

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León

UNAN – LEÓN

Facultad de Ciencias Médicas

Carrera de Bioanálisis Clínico



Tesis para optar al título de licenciatura en Bioanálisis Clínico.

Determinación de la carga viral de Rotavirus en niños menores de 2 años de edad y su correlación con los fenotipos de Lewis, Secretor y ABO.

Autores:

- Br. Yennifer de los Ángeles Hernández Rosales.
- Br. José Enrique Martínez Berrios.

Tutores:

Filemón Bucardo. PhD.

Profesor Titular Departamento de Microbiología y parasitología. UNAN, León

Fredman González. Lic. MSc.

Profesor del Departamento de Microbiología y parasitología. UNAN, León.

Yaoska Reyes Lic. MSc.

Profesora del departamento de Microbiología y parasitología. UNAN, León.

¡A La Libertad Por La Universidad!

León, 27 de Marzo 2020



AGRADECIMIENTO

A Dios por darnos vida y salud para culminar este estudio, a nuestros padres por brindarnos todo su apoyo en las diferentes facetas de nuestras vidas y a lo largo de toda nuestra carrera.

Agradecemos de manera especial al Dr. Filemón Bucardo por permitirnos la oportunidad de trabajar en el proyecto SAGE del departamento de Microbiología y de esta manera realizar nuestro estudio.

A nuestros tutores Dr. Filemón Bucardo, Lic. Fredman Gonzales, Lic. Yaoska Reyes por su ardua colaboración al hacer la revisión y asesorarnos en este estudio.

Agradecemos al Dr. Samuel Vílchez por su revisión y comentarios realizados en nuestra investigación.

Índice

I.	Introducción	1
II.	Antecedentes.....	3
III.	Justificación	5
IV.	Planteamiento del problema	6
V.	Objetivos	7
	V.1 Objetivo general.....	7
	V.2 Objetivos Específicos	7
VI.	Marco teórico.....	8
	VI.1 Rotavirus	8
	VI.2 Morfología y estructura.....	9
	VI.3 Clasificación.....	10
	VI.4 Patogénesis y clínica de la infección por rotavirus	11
	VI.5 Ciclo Infeccioso	13
	VI.6 Replicación viral	14
	VI.7 Respuesta inmunológica	17
	VI.8 Susceptibilidad Genética	19
	VI.9 Métodos de identificación y detección de rotavirus	21
	VI.9.1 Ensayo de PCR en tiempo real	21
	VI.9.2 Ensayo de PCR convencional.....	34
	VI.9.3 Ensayos inmunoenzimáticos	35
	VI.9.4 Microscopia electrónica.....	36
	VI.10 Vacunas contra rotavirus.....	37
	VI.10.1 Composición y características	37
VII.	Diseño metodológico	39
VIII.	Resultados	44
IX.	Discusión	49
X.	Conclusión.....	52
XI.	Recomendaciones	53
XII.	Bibliografía.....	54
XIII.	Anexos.....	57



I. Introducción

El pico de incidencia de la infección por rotavirus ocurre entre los 6 y 24 meses de edad, siendo este grupo etario el de mayor riesgo de sufrir diarrea severa y hospitalización. La diarrea por rotavirus ocurre principalmente durante los meses otoño e invierno en los países de clima templado, en Nicaragua ocurre en los meses de verano, con mayor incidencia entre enero y abril. Antes de la introducción de la vacuna en el sistema de inmunización en Nicaragua, representaba el 28% de la diarrea que recibían atención en establecimientos de salud.^(1, 2)

El virus es altamente infectante y muy estable en el medio ambiente, la transmisión puede ocurrir a través de la ingestión de agua o comida y mediante el contacto con superficies u objetos contaminados, aunque los mecanismos de transmisión continúan siendo estudiados el contacto directo fecal-oral es considerado como el más importante. El periodo de incubación es de 18 a 36 horas luego de la exposición inicial, típicamente seguido por 2 a 3 días de vómitos.⁽³⁾

Rotavirus infecta de manera natural enterocitos por medio de la proteína viral VP4 que reconoce ácido siálico o antígenos histo-sanguíneos en la membrana citoplasmática, penetra por endocitosis y se replica en el citoplasma. Este madura en el retículo endoplásmico rugoso (RER) produciendo cuerpos de inclusión. Como resultado de la infección se produce lisis celular, aplanamiento de las vellosidades, mala absorción, secreción activa de electrolitos al medio extracelular y finalmente deshidratación severa que puede ser fatal en algunos casos. Durante la infección un niño puede secretar hasta 10^{10} partículas virales por cada gramo de heces, lo que facilita la transmisión.^(4, 5)

Rotavirus se clasifica en 7 grupos basado en la proteína VP6, denominados con las letras (A-G). Los Rotavirus de los grupos A, B y C se detectan en humanos y animales pero los grupos D, F y G tan solo han sido aislados en animales. El grupo A está relacionado con la producción de diarrea grave en la infancia. También se puede clasificar de acuerdo a genotipos específicos en dependencia de sus proteínas G y P.⁽⁶⁾



Estudios *in vitro*, que utilizan diversos ensayos de unión a glucano, han demostrado que los rotavirus humanos más comunes reconocen los antígenos del grupo histosanguíneo humano de una manera específica del genotipo P. debido a esto algunos individuos presentan cierta resistencia o susceptibilidad a las infecciones por rotavirus por la presencia o ausencia de antígenos de grupos histosanguíneos como Lewis, secretor y ABO, se ha observado que pacientes que no expresan el fenotipo LeA y son no secretores no se infectan por los rotavirus de tipo P[8], aunque sí pueden hacerlo del tipo P[6].⁽⁷⁾

El fenotipo LeB está presente en altas frecuencias en individuos de ascendencia europea, en algunas poblaciones de América Latina y África alcanzan el 40%. El fenotipo LeA, representa aproximadamente el 20% de los individuos de ascendencia europea y su frecuencia es particularmente baja en América Latina (~5%), los individuos LeA-B- (Lewis negativo) son relativamente raro (~7%).⁽⁸⁾

A pesar de la reducción significativa de las infecciones por rotavirus luego de la implementación de la vacuna RotaTeg en Nicaragua (2006), existe una gran persistencia de diarrea por este patógeno de manera natural. En dicho estudio lo que se pretende es determinar la carga viral asociada a los histogrupos sanguíneos en niños con infección natural por Rotavirus.⁽⁹⁾



II. Antecedentes

El rotavirus es el agente etiológico más importante de la diarrea aguda que afecta principalmente a niños menores de 5 años, causando aproximadamente 2 millones de hospitalizaciones y aproximadamente 500,000 muertes. Se estima que todos los niños se infectarán al menos una vez en los primeros 5 años de vida, los cuales desarrollarán una inmunidad protectora de por vida.^(10, 11)

En América Latina países como Argentina, Venezuela y Chile han demostrado una frecuencia de infecciones por rotavirus relacionadas entre 1.5 a 3% de las visitas médicas totales y del 1.6 al 5% de hospitalizaciones en niños menores de 3 años de edad.⁽¹²⁾

Espinoza F y colaboradores en 2004, examinaron la epidemiología y carga de la enfermedad diarreica por rotavirus entre los niños hospitalizados y tratados ambulatoriamente en la ciudad de León, Nicaragua, rotavirus fue detectado en un 28-40% de los niños hospitalizados por diarrea y en 15% de niños tratados ambulatoriamente. Este estudio tuvo como responsable al rotavirus del genotipo G2 P(4), el cual se consideró altamente virulento por el gran número de niños hospitalizados y víctimas fatales.⁽¹³⁾

Un estudio realizado del 2003 al 2009 por Becker-Dreps S y colaboradores indicó que se redujo en un 50% la carga de la infección por rotavirus en niños menores de 5 años relacionada a su mortalidad lo que sugiere que aún persisten casos de rotavirus independientes de la introducción de la vacuna.⁽⁹⁾

Según Espinoza F y colaboradores en el año 1997, al estudiar la prevalencia de rotavirus en 296 niños de edades comprendidas entre 3 y 36 meses que fueron hospitalizados con gastroenteritis en León, Nicaragua. Se detectaron virus entéricos en 96 (32.4%) de los niños y los rotavirus fueron los patógenos más comunes detectados en 84 (28%) de los niños fueron positivos para rotavirus. ⁽²⁾



En León, Nicaragua, se realizó un estudio prospectivo de infecciones por rotavirus en una cohorte de 235 bebés seguidos desde el nacimiento hasta los 2 años de edad. ⁽¹⁴⁾

Según lo juzgado por la seroconversión del anticuerpo IgA anti-rotavirus y / o la demostración del antígeno de rotavirus en muestras fecales, > 50% de los bebés tenían evidencia de infección previa por rotavirus a la edad de 2 meses. La incidencia total de infecciones por rotavirus, incluidas muchas reinfecciones, fue de 0,7 infecciones / año por niño, de las cuales solo el 17% se asociaron con diarrea. El tiempo desde el nacimiento hasta la primera demostración de rotavirus en muestras de heces se correlacionó significativamente con la concentración de anticuerpos IgA anti-rotavirus en el calostro. También hubo una tendencia hacia una relación entre la larga duración de la lactancia materna y la infección asintomática. ⁽¹⁴⁾

