en Enero del 2005 e incorporada en la cartilla Nacional de vacunación en 2006 (Vesikari, 2012; Desselberger, *et al* 2009; Mejía, *et al* 2011).

3.3.2 RotaTeq: Vacuna pentavalente recombinante bovino- humana

RotaTeq (Merck) es una vacuna pentavalente de rotavirus reordenados de cepas de bovino-humano. Contiene cinco cepas, obtenidas por recombinación genética entre esta cepa y varias cepas de rotavirus humanos, que expresan la proteína de superficie VP7 de los rotavirus humanos de los tipos G1,G2,G3 y G4 y la proteína VP4 del rotavirus humano correspondiente al genotipo P[8] (Desselberger, *et al* 2009; Ciarlet and Schödel, 2009).

La eficacia y seguridad de Rotateq (Merck) se ha demostrado en diversos estudios llevados por países industrializados como varios países en desarrollo de America Latina por ello, en Febrero del 2006 la vacuna obtuvo licencia en Estados Unidos por la FDA (Food and drug Administration). Debido a su atento seguimiento de los lactantes vacunados que participaron en estudios de fase III de RotaTeq el cual no reveló ningún evento adverso grave asociado a la vacuna, incluida la invaginación intestinal (Vesikari, 2009; Desselberger, *et al* 2009; Ciarler and Schödel, 2009; Kapikian, 2011).

3.6 Rotavirus: variaciones genéticas y rearrreglos

Rotavirus varía de una temporada invernal a otra, esto se debe a su genoma segmentado, ya que se presenta una alta probabilidad de diversidad genética, generando nuevas combinaciones entre cepas, que

podrían transmitirse entre especies (Yi and Liu, 2011). Un factor importante que se presenta para que los reordenamientos genéticos existan, es la disfunción que tiene la RNA polimerasa (enzima responsable de la transcripción), la cual carece de actividad exonucleasa 3'-5' (encargada de la reparación en virus de DNA), lo que genera una mutación por cada copia obtenida del genoma (Schnepf *et al*, 2008; Infante-Ramírez *et al*, 2007). A pesar de que los niveles de replicación son altos, durante una infección aguda por rotavirus, no existen reportes de que se generen reordenamientos genéticos (Schnepf *et al*, 2008).

Las mutaciones y recombinaciones genéticas, son mecanismos importantes para que rotavirus evolucione de manera rápida, aumentando su distribución geográfica y diferencias temporales (Sánchez-Fauquier *et al*, 2006). Cuando en una célula existe una co-infección con dos cepas distintas de rotavirus, pero que a la vez son compatibles (mismo grupo o especie), existe una gran posibilidad de que se creen nuevos segmentos en el genoma del virus (segmentos reordenados) (Taniguchi and Komoto, 2012). Los genomas reordenados se han encontrado en niños inmunodeprimidos, infectados de manera crónica por rotavirus, así como también en animales (Estes and Cohen, 1989).

El reordenamiento genético de rotavirus, se presenta de manera más común en el gen 11 (codifica para las proteínas no estructurales, NSP5 Y NSP6), los genes del 5-10 son los menos afectados. Aún se desconoce si

los rotavirus que presentan el reordenamiento en el segmento 11 presentan alguna ventaja selectiva para su detección o la frecuencia con la que se produce el reordenamiento en este gen (Schnepf *et al*, 2008).

Generalmente los rotavirus que presentan reordenamientos, son virus "normales" capaces de reagruparse *in vitro*, además pueden reemplazar de manera funcional y estructural a sus contrapartes normales, lo que propone, que son virus genéticamente estables, capaces de propagarse en la población (Gault *et al*, 2001; O'Ryan *et al*, 2009). Esto indica que la recombinación es un mecanismo importante entre las cepas circulantes de rotavirus a nivel mundial (Gault *et al*, 2001; O'Ryan *et al*, 2009).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Muestreo y severidad de la gastroenteritis:

Durante el periodo de Agosto del 2012 a Agosto del 2013, se recolectaron 100 muestras de heces de niños con gastroenteritis. Los menores fueron atendidos en el área de pediatría, consulta externa y urgencias del Hospital General de Navojoa y del Hospital Infantil de Cd. Obregón. Los criterios de inclusión se basaron en: La edad y sintomatología del menor, para ésto se consideraron menores de 5 años con gastroenteritis (no bacteriana, ni parasitaria) o que presentaran alguno de los síntomas del cuadro clínico de gastroenteritis (fiebre, vómito, deshidratación).

Las muestras obtenidas de niños con gastroenteritis se transportaron al laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (JL302) de la Universidad de Sonora, campus Navojoa, donde se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Así mismo, al momento de recolectar cada una de las muestras se registraron datos generales del menor y datos sobre la sintomatología del menor como duración la diarrea (número de días), frecuencia de

evacuaciones por día, duración de episodios de vómitos (número de días), frecuencia de vómitos por día, temperatura máxima registrada, nivel de deshidratación y tratamiento recibido (ninguno, medicamento supervisado o ingreso hospitalario) (Anexo 1). En base a estos datos, se procedió a evaluar la severidad de la gastroenteritis (leve, moderada y severa), según la puntuación obtenida de acuerdo con la tabla de Ruuska y Vesikari (1991), siendo 20 puntos el valor máximo (Anexo 2).

4.2 Detección de rotavirus

Las muestras de heces de niños con gastroenteritis fueron analizadas en el laboratorio para determinar la presencia de rotavirus como posible agente causal de la gastroenteritis. A cada una de las muestras se les realizó una prueba rápida de detección de rotavirus/adenovirus utilizando el kit comercial SD Rota/Adeno Rapid Test (SD Bioline). El protocolo se describe brevemente a continuación: Con un hisopo se recolectaron aproximadamente 50 mg de heces que se disolvieron en 4 ml de buffer diluyente, posteriormente se adicionaron de 3 a 4 gotas (120 a 150 microlitros) de esta mezcla al pocillo de la tira reactiva de SD Rota/Adeno Rapid Test (SD Bioline) y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. La muestra de determino positiva para rotavirus con la aparición de una banda de color azul en la línea correspondiente a rotavirus en la tira reactiva y otra similar correspondiente al control. Las muestras positivas

para rotavirus se utilizaron para la extracción de ácidos nucleicos y su posterior análisis por PCR.