Nordgren J y colaboradores en 2014 evaluaron dos poblaciones, Burkina faso y Nicaragua, acerca de la susceptibilidad y resistencia genética ante el virus estudiado, determinando que algunos pacientes son genéticamente resistentes a los virus, debido a que el fenotipo negativo para la molécula Lewis y la molécula secretora es un factor restrictivo para la infección con rotavirus de genotipo P[8], esto se traduce en que los niños que no pueden expresar la molécula Lewis, no se infectan por los rotavirus de tipo P[8], aunque sí pueden hacerlo del tipo P[6], más común en África. ⁽⁸⁾

Barbé L y colaboradores realizaron un estudio epidemiológicos en Francia, Vietnam, Burkina Faso, USA y China, señalan que la presencia o ausencia de mutaciones en *FUT2* o *FUT3* provoca la total ausencia o disminución de la actividad de las flucosiltransferasas y por tanto causan la ausencia de los antígenos HBGA en las membranas, mucosas y secreciones. Además, los investigadores observaron que cultivos celulares adaptados con saliva y leche de pacientes con mutaciones en *FUT2* o *FUT3* o HBGA sintéticos se unían específicamente a la proteína recombinante VP8, las cepas humanas P4 y P8 se unieron específicamente al antígeno H tipo 1 y los Lewis B se unían a cepas P6. ⁽¹⁵⁾



III. Justificación

Rotavirus es causa principal de gastroenteritis en niños en los primeros 5 años de vida, el cual causa un importante problema de salud pública, con una alta tasa de morbilidad y mortalidad. A pesar de la introducción global de las vacunas contra el rotavirus hace más de una década, las infecciones por rotavirus todavía causan más de 500,000 muertes al año, principalmente en países de bajos ingresos como Nicaragua. En Nicaragua existe una prevalencia de rotavirus entre el 15-40% en niños atendidos en establecimientos de salud y en la comunidad.

Estudios previos realizados en Francia, Suecia, China, Taiwan, Pakistan, Gana, Malawi, Nueva Zelanda y Nicaragua han indicado que los antígenos histosanguíneos juegan un importante rol en la susceptibilidad a la infección natural por rotavirus. También se ha observado que hay evidencia de que este se asocia a los factores genéticos (Lewis, Secretor y ABO). En Nicaragua se ha reportado que Lewis A está representado como un genotipo de resistencia para desarrollar la infección.

Este estudio contribuirá a determinar la carga de los virus durante las infecciones sintomáticas naturales asociados a los factores genéticos del huésped, relacionándolo a grupos riesgo, esto nos va a permitir determinar cuáles son los niños estarían más propensos a que no se infecten con rotavirus. Además mediante este estudio se pretende determinar la carga de rotavirus (partículas virales por gramos de heces) en niños menores de 2 años de edad, asociados al fenotipo Lewis, Secretor y ABO.



IV. Planteamiento del problema

¿Cuál es la carga viral de rotavirus en niños menores de 2 años de edad y su correlación con los fenotipos de Lewis, Secretor y ABO?



V. Objetivos

V.1 Objetivo general

- Determinar la carga de Rotavirus en niños menores de 2 años de edad y su correlación con los fenotipos de Lewis, Secretor y ABO.

V.2 Objetivos Específicos

1. Describir las características sociodemográficas y clínicas de la población en estudio.
2. Detección de rotavirus y cuantificación de la carga viral en muestras recolectadas de niños con infección natural en los primeros 2 años de vida.
3. Determinar la frecuencia de los fenotipos Lewis, Secretor y ABO en la muestra de estudio.
4. Correlacionar la frecuencia de los fenotipos Lewis, Secretor y ABO con la frecuencia de niños rotavirus-positivos y su carga viral (genomas/gramos de heces).



VI. Marco teórico

A nivel mundial el rotavirus es la principal causa de gastroenteritis aguda grave en bebés y niños pequeños y es responsable de aproximadamente 450 000 muertes al año, la mayoría en niños de países de bajos y medianos ingreso.⁽¹⁶⁾

VI.1 Rotavirus

Los rotavirus se descubrieron en 1973, por la australiana Ruth Bishop quien con un microscopio electrónico observó a las partículas virales, dentro de las células intestinales de niños que sufrían gastroenteritis. Años después Thomas Henry Flewett acuñó el nombre “rotavirus” este se deriva de la palabra latina rota que significa “rueda” en referencia al aspecto del virión en las microfotografías electrónicas de tinción negativa.⁽¹⁷⁾

Este virus sin membrana pertenece a la familia *Reoviridae* y presenta una estructura icosaédrica compuestas por tres capas proteicas que contienen un genoma formado por 11 segmentos monocistrónicos de RNA de doble hebra, miden entre 60 y 65 nm, carecen de envoltura lipídica, formándose viroplasma en las células infectadas. Con base a la morfología de estos virus, cuya apariencia al microscopio eléctrico es la de una rueda de carreta antigua, estos virus fueron bautizados con el nombre de rotavirus, del latín *Rota*, que quiere decir rueda. ⁽¹⁷⁾

Cada uno de los segmentos codifica para un solo péptido viral, de los cuales 6 son estructurales y 5 no estructurales. El tamaño de los mismos varía entre 650 y 3300 pares de bases y todos ellos tienen una estructura de “cap” en el extremo 5” de la hebra codificante. ⁽¹⁷⁾

Los 11 segmentos dsRNA genómico de rotavirus pueden ser purificados y separados por electroforesis en geles de poliacrilamida. La visualización de los 11 segmentos puede realizarse mediante una tinción con plata de los mismos. El patrón de migración de los 11 segmentos se denomina *electroferotipo*, el cual es muy



variable entre los diversos aislados de campo e incluso entre las cepas del laboratorio. (17)

VI.2 Morfología y estructura

La partícula infectiva está formada por tres capas cubiertas proteicas concéntricas de geometría icosaédrica. La cubierta externa está formada por 780 moléculas de la glicoproteína VP7 y 120 unidades de VP4 y la misma le confiere la capacidad infectiva al virus, ambas son proteínas de superficies que no solo determinan la clasificación dual del serotipo sino que además, estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes serotipos específicos con respuesta inmune protectora así como también, en determinadas circunstancias anticuerpos neutralizantes que presentan reacción cruzada con otros serotipos de rotavirus. (17)

La segunda capa proteica está compuesta de 260 trímeros de VP6 es altamente inmunogénica pero no induce la formación de anticuerpos neutralizantes. El núcleo viral (core) constituye la tercera cubierta proteica la cual contiene las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3.

La proteína VP1 es la RNA polimerasa RNA dependiente (RPR) que efectúa los procesos de transcripción y replicación del genoma. Se ha podido determinar que cada segmento de dsRNA está unida a una molécula de RPR, formando una estructura de tirabuzón con ambos extremos unidos a la polimerasa. La proteína VP2 constituye el esqueleto y soporte del "core" viral y VP3 posee actividad guanilil transferasa por lo cual se le atribuye la incorporación del cap a los mRNAs virales. (17)

Las 6 proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6) se generan exclusivamente durante la infección. La proteína no estructural NSP4 ha demostrado tener función de enterotoxina. La proteína más importante desde el punto de vista inmunológico son las estructurales VP4, VP6, VP7 y la no estructural NSP4. (17)



Además de tener diferentes actividades biológicas, estas partículas tienen diferentes propiedades físicoquímicas. Entre estas vale la pena mencionar el hecho de que tienen diferentes densidades, lo que permite separarlas mediante gradientes de cloruro de cesio. Las *TLPs* (Triple-layered-particle) tienen una densidad de 1.36 g/cm³, las *DLPs* de 1.38 g/cm³ y las nucleocápsides de 1.44 g/cm³. ⁽¹⁷⁾

También su diferencia en tamaño, el RNA que compone cada uno de estos tres tipos de partículas puede ser separado mediante electroforesis en geles de agarosa. ⁽¹⁷⁾

VI.3 Clasificación

Los rotavirus se clasifican en serogrupos, subgrupos y serotipos según sus características serológicas. Se identifican, a su vez 7 grupos antigénicos (A-G) y subgrupos (SG) I, II, I y II de rotavirus, utilizando fundamentalmente las características inmunogénicas de la proteína de la cápside VP6. De éstos solamente A, B y C infectan a los seres humano, D E, F y G solo se aíslan en especies animales, típicamente a diarreas en personas, animales jóvenes siendo el grupo A el más frecuente. El serogrupo B se ha asociado a epidemias anuales de diarreas graves en adultos en china. El serogrupo C ha sido esporádicamente descrito en muestras fecales de niños con diarrea. ⁽¹⁷⁾

Las distintas cepas se tipifican en base a las dos proteínas de la cápside externa (VP4 y VP7), que se combinan en cada partícula viral y permite la clasificación en serotipos. Los serotipos definidos por la glicoproteína VP7 se denominan "G". La proteína VP4 es escondida por proteasas y los serotipos definidos por esta se denominan "P", estableciéndose un doble sistema de tipificación. En la actualidad se conocen 15 serotipos G, con base en la proteína VP7 y 14 serotipos P de acuerdo con la proteína VP4. Los serotipos G1 al G4 y G9, pertenecientes al grupo A los más frecuentes. En cuanto a los serotipos p, P8 y P4, son los más representados. En general las combinaciones más frecuentes de G y P son: G1P8, G2P4, G3P8, G4P8, G9P8 los cuales generan aproximadamente el 90% de todas las infecciones en seres humanos. La combinación G1P8 es la prevalente. ^(18, 19)



La combinación de los 11 segmentos de ARN conforma diferentes genogrupos. Se encuentra bien establecida la protección cruzada contra las cepas del mismo genogrupo pero no entre las cepas de diferentes genogrupos. ⁽¹⁹⁾

Cuando se generan infecciones mixtas con diferentes cepas de rotavirus en condiciones experimentales o en la naturaleza, los segmentos de genoma pueden reasociarse de manera independiente, resultando una progenie de virus originados de parejas mixtas. ⁽¹⁹⁾

Diversos análisis realizados a los “rotavirus reasociados” han conducido a la identificación de los segmentos génicos que codifican cada uno de los polipéptidos estructurales, esta identificación, a su vez, ha permitido el desarrollo de técnicas para reasociar intencionalmente cepas de rotavirus y generar así cepas vacúnales que incorporan características fenotípicas deseables de diferentes virus parentales. ⁽¹⁹⁾

La RT-PCR en cuanto a la detección y genotipificación de rotavirus proporciona datos confiables en la epidemiología de infecciones por rotavirus. Además de detectar específicamente tanto el tipo G como el tipo P, la técnica permite una vez obtenido el *cDNA*, secuenciarlos. ⁽¹⁷⁾

VI.4 Patogénesis y clínica de la infección por rotavirus

Rotavirus se transmite principalmente por vía fecal-oral. Debido a que el virus puede mantenerse estable en el ambiente esta transmisión puede ocurrir a través de la diseminación persona a persona, de la ingestión de agua o alimentos contaminados o por contacto con superficies contaminadas. La dosis infectiva es baja, menos de 100 partículas virales/ml. En el contexto de una infección aguda pueden eliminarse más de 100,000 millones/ml de materia fecal. La eliminación de virus infectante en materia fecal puede extenderse durante una semana aproximadamente, pudiendo ser más prolongada en los huéspedes inmunocomprometidos. ^(4, 5)

El virus se adhiere al epitelio intestinal replicándose en las células epiteliales maduras de las vellosidades del intestino delgado y el principal sitio de replicación



son los enterocitos maduros sobre las vellosidades del intestino delgado alto. Durante un periodo de uno a dos días después de la replicación viral, la infección se disemina a lo largo del tracto, desde el intestino delgado proximal hasta el ileón, la infección intestinal es suficiente para despertar la respuesta inmune local y sistémica.⁽⁴⁾

La replicación de rotavirus en las células epiteliales intestinales genera varias alteraciones morfológicas y fisiológicas, que producen la anormalidad en la absorción de agua y electrolitos. No se evidencian cambios inflamatorios en la lámina propia, en las pacas de peyer, ni en la superficie de la mucosa intestinal, es improbable que el daño celular sea mediado por la respuesta inmune del huésped.⁽⁵⁾

El daño intestinal es reversible, es así que la diarrea continúa hasta que las vellosidades se hayan regenerado. Por lo tanto, la gravedad de las lesiones determinan la intensidad y duración de los síntomas.⁽²⁰⁾

Las infecciones intestinales por rotavirus, después de un periodo de incubación de aproximadamente de 1 a 3 días, produce diarrea acuosa profusa con deshidratación (11-71%), vómitos (77-99% de los casos) y alteraciones del sensorio: irritabilidad (59-89%) o letargia (53-95%) como síntomas más frecuentes. Las deposiciones son generalmente acuosas, presentando 5 a 10 episodios por día, y sin sangre, aunque a veces pueden observarse algunas estrías sanguinolentas. En los casos graves son causa de deshidratación con riesgo de muerte sino se realiza un tratamiento adecuado de reposición hidroeléctrica.⁽²⁰⁾

Se cree que la diarrea es consecuencia de la destrucción y descamación de los enterocitos, sin embargo, se ha propuesto que la diarrea es causada por la proteína no estructural (NSP4) que estimula la secreción trans-epitelial de cloro por una vía dependiente de calcio, lo que desequilibra el balance iónico de la célula y provoca la salida de agua. Esto a su vez provoca el síndrome de mala absorción de carbohidratos, lípidos y proteínas, debido al gran daño causado en las vellosidades intestinales.⁽²¹⁾



Los primeros días puede haber fiebre que cede dentro de 48 a 72 horas, al igual que los vómitos, mientras que la diarrea puede prolongarse por 4 a 8 días.⁽²²⁾

La infección es auto limitada en niños con adecuada nutrición y función inmunológica. El primer episodio de gastroenteritis por rotavirus es el que se presenta con mayor gravedad clínica, disminuyendo la intensidad en los episodios subsiguientes.⁽²³⁾

Hay viremia en más de 19% de los casos de diarrea por rotavirus, durante los tres primeros días de enfermedad; es más frecuente en las infecciones producidas por el genotipo G1. Otras manifestaciones menos frecuentes son: hepatitis subclínica (aumento de TGP hasta el doble del valor máximo normal), hepatitis grave, pancreatitis aguda, convulsiones (hasta 7%), aumento de la uricemia. ⁽²³⁾

En los adultos las infecciones suelen ser asintomáticas, pero en ocasiones puede causar enfermedad (frecuencia estimada 4%), principalmente ante la exposición a serotipos diferentes, como ocurre en las diarreas del viajero. También se deben considerar en estas situaciones a los huéspedes inmunocomprometidos. ⁽²³⁾

VI.5 Ciclo Infeccioso

El ciclo infeccioso de rotavirus se desarrolla totalmente a nivel citoplasmático, por lo que cuenta con su propia maquinaria enzimática para la transcripción y la replicación de su genoma. El proceso de internalización del virus aparentemente no involucra la formación de una vacuola como es característico para otros virus sin membrana. Aún no se ha podido identificar con plena exactitud el receptor celular que sirve de anclaje para rotavirus en los tejidos epiteliales del duodeno sugiriéndose un papel relevante a glicolípidos y glicoproteínas que contienen moléculas de ácido sálico.^(24, 25)

Según estudios realizados la entrada a las células por virus no envueltos requiere translocación en el citosol de un complejo macromolecular. Para los virus de ARN de doble hebra, una partícula subviral completa.⁽²⁶⁾



Se utilizan imágenes de fluorescencia de células vivas para seguir la entrada y penetración de rotavirus en el citosol de su partícula interna de la cápside de 700 Å ("partícula de doble capa", DLP). Se rotulan con marcadores fluorescentes distintos el DLP y cada una de las dos proteínas de la capa externa y seguimos los destinos de cada especie cuando las partículas se unen y entran en las células BSC-1.⁽²⁷⁾

Los viriones se unen a sus receptores glicolípidos en la membrana de la célula huésped y se vuelven rápidamente inaccesibles a los agentes añadidos externamente; La mayoría de las partículas que liberan su DLP en el citosol lo han hecho en 10 minutos, como se ha detectado por el movimiento difusional rápido del DLP lejos de las proteínas residuales de la capa externa.⁽²⁸⁾

La microscopía electrónica muestra imágenes de partículas en varias etapas de absorción en invaginaciones de membrana ajustadas, de acuerdo con la interpretación de que las partículas de rotavirus impulsan su propia absorción. La criotomografía electrónica de viriones unidos a membrana también muestra una membrana envuelta estrechamente. Combinadas con información estructural de alta resolución sobre los componentes virales, estas observaciones sugieren un modelo molecular para la descripción de la membrana y la penetración de DLP. ⁽²⁸⁾

VI.6 Replicación viral

Los rotavirus inician su ciclo de infección uniéndose a un receptor localizado en la superficie de la célula. Después de la unión al receptor, los rotavirus penetran en el interior de la célula y ocurre pérdida de la capa externa produciendo una activación de la RNA polimerasa en la partícula y la síntesis de los 11 mRNAs virales. El molde del evento de transcripción lo constituye el genoma de dsRNA contenido en el interior de la subpartícula. Cada polimerasa se encarga de sintetizar el mRNA a partir del dsRNA al cual está unida. En el evento de transcripción se copia íntegramente una de las dos hebras de cada segmento, denominándose hebra negativa la cadena molde. Durante la transcripción, los mRNAs virales son extraídos a través de canales existentes en los vértices de las partículas, que atraviesan las placas proteicas formadas por VP6 y VP2.⁽²⁹⁾