4.3 Extracción de RNA

4.3.1 Método fenol-cloroformo

De las muestras positivas para rotavirus se realizó una suspensión de heces en PBS al 20%. De esta suspensión se tomaron 200 μ l y se mezclaron con 200 μ l de buffer lisis (Tris Base, 8 mM; EDTA sal disódica, 76 mM; SDS, 45 mM; Mercaptoetanol, 0.16 M, NaCl, 0.7 M). La mezcla se homogenizó durante 2 minutos en vortex, posteriormente se le adicionó 400 μ l de fenol-cloroformo saturado con Tris (pH 8.0 SIGMA), para luego volver a homogenizar durante 2 minutos en vortex. Después se procedió a centrifugar a 12,000 rpm (Centrifuga LabNet International Inc.) durante 5 minutos a 4°C. En este paso se observó la separación de la solución en dos fases, fase orgánica y fase acuosa que es donde se encuentra el ARN. La fase acuosa se almacenó a -20°C hasta su uso. Las muestras procesadas por esta técnica se utilizaron para corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida al 10%.

4.3.2 Método Trizol

El método de trizol se utilizó para purificar el RNA viral de las muestras positivas para rotavirus y posteriormente someterlo a transcripción reversa

y PCR (RT-PCR). A 200 µl de la suspensión de heces en PBS al 20% se le adicionó 500 µl de Trizol® (Invitrogen, LS Reagent), posteriormente se homogenizó en vortex 10 ocasiones con intervalos de 3 a 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 100 µl de cloroformo, se homogenizó nuevamente en vortex por 10 ocasiones con intervalos de 3 a 5 segundos y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C (Centrifuga LabNet International Inc.). Al finalizar el proceso de centrifugación se observaron dos fases, la fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo y etiquetado correctamente y se le agregó 400 µl de alcohol isopropílico, se homogenizó suavemente por inversión en 10 ocasiones. Después, se incubó a -20°C durante 1 hora, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C (Centrifuga LabNet International Inc.) se retiró el sobrenadante, se adicionó 1 ml de etanol absoluto y se homogenizó suavemente por inversión del tubo, luego se centrifugó a 12,000 rpm por 7 minutos a 4°C (Centrifuga LabNet International Inc.). Posteriormente se retiró el sobrenadante y 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 todo el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de RNA en campana de flujo laminar (Labconco®, purifier biological safety cabinet) por 10-30 minutos. La pastilla de RNA se resuspendió en 20 µl de agua miliQ estéril y se almacena a -20 °C hasta su uso.

4.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida

El RNA extraído por el método de fenol cloroformo de las muestras de heces positivas para rotavirus se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida. El RNA se colocó en un gel poliacrilamida al 10% en la cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, BIORAD) en condiciones nativas a 100 volts (Fuente de poder BIORAD), durante 3 horas en buffer de corrimiento Tris-Glicina 1X (Glicina, 150 mM; Tris, 20 mM). Posteriormente, el gel se colocó en solución fijadora (Etanol al 10%, ácido acético 0.5%) por 30 minutos, luego se colocó en una solución de nitrato de plata (10 mM) por 30 minutos en condiciones de oscuridad. Se lavó el gel dos veces consecutivas con agua tridestilada y se le adicionó una solución de revelado (Formaldehído al 1.5%, NaOH 0.75 M) y se incubó a temperatura ambiente en rotación hasta la aparición de las bandas o por 15 minutos. El gel se lavó con una solución de ácido acético al 5% por cinco minutos y posteriormente se colocó en agua tridestilada. El gel se expuso a luz blanca en el transluminador (DNR miniBis Pro).

siguiente manera: buffer 1X (Green GoTaq, PROMEGA), $MgCl_2$ 10 mM, los oligonucleótidos sentido 25 μ M (Beg9, 9CON1 ó VP7F para VP7; CON3, VP4F ó VP4A para VP4), y los primers antisentido (End9, 9CON2 ó VP7R para VP7; Con 2, VP4F ó VP4R para VP4), dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 2.5 mM, 1 unidad de Taq polimerasa y 1 μ l de cDNA para un volumen final de 12.5 μ l, se colocó en el termociclador (Applied Biosystem), En el caso de VP7 la reacción de PCR se sometió 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 temperaturas excepto por la temperatura de alineación de los oligonucleótidos que en este caso fue de 50°C. El producto de PCR se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, en buffer tris acetato EDTA (TAE) a 100 volts por 45 minutos y se visualizó al teñirlo con bromuro de etidio y en exposición a luz ultravioleta en el transluminador (Bio-Imaging Systems MiniBis Pro).

4.7 Genotipificación de VP4 y VP7

El genotipo de VP4 y de VP7 se determinó por medio de una PCR semianidada. Para la genotipificación se realizó una mezcla con los siguientes componentes: Buffer GoTaq 5x, $MgCl_2$ 10 mM, el oligonucleótido externo correspondiente, 25 μ M (End9; 9CON2, VP7R, para VP7; CON3, VP4F, VP4A para VP4), los oligonucleótidos internos

específicos (anidado) 25 μ M (Tabla 2 y Tabla 3), 1 unidad de Taq polimerasa, y 0.2 μ l del producto de PCR. Las condiciones del termociclador fueron las mismas que para la amplificación del gen parcial de VP4 y VP7 respectivamente. Para la visualización de los segmentos amplificados, correspondientes a cada genotipo, el producto se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con luz ultravioleta en el transluminador (Bio-Imaging Systems MiniBis Pro).

Tabla 2

Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la amplificación del gen de VP7 y su genotipificación.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Posición	Segmento
Oligonucleótidos opción 1			
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1 a 20	1062
End9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1044 a 1062	
aBT1 (G1)	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	314 a 335	749
aCT2 (G2)	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	411 a 435	652
aDT4 (G4)	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	480 a 498	583
aET3 (G3)	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	689 a 709	374
Oligonucleótidos opción 2			
9CON1	TAGCTCCTTTTAATGTATGG	36 a 57	904
9CON2	GTATAAAATACTTGCCACCA	922 a 941	
aBT1 (G1)	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	314 a 335	628
aCT2 (G2)	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	411 a 435	531
aDT4 (G4)	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	480 a 498	462
aET3 (G3)	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	689 a 709	253
Oligonucleótidos opción 3			
VP7F	ATGTATGGTATTGAATATACCAC	51-72	881
VP7R	AACTTGCCACCATTTTTTCC	914-932	
aBT1 (G1)	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	314 a 335	602
aCT2 (G2)	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	411 a 435	505
aDT4 (G4)	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	480 a 498	436
aET3 (G3)	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	689 a 709	227

Tabla 3

Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la amplificación del gen de VP4 y su genotipificación.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Posición	Segmento en pb
Oligonucleótidos opción 1			
CON3	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	11 a 32	876
CON2	ATTTCCGACCATTATAACC	868 a 887	
5T-1 (P[10])	ATCATAGTTAGTAGTCGG	575-594	583
2T-1 (P[4])	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	474-494	483
4T-1 (P[9])	TGAGACATGCAATTGGAC	385-402	391
1T-1 (P[8])	TCTACTTGGATAACGTGC	339-356	345
3T-1 (P[6])	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	259-278	267
Oligonucleótidos opción 2			
VP4F	TATGCTCCAGTNAATTGG	132-149	663
VP4R	ATTGCATTTCTTCCATAATG	775-795	
5T-1 (P[10])	ATCATAGTTAGTAGTCGG	575-594	462
2T-1 (P[4])	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	474-494	362
4T-1 (P[9])	TGAGACATGCAATTGGAC	385-402	270
1T-1 (P[8])	TCTACTTGGATAACGTGC	339-356	224
3T-1 (P[6])	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	259-278	146
Oligonucleótidos opción 3			
VP4A	TGGCTTCGTTCAATTTATAGACA	11-32	1084
VP4B	CTAAATGCTTTGAATCATCCCA	1072-1094	
5T-1 (P[10])	ATCATAGTTAGTAGTCGG		583
2T-1 (P[4])	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC		483
4T-1 (P[9])	TGAGACATGCAATTGGAC		391
1T-1 (P[8])	TCTACTTGGATAACGTGC		345
3T-1 (P[6])	TGTTGATTAGTTGGATTCAA		267

5. RESULTADOS.

5.1 Área de muestreo

Durante los meses de Agosto de 2012 a Agosto del 2013 se recolectó un total de 100 muestras de heces correspondientes a 98 niños menores de cinco años con gastroenteritis. Los menores fueron atendidos en el Hospital del Niño y la Mujer de Cd. Obregón y en el Hospital General de Navojoa, mismos que pertenecen a la Secretaría de Salud Pública, Jurisdicción Sanitaria IV y V respectivamente, en el estado de Sonora (Fig. 3). Los municipios correspondientes a cada jurisdicción se mencionan en la Tabla 4. Así mismo, también se realizó un análisis de la procedencia de cada uno de los niños con gastroenteritis que fueron incluidos en el estudio (Tabla 5).

5.2 Análisis de la Severidad de la Gastroenteritis

Se realizó un análisis de los datos generales y la sintomatología de los niños menores de cinco años con gastroenteritis incluidos en este estudio (Anexo 1). De los 98 casos de gastroenteritis solo se analizaron 89 debido a que 9 fueron descartados por falta de información en las encuestas. En éste análisis se observó que 57 (64%) eran niños y 32 (36%) eran niñas.

La edad promedio de los infantes fue de 19 meses. En 41 (46%) de los casos los niños presentaron diarrea, 33 (37%) vómito, 58(65%) fiebre y 29 (32%) deshidratación (Tabla 6).

5.3 Detección de rotavirus

De las 100 muestras de heces de niños con gastroenteritis 14 (14%) dieron positivas para rotavirus mediante pruebas rápidas SD Rota/Adeno Rapid Test (SD Bioline) (Fig. 4). Se observaron reincidencias de dos casos de gastroenteritis. En uno de los casos la infección por rotavirus se presentó en el mismo niño en un lapso de mes y medio.

Las muestras se sometieron a una evaluación para determinar la severidad de la gastroenteritis, por medio de la escala establecida por Ruuska (1991), esto con la finalidad de observar que tan severo era el cuadro gastrointestinal que presentaban los niños. En la tabla 7 se describe el análisis de la severidad de las muestras que resultaron positivas para rotavirus, así como las que resultaron negativas.

Tabla 4

Municipios que pertenecen a la Secretaría de Salud Pública,
Jurisdicciones IV y V en el sur de Sonora

Jurisdicción IV	Jurisdicción V
Cajeme	Álamos
Bacum	Etchojoa
Empalme	Huatabampo
Guaymas	Navojoa
Quiriego	Benito Juárez
Rosario	
Yécora	
San Ignacio Rio Muerto	

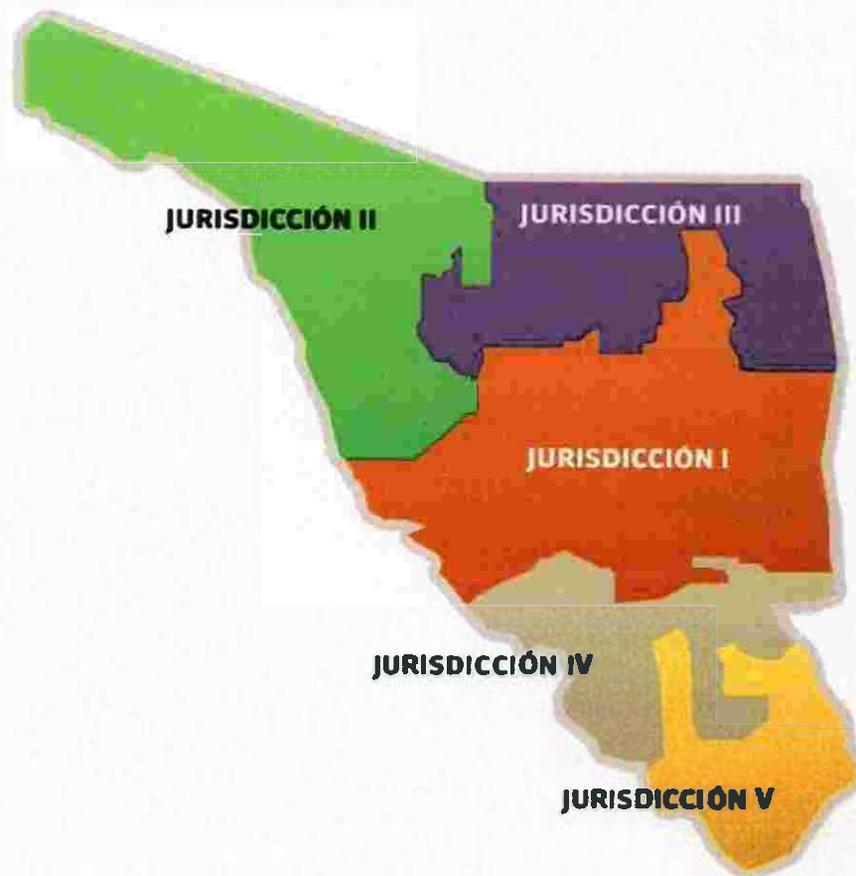


Fig. 3 División jurisdiccional de la Secretaría de Salud Pública en el estado de Sonora

Tabla 5

Número de muestras obtenidas en el Hospital del Niño y la Mujer y en el Hospital General de Navojoa.