La síntesis de los mRNAs virales pueden contribuir durante un periodo de hasta 2 horas permitiendo que una sola partícula de cierta cubierta pueda producir un alto número de copias de cada mRNA viral. Esto indica que la RPR reengancha extremo 5" luego de terminar la transcripción en el extremo 3". La eficiencia de este proceso de reenganche sugiere que las proteínas del core sostienen al dsRNA por sus dos extremos aproximándolos de tal forma que el mismo funciona como un molde circular durante la transcripción. A consecuencia, el dsRNA debe estar libre para moverse dentro del core, para así poder desplazarse a través del sistema enzimático RPR –“capping”.⁽³⁰⁾

Estudios recientes en BTV indican que el dsRNA está formado un cristal líquido dentro del core lo cual le entrega la fluidez necesaria al molde de moverse durante la transcripción. Aparentemente en este proceso VP2 es imprescindible pues forma una plataforma sobre la cual el dsRNA es usado por el RNA polimerasa.^(31, 32)

Los mRNAs virales producidos durante el proceso de transcripción presentan la clásica estructura de “cap” en el extremo 5" pero carece de tallo poliadenilación en su otro extremo.⁽³³⁾

Estos mRNAs dirigen la síntesis de seis proteínas que forman parte de la estructura del virus maduro (proteínas estructurales). Una vez que los niveles de proteínas y mRNAs virales son suficientes, las proteínas VP1 y VP3 interactúan con los mRNAs para formar los intermediarios pre-cores, VP2 interactúan con ellos formando intermediarios de replicación de tipo “core”. Estos intermediarios de replicación son sensibles al tratamiento con RNAasa y el efecto de las mismas provoca la reducción del tamaño de los intermediarios.⁽³³⁾

Esta observación apunta a que grandes porciones de los mRNAs se encuentran extendidas fuera de las estructuras proteicas de los cores. También ha sido posible demostrar que durante la síntesis del dsRNA genómico, los intermediarios de replicación de tipo core disminuyen su tamaño.⁽³³⁾

Estas evidencias conjuntamente con la ausencia de dsRNA viral libre dentro de la célula infectada, sugieren un escenario donde muy probablemente el proceso de



síntesis de la doble hebra y el empaquetamiento del material genómico ocurre simultáneamente. De esta forma las señales de empaquetamiento para la formación del intermediario de replicación son utilizadas antes de comenzar a sintetizarse la hebra negativa. El empaquetamiento selectivo de los mRNAs del rotavirus produce una cantidad equimolar de los 11 segmentos dsRNA.⁽³⁴⁾

Este último evento es independiente de que los 11 mRNAs no se producen de manera equimolar dentro de la célula, lo cual refuerza la necesidad de un sistema de selección a través de las señales de empaquetamientos.⁽³⁵⁾

Los mRNAs virales forman parte del dsRNA genómico, lo que provoca que el genoma viral presente una estructura “cap” en el extremo 5” de una de sus hebras. Las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 en conjunto con las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 forman parte del complejo replicativo. Ambas proteínas no estructurales aparentemente facilitan la translocación de los mRNAs dentro del core durante la síntesis de la cadena negativa.⁽³⁶⁾

La coinfección de células con diferentes cepas de rotavirus puede producir, en un gran número de casos, una progenie viral, cuyo dsRNA genómico está formado por una mezcla del genoma de las cepas parentales. La formación de estos nuevos virus reordenantes indica que los mRNAs virales pueden segregarse independientemente durante el ciclo de replicación. Esto también afecta a que diferentes cepas de rotavirus tendrían comunes señales de empaquetamiento y replicación.⁽³⁷⁾



VI.7 Respuesta inmunológica

La susceptibilidad a la infección por rotavirus está modulada tanto por factores no inmunológicos (como la presencia de ácido gástrico y la expresión diferencial de los receptores de rotavirus, como antígenos histosanguíneos, en el intestino) como por factores inmunológicos. La mayoría de los datos sobre las respuestas inmunitarias inducidas por rotavirus provienen de estudios que utilizan modelos animales (principalmente ratones neonatos o adultos y lechones gnotobióticos), aunque se desconoce la relevancia de estos datos para niños con cepas de rotavirus humano y los mecanismos de inmunidad al rotavirus. La enfermedad en humanos no se comprende completamente.^(38, 39)

Los neonatos y lactantes pequeños presentan cierta protección contra la infección grave por rotavirus debido a la transferencia pasiva de anticuerpos maternos en forma transplacentaria (inmunoglobulina IgG materna inhibiría la replicación viral), por la lactancia materna (la lactadherina inhibe la unión de rotavirus con la célula) y la colonización con *lactobacillus*. Por lo tanto, las infecciones por rotavirus suelen ser más graves en niños de 3-24 meses de edad. Los niños mayores podrían estar protegidos por una respuesta inmune específica resultante de las infecciones naturales reiteradas (se estima que el niño está inmune después de 2-3 infecciones en los primeros años de vida).⁽⁴⁰⁾

Se debe tener en cuenta que los niños prematuros pueden presentar mayor riesgo de infecciones sintomáticas por cuanto el mayor pasaje transplacentario de anticuerpos maternos ocurre durante las últimas semanas de gestación.⁽⁴⁰⁾

La lactancia materna a través de la lactadherina protege contra la infección sintomática por rotavirus. Esta protección es de 50% en los menores de 6 meses y 40% en menores de 1 año.⁽⁴¹⁾

La protección clínica contra infecciones por rotavirus ha sido asociada con la presencia de una respuesta inmunológica humoral sistémica y local (IgA específica en la superficie de la mucosa intestinal), como también con la presencia de inmunidad



celular. Las infecciones por rotavirus, tanto primarias como secundarias, desencadenan a su vez la producción de anticuerpos IgA, IgM e IgG en suero, secreciones intestinales y saliva. Sin embargo, existe controversia sobre la relación posible entre los niveles séricos de anticuerpos y la protección generada contra la infección.⁽⁴²⁾

Debido a que la respuesta de anticuerpos a la vacuna no se ha relacionado con la eficacia protectora, se han medido las respuestas de anticuerpos neutralizantes de serotipo. Aunque la proteína VP6 ha sido reconocida como la más inmunogénica, varios estudios genéticos evidenciaron que los anticuerpos dirigidos contra las proteínas VP4 o VP7 son neutralizantes y generan protección en los huéspedes susceptibles.⁽⁴³⁾

Si bien se ha demostrado que la infección natural por rotavirus protege contra la enfermedad moderada a grave acusada por una nueva infección, algunos niños pueden experimentar reinfección por el mismo serotipo. Estas observaciones son consistentes con el hecho de que la producción de IgA secretora (IgAs) específica es generalmente de duración breve y a menudo deja de detectarse en la superficie de la mucosa intestinal, dentro del año de la infección sintomática. A su vez, esta modificación en la gravedad de la enfermedad por rotavirus en caso de reinfección es mediada probablemente por la producción de IgAs específica por las células B de memorias presentes en la lámina propia intestinal.⁽⁴⁴⁾

Sin embargo, la presencia de IgAs específica de rotavirus en la superficie de la mucosa intestinal (como se refleja en las heces) y en el suero, es predictiva de protección contra las enfermedades en los estudios de infección natural, pero no en los ensayos de vacunas. Las IgA específica para el virus en las heces o en el suero no predijo protección contra la enfermedad después de la inmunización contra rotavirus en niños, las explicaciones plantadas para este fenómeno son:

- La ausencia de IgAs rotavirus específica en las heces no predice necesariamente la ausencia de células B de memorias específicas de rotavirus en la lámina propia intestinal. La presencia de células B de memoria



específica de rotavirus en la lámina propia solo se puede determinar por biopsia intestinal.

- La protección contra la enfermedad de rotavirus después de la vacunación con rotavirus animales puede estar mediada en parte por linfocito-T citotóxicos específicos (LTS). Mientras el papel de los LTS específicos en la protección contra la enfermedad humana es desconocido, cierta evidencia en animales apoya su importancia protectora. Post inmunización contra rotavirus, las citoquinas contra actividad antiviral que son producidas por células T CD4 + activadas pueden ser generados más tempranamente o en mayores cantidades que después de una infección primaria. Se ha encontrado q varias de estas citoquinas pueden bloquear la replicación de rotavirus in vitro.^(45, 46)

Las bases que sustentan la vacunación están generadas en estudios que demostraron la infección natural por rotavirus confiere protección contra gastroenteritis clínicamente significativas durante la reinfección y reduce la frecuencia de episodios de diarrea posteriores. Se ha comunicado, también que, en algunos casos, la infección natural o la inmunización con un serotipo de rotavirus puede generar inmunidad no solo específica del serotipo involucrado (inmunidad homotípica) sino también contra un serotipo diferente (inmunidad heterotípica).⁽⁴⁰⁾

VI.8 Susceptibilidad Genética

La función Biológica de los antígenos histosanguíneos se ha especulado ampliamente, pero debido a su ubicación externa en las células epiteliales se ha sugerido que pueden servir como receptores para microorganismos. Debido a la naturaleza altamente polimórfica de los genes del grupo ABO, Secretor y Lewis, la especie humana tiene una gran diversidad de términos de supervivencia de la humanidad como especie, ya que un patógeno con preferencia por un receptor específico de carbohidratos sería incapaz de infectar a todos los seres humanos.



La susceptibilidad genética a infecciones por rotavirus está relacionada con la expresión de antígenos de grupo histosanguíneos (HBGAs) en la superficie mucosa de las células epiteliales intestinales. Los HBGAs son carbohidratos que actúan como receptores putativos o correceptores para rotavirus, estos incluyen ABO, Lewis, Secretor y antígenos precursores de tipos sanguíneos expresados en las células epiteliales. Cada individuo tiene un grupo sanguíneo particular, dependiendo de qué antígenos estén presentes en los glóbulos rojos (A, B, AB, O). Los antígenos ABO (H) también se han encontrado en las células epiteliales en todos los órganos que están en contacto con el ambiente externo, por ejemplo el tracto respiratorio superior e inferior, el tracto respiratorio inferior, el tracto genitourinario y el tracto gastrointestinal. Sin embargo, la expresión de los antígenos HBGAs está fuertemente regulada por varias glucosiltransferasas, que a través de una adición gradual de monosacáridos a una molécula precursora construye los carbohidratos.

Los antígenos de Lewis parecen que interactúan con rotavirus. El sistema de Lewis está relacionado con el sistema de grupo sanguíneo ABO, ya que tienen estructuras y vías de síntesis similares y además pueden estar presentes en las mismas cadenas de carbohidratos. Los antígenos Lewis y ABO se encuentran principalmente en cuatro cadenas de diferentes carbohidratos, denominados H tipo 1-4.

La susceptibilidad genética del huésped y patrones de unión de HBGA parecen ser rotavirus-específica. Con diferentes cepas de rotavirus. El HBGA más importante relacionado con la susceptibilidad a la gastroenteritis por rotavirus es el antígeno H1, cuya presencia depende de la enzima fucosiltransferasa (FUT), que determina el estado secretor. Los huéspedes con alelos homocigoto mutantes nulos de FUT 2 son descritos como no secretores. Los no secretores han demostrado ser resistentes a la infección con rotavirus.



VI.9 Métodos de identificación y detección de rotavirus

En los últimos años el desarrollo de técnicas moleculares ha permitido la detección e identificación de bajas concentraciones de virus en diversas muestras, mejorando la sensibilidad y especificidad de las pruebas anteriormente usadas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asociada a la posibilidad de caracterizar genéticamente los virus detectados, ha permitido obtener una información más completa de muchos de los virus presentes en el ambiente, solo puede determinar la presencia o ausencia de secuencias de DNA o RNA específicas del patógeno. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1 Ensayo de PCR en tiempo real

Varios ensayos de PCR en tiempo real han sido desarrollados para mejorar la sensibilidad en la detección de rotavirus en muestras de heces y del ambiente. Diferentes enfoques han sido desarrollados, tomando ventaja de los *primers* inicialmente desarrollados para PCR convencional y tecnologías SYBR Green y TaqMan. ⁽⁴⁷⁾

El PCR en tiempo real ofrece ventajas obvias sobre los formatos de PCR convencional, tales como la reducción del tiempo de análisis, mayor sensibilidad < 10 copias transcritas por mezcla de reacción y cuantificación de partículas virales en el análisis de muestras. Sin embargo, se necesita un poco de cuidado a la hora de interpretar los resultados. La eficiencia del ensayo de PCR en tiempo real puede ser estimada analizando la fase exponencial de la curva de amplificación. El método de PCR en tiempo real cuantitativo presume que las secuencias dianas y las muestras son amplificadas con eficiencias similares. Sin embargo, pequeñas variaciones en la eficiencia reflejan una disminución en la actividad de la ADN polimerasa entre los estándares y las muestras que puedan tener un impacto negativo en la cuantificación. ⁽⁴⁷⁾



VI.9.1.1 Terminología en el análisis del PCR en tiempo real

Existen 3 pasos principales que integran la reacción del PCR en tiempo real y las reacciones son generalmente efectuadas por 40 ciclos. Los pasos son **1) desnaturalización:** aquí la temperatura debería ser apropiada para la polimerasa (usualmente 95°C). El tiempo de la desnaturalización puede aumentarse si los contenidos de guanina y citosina en el amplicon son más altos. **2) Hibridación:** utiliza temperaturas apropiadas basadas en el cálculo del T_m de los *primers* (5°C por debajo de la T_m de los *primers*) y **3) Extensión:** entre 70°C y 72°C la actividad óptima de la ADN polimerasa es óptima y la extensión de los *primers* sucede a rangos por encima de 100 bases por segundo. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1.1.1 Línea base

Se refiere al nivel de señal durante los ciclos iniciales del PCR en tiempo real usualmente de 3 a 15 ciclos, en los cuales hay pequeños cambios en la señal de fluorescencia. El nivel bajo de señal de una línea base puede ser comparado al fondo o al “ruido” de la reacción. La línea base puede ser ajustada cuidadosamente para permitir una determinación precisa del Ct, definido posteriormente. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1.1.2 Umbral

El umbral de la reacción del PCR en tiempo real es el nivel de la señal que refleja un aumento estadísticamente significativo por encima de la señal de la línea base calculada. Esta es ajustada para distinguir señales de amplificaciones relevantes al fondo. ⁽⁴⁷⁾

Generalmente, el software del instrumento del PCR en tiempo real automáticamente ajusta el umbral a 10 veces la desviación estándar del valor de la señal de fluorescencia de la línea base. Sin embargo, la posición del umbral puede ser ajustada en cualquier punto en la fase exponencial del PCR en tiempo real. ⁽⁴⁷⁾



VI.9.1.1.3 Threshold Cyclo (Ct)

El Ct es el número de ciclos donde la señal de fluorescencia de la reacción cruza el umbral. El Ct es utilizado para calcular el número de copias inicial de ADN. Ya que el valor de Ct es inversamente proporcional a la cantidad inicial de producto (figura 1).⁽⁴⁷⁾

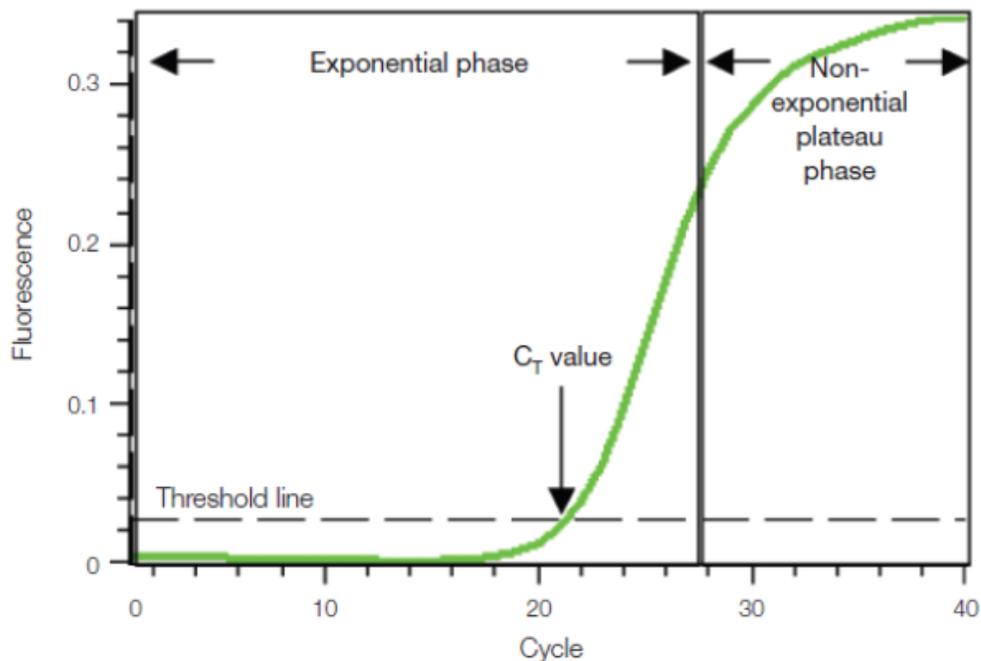


Figura 1. Grafica de amplificación en el PCR en tiempo real.