Hospital	Jurisdicción	Municipio	Número de muestras
Hospital del Niño y la Mujer	IV	Cajeme	21
		Bacum	4
Hospital General de Navojoa	V	Álamos	1
		Etchojoa	11
		Huatabampo	1
		Navojoa	32
	No especificado	No especificado	28
Total		-	98

Tabla 6
 Incidencia por edad y síntomas de los menores con gastroenteritis
 incluidos en el estudio

Edad meses	Frecuencia	Cuadro Clínico			
		Diarrea	Vómito	Fiebre	Deshidratación
0-6	25	12	10	15	11
7-12	27	12	8	19	7
13-18	4	3	2	3	2
19-24	11	3	2	7	1
25-30	3	1	1	3	1
31-36	6	2	3	3	1
37-42	0	0	0	0	0
43-48	8	4	4	4	3
54-60	5	4	3	4	3
Total	89	41	33	58	29

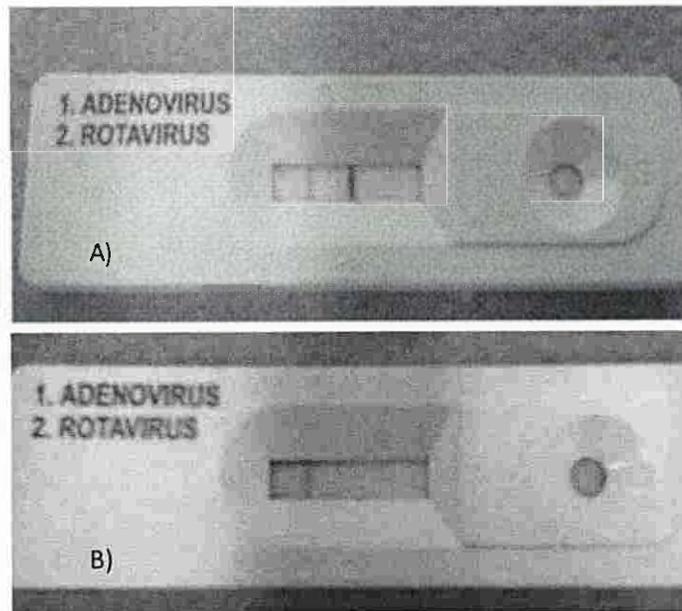


Figura 4. Pruebas rápidas de detección de rotavirus A) Prueba SD Rota/Adeno Rapid Test (SD Bioline) positiva. B) Prueba SD Rota/Adeno Rapid Test (SD Bioline) negativa

Tabla 7

Análisis de severidad de la gastroenteritis en menores de 5 años, positivos y negativos para rotavirus.

Severidad	Clasificación	Incidencia	Sexo		Edad (meses)
			F	M	
Casos positivos para rotavirus					
< 8	Leve	5	3	2	8
>10	Moderada	5	5	0	21
>15	Severa	0	-	-	-
Casos negativos para rotavirus					
< 8	Leve	34	10	24	20
>10	Moderada	24	11	13	18
>15	Severa	5	2	3	23

5.4 Detección del genoma de rotavirus por electroforesis

Las 14 muestras positivas para rotavirus se sometieron a una extracción de RNA por el método fenol-cloroformo. Con el RNA obtenido, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones nativas, a 100 volts durante 3 horas. Posteriormente, el gel se tiñó con nitrato de

plata. Las muestras positivas para rotavirus mostraron un modelo de migración electroforético característico de rotavirus del grupo A (Fig. 5).

5.5 Amplificación y genotipificación de VP7

De las muestras positivas para rotavirus se realizó una extracción de RNA y síntesis de cDNA. Posteriormente se amplificó el gen de VP7 mediante PCR. Para optimizar el número de muestras que amplificaron el gen de VP7, se utilizaron distintos juegos de oligonucleótidos y por tal motivo se amplificaron segmentos de diferentes tamaños (Tabla 8). De las 14 muestras positivas, 6 amplificaron el gen completo de VP7 (1062 pb) y dos el gen parcial (904 pb) (Fig. 6a). La genotipificación de VP7 se realizó mediante una PCR semianidada, utilizando un oligonucleótido externo y oligonucleótidos internos correspondiente a los genotipos G1, G2, G3 y G4 (Fig. 6b). Los segmentos amplificados variaron en tamaño, esto de acuerdo con el oligonucleótido interno utilizado (Tabla 8). Los resultados obtenidos, demostraron que de las 14 muestras 4(29%) fueron G1, 3 (21%) fueron G2 y 1(7%) fue G3, también se observó la presencia dos coinfecciones, 1(7%) G1/G2 y 1(7%) G2/G4, 4 (29%) de las muestras no pudieron ser genotipificadas para VP7.

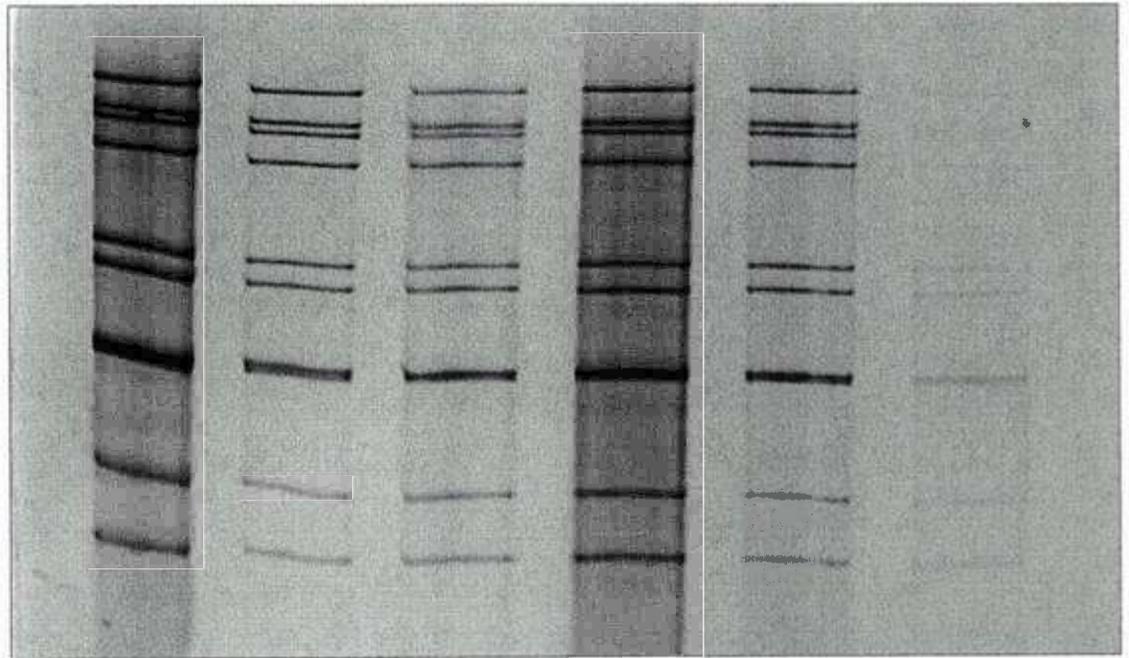


Fig. 5 Corrimiento electroforético característico de rotavirus del grupo A

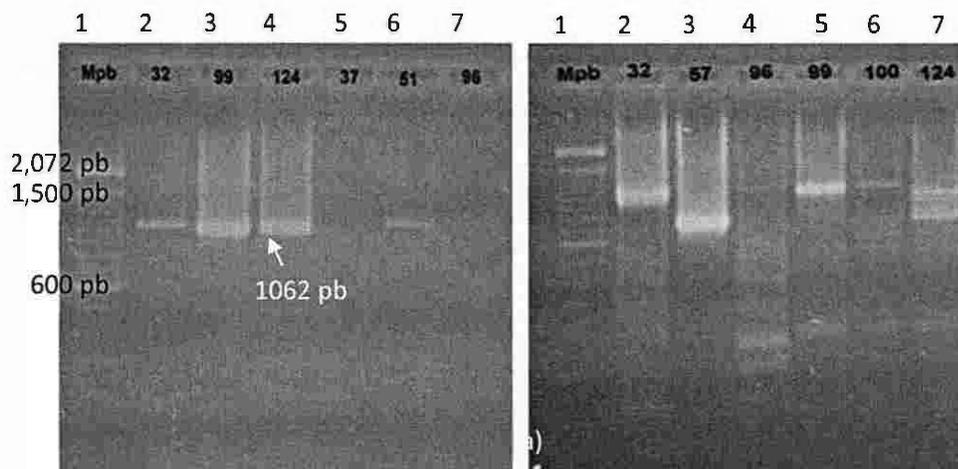


Fig. 6 Amplificación y genotipificación del VP7, a) Amplificación del gen que codifica para VP7 (1062 pb), carril 1: Marcador de pares de bases, carril 2-6 muestras positivas para rotavirus, b) Amplificación de los segmentos característicos de cada genotipo de VP7.

Tabla 8

Amplificación y genotipificación del gen que codifica para VP7 de Rotavirus

Amplificación del gen de VP7	
JUEGO DE OLIGONUCLEOTIDOS VP7	MUESTRAS AMPLIFICADAS
Beg9-End9 (1062 pb)	6
9CON1-9CON2 (904 pb)	2
VP7F-VP7R (881 pb)	0
Genotipificación de VP7	
OLIGONUCLEOTIDO EXTERNO VP7	MUESTRAS AMPLIFICADAS (GENOTIPO)
End9	6
9CON2	0
VP7R	0

5.6 Amplificación y genotipificación de VP4

Para la amplificación del gen que codifica para VP4 se utilizaron los oligonucleótidos Con3 y Con2, así como otros 2 juegos más de cebadores (VP4F/VP4R y VP4A/VP4B) por esta razón, los segmentos amplificados variaron en tamaño (Fig. 7a). El producto de PCR que se obtuvo se sometió a una PCR semianidada, donde se utilizó un oligonucleótido externo (Con3, VP4F y/o VP4A según fuera el caso) acompañado de 5 oligonucleótidos internos anidados correspondientes a los genotipos P[8], P[4], P[6], P[9] y P[10]. Los resultados mostraron que el 10 (71.42%) de las muestras positivas para rotavirus son genotipo P[8] (Fig. 7b).

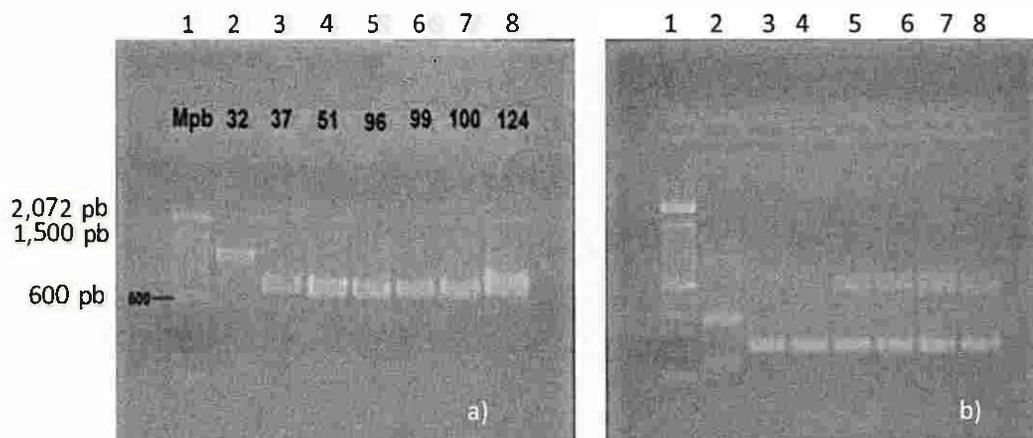


Fig. 7 Amplificación y genotipificación del VP4, a) Amplificación del gen que codifica para VP4, carril 1: Marcador de pares de bases; carril 2: Amplificación del segmento de 1084 pb, carril 3-8: Amplificación del segmento de 663 pb. b) Amplificación de los segmentos característicos del genotipo P[8] (224 pb) de VP4.