VI.9.1.1.4 Curva estándar

Series de diluciones de concentraciones conocidas de amplicones y así poder determinar la cantidad de amplicones iniciadores de estudio o evaluar la eficiencia de la reacción. El logaritmo de cada concentración conocida en la serie de diluciones (eje x) es marcado contra los valores de Ct para esa concentración (eje y).⁽⁴⁷⁾

De esta curva estándar, se obtiene información acerca de la ejecución de la reacción así como de varios parámetros de la reacción (incluyendo pendiente, coeficiente de correlación e intercepto-y) pueden ser derivados. Las concentraciones escogidas



en la curva estándar pueden incluir el rango de concentraciones esperadas del estudio. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1.1.5 Coeficiente de correlación (R^2)

El coeficiente de correlación es una medida de como los datos se ajustan la curva estándar. El valor de R^2 refleja la linealidad de la curva estándar. Idealmente, un $R^2=1$, aunque generalmente 0.999 es el valor máximo. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1.1.6 Intercepto-y

Corresponde al límite de detección teórico de la reacción o el valor de Ct esperado si el número de copias de las moléculas en estudio denotan en el eje de las x un aumento en la amplificación estadísticamente significativo. Aunque el PCR en tiempo real es teóricamente capaz de detectar una sola copia, un número de copias de 10 es especificado comúnmente como el nivel más bajo que se puede cuantificar realmente utilizando el PCR en tiempo real. Esto limita el uso de los valores del intercepto-y que pueden ser útiles para comparar diferentes sistemas de amplificación. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1.1.7 Fase exponencial

En el PCR en tiempo real es mejor cuantificar los productos de la amplificación (amplicones) al inicio de la fase exponencial o al final, cuando la curva busca el *Planteu*. Al inicio de la fase exponencial, todos los reactivos están en exceso, la ADN polimerasa está altamente eficiente, y el producto que está presente en bajas cantidades no competirá con la capacidad de hibridación de los *primers*. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1.1.8 Pendiente

La pendiente de la fase exponencial de la reacción de amplificación es una medida de la eficiencia de la reacción. Para obtener resultados precisos y reproducibles, las reacciones deben tener una eficiencia ideal del 100%, equivalente a una pendiente de -3.32. ⁽⁴⁷⁾



Un PCR en tiempo real con una eficiencia ideal del 100% debería duplicar el número de amplicones en cada ciclo, es decir el porcentaje de eficiencia refleja la capacidad de amplificación en cada ciclo de una reacción de PCR en tiempo real. ⁽⁴⁷⁾

La presencia de inhibidores en uno o más reactivos en el PCR en tiempo real pueden producir una eficiencia de más de 110%. Una buena reacción debería tener una eficiencia entre un 90-110% que corresponde a una pendiente entre -3.58 y -3.10. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1.1.9 Rango dinámico

Es el rango de concentración inicial de amplicones sobre el cual se obtienen valores de Ct precisos. En la cuantificación absoluta la interpolación dentro de este rango es exacta, pero la extrapolación más allá del rango dinámico se debe evitar. Cuando mayor sea el rango dinámico, mayor será la capacidad de detectar muestras con bajo y alto número de copias en una misma reacción. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1.1.10 Curva de disociación

Es la curva grafica de los cambios en la fluorescencia que se produce por la liberación de los fluoróforos cuando se disocia el ADNds a medida que aumenta la temperatura. El análisis de la curva de disociación después del PCR en tiempo real de los artefactos, los dímeros de *primers*, la contaminación y asegurar la especificidad de la reacción. Debido a que la temperatura de disociación de los ácidos nucleicos es afectada por el contenido de guanina y citosinas y la presencia de bases “*mismatches*” entre otros factores, diferentes productos de PCR en tiempo real puede ser distinguidos con frecuencia por sus características de disociación. La caracterización de los productos de la reacción por medio del análisis de la curva de disociación reduce la necesidad de consumir tiempo con el gel de agarosa. ⁽⁴⁷⁾



V.I.9.1.2 Químicas usadas en el PCR en tiempo real

Un paso clave en el diseño de un PCR en tiempo real es la selección de la química que controlan la amplificación de la secuencia diana. La variedad de los productos químicos fluorescentes disponibles se pueden clasificar así:

- Fluoróforos unidos al ADN (tecnologías de SYBR Green I y SYBR GreenER).
- Primers Fluorescentes (primers LUX, Amplifluor y BDQzyme).
- Sondas Fluorescentes (sondas TaqMan, Escorpiones y Beacons moleculares).

Las químicas comúnmente utilizadas para el PCR en tiempo real son SYBR Green y las sondas TaqMan. La química que se seleccione para el ensayo del PCR en tiempo real depende de la aplicación, del formato (monoplex o multiplex) y del costo. En general, las reacciones simples con fluoróforos unidos al ADN pueden ser preferibles debido a que estos ensayos son más fácil de diseñar, más rápidos de instalar y más rentables. Sin embargo, no permite la detección de diferentes secuencias dianas en una misma reacción, como lo hace TaqMan, que usa sondas que permiten reconocer diferentes secuencias dianas. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1.2.1 Fluoróforos unidos al ADN

El sistema más común para la detección de ADN amplificado es el uso de fluoróforos intercalados que emiten fluorescencia cuando se une al ADNds. La tecnología de SYBR Green I y SYBR GreenER utilizan este tipo de método de detección. La fluorescencia del fluoróforo unido al ADN aumenta significativamente cuando se une al ADNds. La intensidad de la señal de fluorescencia depende de la cantidad de ADNds que está presente. ⁽⁴⁷⁾

Las ventajas de utilizar fluoróforos que se unen al ADN incluyen diseños de ensayos sencillos (sólo se necesita un par de primers y no se requieren diseños con sondas), la habilidad de detectar múltiples genes rápidamente sin el diseño de múltiples sondas, de bajo costo en comparación con otros sistemas de detección y



la habilidad de elaborar una curva de disociación para verificar la especificidad de la amplificación en la reacción. ⁽⁴⁷⁾

El análisis de la curva de disociación puede ser utilizada para identificar los diferentes productos de reacción, incluyendo productos no específicos. Después de completar la reacción de amplificación, la curva de disociación es generada por el aumento de la temperatura en pequeños incrementos y las señales de fluorescencia son monitoreadas en cada paso. Como el ADNds en la reacción de desnaturalización se disocia la fluorescencia decrece. Los primeros derivados negativos del cambio en la fluorescencia son marcados en función de la temperatura. Un pico característico del T_m del amplicon se distingue de los otros productos, como dímeros de primers, los cuales se disocian a diferentes temperaturas. ⁽⁴⁷⁾

Esta tecnología, aunque simple, puede carecer de especificidad debido a que el fluoróforo colorante se une indiscriminadamente a todos los ADNds formados durante el PCR en tiempo real, no sólo al ADN diana. Además, los artefactos del PCR en tiempo real, como dímeros de primers y productos de amplificación inespecífica, pueden ser detectados y contribuir a la señal de la fluorescencia total. El diseño de buenos primers y la calidad de los reactivos del sistema son críticos para evitar la formación de productos inespecíficos. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1.2.2 Primers fluorescentes

En general, estas químicas toman ventaja sobre los transferidores de energía de resonancia fluorescente (FRET), como TaqMan y Beacons moleculares, porque aseguran que la fluorescencia específica sea detectada sólo en presencia del producto amplificado. Los primers están marcados con un fluoróforo reportero, que emite fluorescencia únicamente cuando se une a la secuencia diana. ⁽⁴⁷⁾



VI.9.1.2.2.1 LUX

Emplean dos primers, uno en forma de horquilla con un reportero fluorescente unido en el extremo 3'. Aquí el reportero está apagado por la estructura secundaria de la horquilla, durante la amplificación el primer LUX es incorporado dentro del producto y el reportero emite fluorescencia. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1.2.2.2 Amplifluor

Emplean dos primers específicos y un primer universal llamado Uniprimer. Uno de los primers específicos contiene una secuencia en la terminal 5' llamada secuencia-z, que también se encuentra en el extremo 3' del Uniprimer. El Uniprimer forma una estructura de horquilla. Un reportero fluorescente y un apagador se unen a los extremos 5' y 3' en la estructura del tallo, respectivamente. En la conformación de la horquilla, el reportero de fluorescencia se apaga debido a su proximidad con el apagador. Durante el primer ciclo de amplificación, uno de los primers específicos (con la secuencia-z) se hibrida con la secuencia diana y se extiende. Durante el segundo ciclo de la amplificación, el segundo primer específico es utilizado para sintetizar la secuencia diana que contiene una secuencia complementaria para la secuencia-z. El producto de la segunda amplificación puede servir como molde para el Uniprimer. En el tercer ciclo de amplificación, el Uniprimer se extiende y sirve como molde para el próximo ciclo de amplificación. En el cuarto ciclo de la amplificación, la extensión del amplicon a través de la región de la horquilla del Uniprimer hace que este se abra y adopte una configuración lineal que permite que el reportero emita fluorescencia. La amplificación exponencial utilizando un segundo primer específico Uniprimer sucede en los ciclos de las amplificaciones posteriores. La señal de la fluorescencia es proporcional al producto amplificado. ⁽⁴⁷⁾