Tabla 9

Amplificación y genotipificación del gen que codifica para VP4

JUEGO DE OLIGONUCLEOTIDOS VP4	No. MUESTRAS AMPLIFICADAS
CON2-CON3 (876 pb)	3
VP4F-VP4R (663 pb)	8
VP4A-VP4B (1084 pb)	2
OLIGONUCLEOTIDO EXTERNO VP4	No. MUESTRAS AMPLIFICADAS (GENOTIPO)
CON3	2
VP4F	7
VP4A	1

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se determinó la presencia de rotavirus en muestras de heces fecales de niños menores de cinco años con gastroenteritis atendidos en el Hospital General de Navojoa y en el Hospital del niño y la mujer en Cd. Obregón, comprendiendo la región sur del estado de Sonora. Así mismo, se realizó un análisis de la severidad de cada uno de los casos de gastroenteritis.

El análisis de los datos de los niños con gastroenteritis mostro que los niños más afectados fueron menores de dos años, con una incidencia de 67(75%) de los casos, de éstos, 52(77%) fueron menores de 12 meses (Tabla 6). Este análisis relaciona la edad del menor con la susceptibilidad de padecer enfermedades gastrointestinales como ha sido reportado previamente por la OMS (Farthing and Salam, 2012).

El análisis de estas muestras de heces fecales de niños con gastroenteritis demostró que presencia de rotavirus en un 14% de las muestras, es importante mencionar que las 100 muestras analizadas fueron asociadas a 98 casos de gastroenteritis en niños debido a la presencia de dos

reinfecciones. El porcentaje de rotavirus detectado en este estudio fue bajo si se considera que la incidencia de rotavirus antes de la introducción de las vacunas era del 39% de casos que requerían hospitalización (Parashar, 2006).

Así mismo, se realizó un análisis comparativo de la incidencia de rotavirus antes y después de la introducción de la vacuna. En un estudio realizado de Octubre del 2004 a Marzo del 2005 en la ciudad de Monterrey México, se detectaron 123 casos de gastroenteritis de niños menores de cinco años hospitalizados, de éstos 64 (52%) se asociaron a rotavirus (González-Ochoa, 2013). En este estudio, el muestreo se realizó de Agosto del 2012 a Agosto del 2013, se analizaron 98 casos de gastroenteritis de los cuales 14 casos se relacionaron con rotavirus y en su mayoría fueron de consulta externa más que de hospitalización. En este aspecto, se puede observar una tendencia a la disminución de los casos de gastroenteritis por rotavirus y la disminución de las hospitalizaciones.

En este estudio, la severidad de la gastroenteritis se determinó en base a la escala de Ruuska y Vesikari. Los datos mostraron que los casos de rotavirus se relacionaron con casos leves-moderados y no se observaron casos severos. Esto demuestra el efecto que pueden tener las vacunas actualmente disponibles contra rotavirus en la modulación de la gastroenteritis. Puesto que comúnmente y antes de la introducción de las

vacunas rotavirus se asociaba a gastroenteritis severas (Ruuska and Vesikari, 1991; Parashar, 2006; Desselberg et al 2009; Vesikari, 2012).

Por otro lado, se amplificó y genotipificó mediante RT-PCR (retrotranscriptasa) y PCR el gen de VP4 y VP7 de las cepas de rotavirus detectadas en este estudio. Los resultados mostraron la presencia de 3 (21%) cepas de rotavirus G1P[8], 2 (14%) G2P[8], 1(7%) G3 sin caracterizar, también se observó la presencia de dos (14%) coinfecciones entre G1/G2P[8] y G2/G4P[8]. Lo anterior demuestra que la cepa circulante que predomina es G1P[8], es importante recalcar que las cepas aisladas, son las mismas contra las que la vacuna protege y que dentro de un mismo genotipo pueden presentarse variaciones asociadas a la pérdida de eficiencia de las vacunas. Continuar con estudios de este tipo son beneficiosos, ya que proporcionan un monitoreo acerca de las cepas que circulan en la región y permiten llevar un control de la eficiencia de las estrategias de prevención contra rotavirus.

7. LITERATURA CITADA

Alam, M. M., Khurshid, A., Shaukat, S., Suleman, R. M., Sharif, S., Angez, M., & Zaidi, S. S. Z. (2013). Epidemiology and Genetic Diversity of Rotavirus Strains in Children with Acute Gastroenteritis in Lahore, Pakistan. *PloS one*, 8(6), e67998.

Azemi, M., Berisha, M., Ismaili-Jaha, V., Kolgeci, S., Avdiu, M., Jakupi, X., ... & Hoxha-Kamberi, T. (2013). Socio-demographic, Clinical and Laboratory Features of Rotavirus Gastroenteritis in Children Treated in Pediatric Clinic. *Materia socio-medica*, 25(1), 9.

Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G (2003) Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52: 439-451.

Bishop, R. (2009). Discovery of rotavirus: implications for child health. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 24(s3), S81-S85.

Bustos Jaimes, I., Castañeda Patlán, C., Oria Hernández, J., Rendón Huerta, E., Reyes Vivas, H., & Romero Álvarez, I. (2008). Biología molecular de rotavirus: una mirada a través de la interferencia de rna. *Mensaje bioquímico*, 32.

Cecilia, H. C., Guadalupe, A. A. M., & Graciela, C. E. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 31(4), 137.

Chiappini, E., Arista, S., Moriondo, M., De Grazia, S., Giammanco, G. M., Azzari, C., ... & de Martino, M. (2010). VP7 and VP4 sequence analyses of rotavirus strains from Italian children with viraemia and acute diarrhoea. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 50(1), 114-116.

Ciarlet, M., & Schödel, F.,(2009). Development of a rotavirus vaccine: Clinical Safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, Rotateq®. *Vaccine*, 27, G72-G81.

Cohen J, Laporte J, Charpilienne A, Scherrer R. 1979. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch Virol*. 60:177-86.

De Pediatría, S. A. (2006). Gastroenteritis por Rotavirus y su prevención. *Comité Nacional de Infectología. Argentina*.

Dennehy, P. H. (2008). Rotavirus vaccines: an overview. *Clinical microbiology reviews*, 21(1), 198-208.

Desselberger, U., Manktelow, E., Li, W., Cheung, W., Iturriza-Gómara, M., & Gray, J. (2009). Rotaviruses and rotavirus vaccines. *British medical bulletin*, 90(1), 37-51.

Domínguez, A., Godoy, P., Torner, N., Cardeñosa, N., & Martínez, A. (2009). Las gastroenteritis víricas: un problema de salud pública. *Revista española de salud pública*, 83(5), 679-687.

Esparza-Aguilar, M., Bautista-Márquez, A., González-Andrade, M. D. C., & Richardson-López-Collada, V. L. (2009). Mortalidad por enfermedad diarreica en menores, antes y después de la introducción de la vacuna contra el rotavirus. *salud pública de méxico*, 51(4), 285-290.

Estes, M. K., & Cohen, J. E. A. N. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews*, 53(4), 410.

Estes M. 2001. Rotaviruses and their replication. En: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Strais (ed.). *Fields virology*. 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa. pp. 1747–1785.

Fabbretti, E., I. Afrikanova, F. Vascotto, and O. R. Burrone. 1999. Two nonstructural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol*. 80:333-9.

Farthing, M., & Salam, M. (2012) Diarrea aguda en adultos y niños: una perspectiva mundial. *Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología*.

Field M (2003) Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J Clin Invest* 111:93.

Frank-Briggs A (2012). Introduction and Classification of Childhood Diarrhoea, Current Concepts in Colonic Disorders, Dr. Godfrey Lule (Ed.) pp. 91-104.

Gault, E., Schnepf, N., Poncet, D., Servant, A., Teran, S., & Garbarg-Chenon, A. (2001). A human rotavirus with rearranged genes 7 and 11 encodes a modified NSP3 protein and suggests an additional mechanism for gene rearrangement. *Journal of virology*, 75(16), 7305-7314.

Gentsch J, Glass R, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das B, Bhan M. 1992. Identification of group rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 30:1365–1373.

González-Ochoa G, Menchaca, G. E., Hernández, C. E., Rodríguez, C., Tamez, R. S. and Contreras J. F., (2013) Mutation Distribution in the NSP4 Protein in Rotaviruses Isolated from Mexican Children with Moderate to Severe Gastroenteritis. *Viruses* 2013, 5, 792-805; doi: 10.3390/v5030792

González-Ochoa G, Rodríguez C, Tamez R, Contreras J. F., (2012) Factores Virales Que Influyen En La Severidad De La Gastroenteritis Por Rotavirus. *Revista de Ciencia, Ingeniería y Ambiente* 1(1): 43-59.

González RA, Torres-Vega M, López S, Arias CF. 1998. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch Virol*.143:981-96.

Gouvea V, Glass R, Woods P, Taniguchi K, Clark H, Forrester B, Fang Z. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol*. 28:276–282.

Hodges K, Gill R (2010) Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes* 1: 4-21.

Hostetler MA (2004) Gastroenteritis: An Evidence-Based Approach to Typical Vomiting, Diarrhea and Dehydration. *Pediatric Emergency Medicine Practice*1:1-17

Hyser, J. M., & Estes, M. K. (2009). Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008. *Current opinion in gastroenterology*, 25(1), 36.

Infante-Ramírez, R., Miranda, D. G., Reyes, A. B. T., Cisneros, H. E., & CORDERO, J. F. C. (2007) ROTAVIRUS Y VACUNAS.

i Pagès, J. C., Allué, I. P., & de Liria, C. R. G. (2010). GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA.

Kapikian, A. Z. (2011). History of rotavirus vaccines part I: RotaShield. In *History of vaccine development* (pp. 285-314). Springer New York.

Kellner, J. D. (2005). Rotavirus gastroenteritis. *Advances in therapy*, 22(5), 476-487.

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

Lee KS, Kang DS, Yu J, Chang YP, Park WS (2012) How to Do in Persistent Diarrhea of Children?: Concepts and Treatments of Chronic Diarrhea. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*, 15: 229-236.

López, S., & Arias, C. F. (2001). Los rotavirus. *Microbios en línea*. Centro de Investigación sobre Fijación del Nitrógeno. UNAM. México. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios>.

Martínez, M. Á., Gómez, J. B., García, J. C., & Estape, J. V. (2008) *Microbiológico de las infecciones gastrointestinales*.

Mejia, J. P. Y., Ramírez, J. L. C., & Plata, A. S. (2011). Vacuna monovalente contro rotavirus y mortalidad por diarrea en México. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 16(2), 116-118.

Meyer JC, Bergmann CC, Bellamy AR. 1989. Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. *Virology*. 171:98-107.

Morris SS, Cousens SN, Lanata CF, Kirkwood BR (1994) Diarrhea – defining the episode. *Int J Epidemiol* 23: 617-623.

Mukherjee, A., & Chawla-Sarkar, M. (2011). Rotavirus infection: A perspective on epidemiology, genomic diversity and vaccine strategies. *Indian Journal of Virology*, 22(1), 11-23.

Navaneethan, U., & Giannella, R. A. (2008). Mechanisms of infectious diarrhea. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*, 5: 637-647.

O'Ryan, M. (2009). The ever-changing landscape of rotavirus serotypes. *The Pediatric infectious disease journal*, 28(3), S60-S62.

Parashar, U. D., Bresee, J. S., Gentsch, J. R., & Glass, R. I. (1998). Rotavirus. *Emerging infectious diseases*, 4(4), 561.

Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A., & Glass, R. I. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging infectious diseases*, 9(5), 565.

Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresee, J. S., & Glass, R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging infectious diseases*, 12(2), 304-306.

Patton JT, Wentz TM, Xiaobo J, Ramig RF. 1996. Cis-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA. *J Virol*. 70:3961-71.

Pérez, W., Decia, M., Guzzo, F., & Montano, A. (2011). Gastroenteritis aguda en lactantes: Admisión en el Centro Hospitalario Pereira Rossell 2006-2007. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 82(1), 4-9.

Putignani L, Menichella D (2010) Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen cryptosporidium. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2010:1–39.

Ramig, R. F. (2007). Systemic rotavirus infection. *Expert review of anti-infective therapy*, 5(4), 591-612.

Ramig R. 2004. Patogénesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol*. 78:10213-10220.

Richardson, V., Hernandez-Pichardo, J., Quintanar-Solares, M., Esparza-Aguilar, M., Johnson, B., Gomez-Altamirano, C. M., ... & Patel, M. (2010). Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 299-305.

Riechmann, E. R., Torres, J. B., & Rodríguez, M. J. L. (2010). Diarrea aguda.

Romero, C., Mamani, N., Halvorsen, K., & Iñiguez, V. (2007). Enfermedades diarreicas agudas asociadas a rotavirus. *Revista chilena de pediatría*, 78(5), 549-558.