VI.9.1.2.2.3 BD QZyme

Emplean un primers específico zymogen, un primers específico reverso y un sustrato de oligonucleótido universal. El oligonucleótido contiene un reportero fluorescente en el extremo 5´ y un apagador en el extremo 3´. Cuando el sustrato de oligonucleótido está intacto, la fluorescencia del reportero es apagada por el apagador debido a su proximidad. El primer zymogen contiene una secuencia que codifica un ADN catalítico. Durante el primer ciclo de amplificación, el primer zymogen se extiende. En el segundo ciclo, el producto del primer ciclo es utilizado como molde por el primer específico reverso que se extiende para crear una secuencia nueva que contiene una región ADN catalítica. ⁽⁴⁷⁾

En la siguiente etapa de hibridación, el sustrato de oligonucleótido marcado fluorescentemente hibrida la secuencia de ADN catalítico y se separa. Esta división separa al reportero del apagador resultando en una señal fluorescente que es proporcional al producto amplificado. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1.2.3 Sondas fluorescentes

Son sondas de hibridación que emplean una sonda con secuencia específica de oligonucleótidos y dos secuencias de primers específicas. La sonda está diseñada para que se una a las secuencia diana. La sonda lleva un colorante donador en su extremo 5´ y un colorante aceptor en su extremo 3´ (apagador). El donante y el receptor de los fluoróforos se seleccionan de manera que el espectro de emisión del fluoróforo donador se traslape de forma significativa con el espectro de excitación del fluoróforo receptor, mientras que el espectro de emisión del fluoróforo del donante es espectralmente separado del espectro de emisión del fluoróforo aceptor. La excitación se realiza en una longitud de onda específica para el fluoróforo del donante, y la reacción se controla con la emisión de longitud de onda del fluoróforo aceptor. Durante la etapa de hibridación del PCR en tiempo real, las sondas se hibridan con sus secuencias dianas. ⁽⁴⁷⁾



VI.9.1.2.3.1 TaqMan

Emplean una secuencia específica, sondas de oligonucleótidos marcadas fluorescentemente llamadas sondas TaqMan, agregadas a la secuencia específica del primer. También conocidos como ensayos nucleasa-5', el ensayo TaqMan utiliza la actividad de la exonucleasas 5' de ciertas polimerasas termoestables, como la Taq. La sonda contiene un reportero fluorescente unido al extremo 5' y un apagador unido al extremo 3'. Cuando se juntan la fluorescencia del reportero es apagada debido a la proximidad con el apagador. ⁽⁴⁷⁾

Durante los pasos de hibridación y extensión de la reacción de amplificación, la sonda hibrida la secuencia y la actividad de la exonucleasa 5' → 3' de la Taq específica del ADNds separa al reportero. Como resultado, el reportero es separado de su apagador, y la señal de fluorescencia resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra. La ventaja más importante de utilizar las sondas TaqMan incluye la alta especificidad y la habilidad de llevar a cabo reacciones de multiplex. La desventaja es que el costo inicial de las sondas es alto y el diseño del ensayo son pocos triviales. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.1.2.3.2 Beacons moleculares

Emplea un par de primers específicos y una sonda que contiene una secuencia específica que reconoce la secuencia diana, en el extremo 5' de la sonda está el fluoróforo y en extremo 3' el apagador. En ambos extremos de la sonda hay secuencias complementarias (5 nt) que al unirse forman un horquilla, que mantiene apagada la fluorescencia. Cuando la sonda encuentra su secuencia diana la horquilla se abre y el reportero al separarse del apagador flúorese. La secuencia diana del Beacon está diseñado para hibridar específicamente la sección de 15 – 30 nt de la secuencia blanco. ⁽⁴⁷⁾

A diferencia de los ensayos TaqMan, las moléculas Beacons son desplazadas pero no destruidas durante la amplificación, ya que la ADN polimerasa carece de la actividad de la exonucleasa 5'. La cantidad de fluorescencia emitida por el reportero



en el ensayo Beacons es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la reacción. (47)

El Beacons molecular tiene algunas ventajas sobre otras químicas de detección. Estos son muy específicos y se pueden utilizar para las reacciones de multiplex y si la secuencia blanco no coincide exactamente con la secuencia Beacons la hibridación y la fluorescencia no ocurrirán. La principal desventaja del uso de esta química radica en el diseño de los tallos de la horquilla que deben ser lo suficientemente fuerte para que la molécula no se pliegue de forma espontánea en conformaciones no deseadas. Al mismo tiempo el tallo de la horquilla no debe ser demasiado fuerte, ó el Beacons no puede hibridar adecuadamente la secuencia blanco. (47)

VI.9.1.2.3.3 Escorpión

Emplean dos primers específicos, uno de los cuales sirven como una sonda y contiene una estructura de tallo-lazo con un reportero en el extremo 5' y un apagador en el extremo 3'. La secuencia de la sonda Escorpión es complementaria a una parte interna de la secuencia diana en la misma cadena. Durante el primer ciclo de amplificación, el primer Escorpión se extiende y la secuencia complementaria al lazo es generada en la misma cadena. (47)

La sonda Escorpión contiene un bloqueador de PCR en el apagador del extremo 3' para evitar la lectura durante la extensión a través de la cadena opuesta. Después de la desnaturalización e hibridación posterior, el lazo de la sonda Escorpión hibrida a la secuencia diana mediante una interacción intramolecular y el reportero se separa del apagador. La señal fluorescente es proporcional al producto amplificado de la muestra. (47)

VI.9.1.2.3.4 Eclipse

Emplean dos primers y una sonda de secuencia específica de oligonucleótidos. La sonda se une a una secuencia complementaria dentro de la amplificación y contiene un reportero fluorescente en el extremo 3', un apagador en su extremo 5', y un



surco menor unido (MGB). La sonda no hibridada adopta una conformación que permite que el reportero y apagador juntos, mantengan apagado al reportero. (47)

Durante la etapa de hibridación del PCR en tiempo real, la sonda se hibrida con la secuencia diana con la ayuda del MGB (Figura 9). La sonda se desdobra linealmente, separando el reportero y apagador permitiendo que el reportero emita fluorescencia. La señal fluorescente es proporcional a la cantidad de producto amplificado. (47)

VI.9.1.2.4 Moléculas fluorescentes utilizadas en PCR en tiempo real

Las moléculas fluorescentes (fluoróforo) absorben luz en forma de fotones en un rango estrecho de longitud de onda. La longitud de onda máxima de absorción es también llamada longitud de onda de excitación. Después de la excitación, la molécula alcanza un estado de energía más alto, este estado de energía es transitorio y de corta duración. La molécula excitada decae rápidamente, volviendo a su estado basal de energía. Cuando esto ocurre, un fotón de luz es emitido en una longitud de onda mayor. La luz que se libera es la longitud de onda de emisión. Este cambio entre las longitudes de ondas de excitación y de emisión se denomina “shift Stoke” (cambio de Stoke). Para cada fluoróforo hay una longitud de onda óptima de excitación y de emisión. Las moléculas fluorescentes con “cambios de Stoke” mayores son las más convenientes ya que permiten la separación más limpia de longitud de onda de excitación y de emisión de la luz. (47)

Un requisito fundamental para cualquier ensayo fluorescente es que la intensidad de la señal inicial y final tengan diferencias tan grandes como sea posible. Esto se llama el ensayo “delta”. Todos los ensayos fluorescentes para el PCR en tiempo real logran este “delta” mediante la utilización de FRET (transferidores de energía de resonancia fluorescente). Los FRET requieren de dos moléculas que pueden interactuar entre sí, por lo menos uno de los cuales puede ser capaz producir fluorescencia. El componente fluorescente se llama donante y la segunda molécula se llama aceptor. Durante el FRET, el colorante fluorescente donante es excitado por una fuente de energía externa de luz en ó cerca de su longitud de onda de



excitación óptima y entonces emite una luz en un cambio mayor de longitud de onda (“cambio de Stoke”). (47)

En lugar de ser detectado por el instrumento, la luz emitida se utiliza para excitar a la molécula aceptora, que está en estrecha proximidad física. La molécula aceptora absorbe la energía de luz emitida por el donante fluorescente, apagando eficientemente la señal del donador. (47)

La longitud de onda emitida por la molécula donante debe estar cerca del máximo de absorción de la molécula aceptora. La molécula aceptora puede o no emitir luz. Si la luz es emitida por el aceptor, el cambio será mayor así como la longitud de onda, que aquella emitida por el donante. La señal del aceptor será detectada por el instrumento en tiempo real, pero no se registrará como una señal de reportero por el software. Los FRET dependen de que las moléculas del donante y del aceptor estén muy cerca (10 – 100 Å) y disminuye con el aumento de la distancia. Algunos de los donantes y colorantes aceptores (reportero y apagador) más habituales que se utilizan actualmente en el PCR en tiempo real. (47)

Hay tres clases de fluoróforos utilizados en el PCR en tiempo real. Los tres tipos se definen por su función dentro de un ensayo. Los primeros son fluoróforos donantes, también llamados reporteros. La señal fluorescente del reportero es el que se controla durante el transcurso del experimento (ejemplo FAM). Los segundos son fluoróforos receptores o extintores y son los responsables de la extinción inicial de la señal de reportero (ejemplo BHQ). El último es el fluoróforo de referencia, el cual es común en todas las reacciones, no interactúa con los componentes del ensayo y se utiliza para normalizar la señal de cada pocillo en el software (ROX). (47)