Ruiz MC, Charpilienne A, Liprandi F, Gajardo R, Michelangeli F, Cohen J. 1996. The concentration of Ca²⁺ that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *J Virol*. 70:4877-83.

Ruiz, M. C., León, T., Díaz, Y., & Michelangeli, F. (2009). Molecular biology of rotavirus entry and replication. *The Scientific World Journal*, 9, 1476-1497.

Ruuska T, Vesikari T. 1991. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis.* 22: 259-67

Sánchez-Fauquier, A., Montero, V., Moreno, S., Solé, M., Colomina, J., Iturriza-Gomara, M., & Gray, J. (2006). Human rotavirus G9 and G3 as major cause of diarrhea in hospitalized children, Spain. *Emerging infectious diseases*, 12(10), 1536.

Schnepf, N., Deback, C., Dehee, A., Gault, E., Perez, N., & Garbarg-Chenon, A. (2008). Rearrangements of rotavirus genomic segment 11 are generated during acute infection of immunocompetent children and do not occur at random. *Journal of virology*, 82(7), 3689-3696.

Steiner TS, Guerrant RL (2010). Principles and Syndromes of Enteric Infections. In: Mandell, Douglas and Bennett's: Principles and Practice of Infectious Diseases 7th edition (pp1335-1351). Churchill Livingstone, Philadelphia.

Tamayo Meneses, L., & Moreno Lagos, B. O. Rotavirus. (2007) Cuadernos Hospital de Clinicas, 97.

Taniguchi, K., & Komoto, S. (2012). Genetics and reverse genetics of rotavirus. *Current Opinion in Virology*.

Traks, S. D., McDonald, S. M., & Patton, J. T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature reviews Microbiology*, 10(3), 165-177.

Vende P, Taraporewala ZF, Patton JT. 2002. RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *J Virol.* 76:5291-9.

Vesikari, T. (2012). Rotavirus vaccination: a concise review. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(s5), 57-63.

Vizzi, E. (2009). Rotavirus: consideraciones biológicas, epidemiológicas e inmunológicas de la infección en humanos. *Salus*, 12(Supl 1), 14-31.

World Health Organization. 2007. Rotavirus Vaccines. *Wkly Epidemiol Rec.* 82:285–96.

World Health Organization (WHO). (2011). Global Rotavirus Information and Surveillance Bulletin, Vol: 3.

Yi, J., & Liu, C. (2011). Detection of a porcine rotavirus strain with VP4, VP7 and NSP4 genes of different animal origins. *Archives of virology*, 156(11), 2045-2052.

Yoshinaga, M., Phan, T. G., Nguyen, T. A., Yan, H., Yagyu, F., Okitsu, S., ... & Ushijima, H. (2006). Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. *Archives of Virology*, 151(1), 183-192.

ANEXO 1

ENCUESTA

Proyecto de investigación gastroenteritis por rotavirus																								
IDENTIFICACIÓN:																								
NOMBRE: _____																								
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)																						
FECHA DE NACIMIENTO: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>																								
dd	mm	aa																						
GENERO: M _____ F _____		MUNICIPIO: _____ ESTADO: _____																						
EDAD: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>																								
Año Mes Día																								
DOMICILIO ACTUAL: _____																								
Calle y número	Colonia y/o Localidad	Municipio/Estado																						
DATOS DE LA UNIDAD TRATANTE:																								
NOMBRE: _____		CLAVE: _____																						
¿El niño está en una guardería? Sí _____ Nombre de la guardería: _____ No _____																								
ANTECEDENTES ¿SE ALIMENTA DE PECHO MATERNO? <input type="checkbox"/> 1. Sí 2. No Edad de inicio _____ Edad de término _____ CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS FECHA DE INICIO <table style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: x-small;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: x-x-small;">Día</td> <td style="text-align: center; font-size: x-x-small;">Mes</td> <td style="text-align: center; font-size: x-x-small;">Año</td> <td colspan="3"></td> </tr> </table>							Día	Mes	Año				Evacuaciones en 24 hrs <input type="checkbox"/> 1. 1-3 por día 2. 4-5 por día 3. >6 por día Otro: _____ Días con vómito <input type="checkbox"/> 1. No vómito 2. 1 día 3. 2 días 4. 3 días Otro: _____ Episodios de vómito en 24 hrs. <input type="checkbox"/> 1. cero 2. 1 por día 3. 2-4 por día 4. > 5 días Otro: _____ Temperatura en °C <input type="checkbox"/> 1. 37 °C 2. 37.1 °C - 38.4 °C 3. 38.5 °C - 38.9 °C 4. >39 °C	Deshidratación <input type="checkbox"/> 1. Sin deshidratación 2. Leve 3. Moderada/severa Tratamiento <input type="checkbox"/> 1. Ninguno 2. Medicamento supervisado 3. Hospitalizado Vacuna contra rotavirus: Rotarix (sí/no) 1ª dosis: _____ Fecha: _____ 2ª dosis: _____ Fecha: _____ Rotateq (sí/no) 1ª dosis: _____ Fecha: _____ 2ª dosis: _____ Fecha: _____ 3ª dosis: _____ Fecha: _____ Datos de laboratorio: Fecha de toma de muestra: <table style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: x-small;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: x-x-small;">Día</td> <td style="text-align: center; font-size: x-x-small;">Mes</td> <td style="text-align: center; font-size: x-x-small;">Año</td> <td colspan="2"></td> </tr> </table>						Día	Mes	Año		
Día	Mes	Año																						
Día	Mes	Año																						
Observaciones:																								
Responsable de la información:																								
Nombre: _____		Teléfono: _____																						
Dirección: _____																								

ANEXO 2

TABLA DE LA SEVERIDAD DE LA GASTROENTERITIS (RUUSKA)

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

Sintomatología	Puntos	
Días con diarrea	<1	0
	1-4	1
	5	2
	6	3
Evacuaciones en 24 h	1-3	1
	4-5	2
	>6	3
Días con Vomito	No Vómitos	0
	1	1
	2	2
	3	3
Episodios de vomito en 24h	0	0
	1	1
	2-4	2
	>5	3
Temperatura en °C	37°C	0
	37°C-38.4°C	1
	38.5°C-39°C	2
	> 39°C	3
Deshidratación	Nada	0
	Leve	2
	Moderada/Severa	3
Tratamiento	Ninguno	0
	Medicamento supervisado	1
	Hospitalizado	2