En teoría cualquier colorante fluorescente puede ser un reportero en un ensayo. El que se utiliza con mayor frecuencia es FAM (6-carboxi fluoresceína). Este colorante es eficiente para excitar a 448 nm, la longitud de onda producida por el láser argón-ion utilizado en los instrumentos de ABI (Applied Biosystems Inc.). FAM se ha mantenido como la primera opción para otros instrumentos ya que puede ser fácilmente conjugado con oligonucleótidos y da una fuerte señal. Otro reportero,



utilizado hoy en día es SYBR Green I. A diferencia de FAM, SYBR Green I es un colorante libre en el PCR en tiempo real y trabaja proporcionando un dramático aumento en la fluorescencia cuando se une al ADNds. ⁽⁴⁷⁾

Las moléculas extintores pueden ser fluoróforos o cualquier molécula que pueda absorber la energía de luz dentro del rango de longitud de onda apropiada. El fluoróforo apagador original utilizado con el reportero FAM fue TAMRA (6-carboxi-tetrametilrodamina). Cuando se acoplan los extremos de un oligonucleótido (Beacons), la señal del FAM se apaga con eficiencia por la proximidad de TAMRA, debido al plegamiento oligo, en solución. También hay fluoróforos apagadores conocidos como “hoyos negros” (BHQ: Black Hole Quencher), los cuales apagan la señal del reportero y no emiten luz. Desde hace tiempo se sabe que la fluoresceína de FAM se extingue con residuos de guanidina, este fenómeno es el principio del funcionamiento del sistema LUX (Invitrogen), y también es la explicación porque las sondas con reporteros fluorescentes nunca deben comenzar con residuos de guanidina. ⁽⁴⁷⁾

VI.9.2 Ensayo de PCR convencional

La reacción en cadena de la polimerasa con las que se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, su copiado se logra de forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtiene en cuestión de horas, millones de copias de secuencias deseadas del ADN. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora, y las enzimas que inicien y continúen la replicación. ⁽⁴⁸⁾



La reacción en cadena de la polimerasa se realiza en tres pasos. El primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a altas temperaturas que pueden ser próximas a la ebullición. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementariedad. A continuación, se baja la temperatura para conseguir que cada cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN. El último paso consiste en la regeneración de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa. Cada una de las moléculas de ADN hijas puede volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias. Así tras 20 ciclos de reacción se puede obtener hasta 1 millón de copias de una molécula de ADN. ⁽⁴⁸⁾

VI.9.3 Ensayos inmunoenzimáticos

Para la detección de antígenos rotavirus en muestras clínicas, los ensayos rápidos (por ejemplo, ELISA) ofrecen una alternativa atractiva a los ensayos de detección molecular exigentes y costosos. Sin embargo, el desarrollo de una serie de reactivos ELISA para rotavirus ha sido probado debido al número de cepas antigénicamente distintas de rotavirus y a la alta carga viral requerida para una señal positiva por este ensayo. La técnica ELISA utiliza anticuerpos que se unen covalentemente a las enzimas de este modo se conservan las propiedades catalíticas de las enzimas y la especificidad de anticuerpos. Se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos marcados por una enzima. La reacción antígeno-anticuerpo queda inmovilizada y por lo tanto fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar con la enzima produce un color observable a simple vista y cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.⁽⁴⁹⁾

Esta técnica es muy utilizada tanto en países desarrollados como en países en vía de desarrollo gracias a su alta sensibilidad, especificidad, facilidad de manejo y a su relativo costo y vida útil. ⁽⁴⁸⁾



VI.9.4 Microscopia electrónica

Los agentes víricos son fácilmente detectados por microscopia electrónica (ME) cuando se encuentran en elevadas concentraciones en las heces, lo que con frecuencia ocurre en las personas infectadas que presentan sintomatología, aunque se estima que se requiere del orden de 10^6 partículas víricas por gramo de muestra para poder ser observadas.⁽⁵⁰⁾

La inmunomicroscopia electrónica, utilizando antisueros o anticuerpos monoclonales, incrementa la sensibilidad de la microscopia electrónica y además sirve para demostrar la agregación de partículas víricas por los anticuerpos específicos, una de las observaciones consideraciones demostrativas del papel patógeno de los distintos virus.⁽⁴⁹⁾

La gran ventaja de la microscopia electrónica respecto a otras técnicas diagnósticas es que permite encontrar cualquier virus, sin que el procedimiento limite la identidad del agente detectado, como sucede con las técnicas inmunológicas y moleculares.⁽⁴⁹⁾



VI.10 Vacunas contra rotavirus

Existen dos vacunas contra rotavirus licenciada y disponibles *Rotarix* (monovalente) humana G1P1(8) y *Rotateq* (pentavalente) asociada humano - bovina G1, G2, G3, G4 y P1(8). ⁽⁵⁰⁾

Ambas son vacunas a virus vivos y atenuados, con formulación líquida para su administración por vía oral. ⁽⁵⁰⁾

Las dos se encuentran disponibles y demostraron ser seguras y eficaces en la prevención de gastroenteritis por rotavirus de cualquier intensidad, así como en la disminución de la gastroenteritis grave y las tasas de hospitalización por esta causa. ⁽⁵⁰⁾

VI.10.1 Composición y características

La vacuna monovalente contra rotavirus es una vacuna de origen humano. Cada dosis de vacuna contiene rotavirus vivo y atenuado propagado en células vero (cepa RIX4414) no menos de 10^6 CCID. Está preparada con el serotipo G1P1A(8) y numerosos antígenos que, según se ha demostrado, otorga protección cruzada contra los serotipos G1P8, G2P4, G3P8, G4P8 Y G9P8. Indicada para la prevención de gastroenteritis causada por serotipos de rotavirus de tipo G1 y no G1. ⁽⁵¹⁾

Tiene replicación intestinal, y entre el 15 y el 50% de los niños vacunados elimina el virus por materia fecal; la excreción es menor después de la segunda dosis. ⁽⁵⁰⁾

La inmunidad al rotavirus es incompleta, la transmisión de las cepas del virus de la vacuna de los niños vacunados a los contactos no vacunados alberga el potencial para la inmunidad familiar, pero también el riesgo de enfermedad derivada de la vacuna en los contactos inmunocomprometidos. ⁽⁵⁰⁾

Una revisión de los estudios previos a la vacuna contra rotavirus muestra que el desprendimiento y la transmisión viral fueron mayores con la vacuna antirretroviral de rotavirus tetravalente que con la vacuna monovalente rotavirus humana atenuada y la vacuna recombinante bovino-humano pentavalente. ⁽⁵⁰⁾



Se debe aconsejar a los contactos inmunocomprometidos que eviten el contacto con las heces del niño inmunizado si es posible, particularmente después de la primera dosis de vacuna durante al menos 14 días. Dado que el riesgo de transmisión de la vacuna y la consiguiente enfermedad derivada de la vacuna con las vacunas actuales es mucho menor que el riesgo de la enfermedad por rotavirus de tipo salvaje en los contactos inmunocomprometidos debe fomentarse la vacunación. ⁽⁵⁰⁾



VII. Diseño metodológico

➤ Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo descriptivo correlacional.

➤ Área de estudio

El estudio se realizó en el centro de salud Perla María Norori, el cual abarca el sector sur de la ciudad de León, y dicho puesto atiende una población de más 17,000 personas procedentes de los barrios de Guadalupe, Laborío, San Sebastián, El Sagrario, Santa Clara, El Chiriquí, Bella Vista, Las Chácaras, Carlos Fonseca, Las Brisas, entre otros.

➤ Población de estudio

Niños menores de dos años.

➤ Muestreo

Se realizó un muestreo por conveniencia, ya que se captó un total de 100 niños que presentaron diarrea.

Esta investigación es parte del proyecto SAGE (Investigadores principales: Dra. Sylvia Becker-Dreps y Dr. Filemón Bucardo), una cohorte cerrada que tiene enrolados 440 niños para el estudio de la gastroenteritis por Sapovirus durante los primeros 5 años de vida.

➤ Recolección de la muestra

Se recolectaron muestras de heces de niños que presentaron diarrea durante el tiempo de estudio del proyecto SAGE del departamento de Microbiología de la UNAN-LEÓN.

Se recolectaron muestras de saliva y sangre determinando el factor histosanguíneo secretor para la molécula Lewis y el sistema ABO.



➤ **Recolección de información**

Se obtuvo información sociodemográfica a través una base de datos del proyecto SAGE, utilizando variables como sexo, edad, y fecha de recolección de la muestra.

➤ **Recolección y almacenamiento de las muestras**

- Las muestras fueron recolectadas por enfermeras debidamente capacitadas y fueron trasladadas al departamento de Microbiología, posteriormente se prepararon alícuotas de las muestras de heces y se hicieron diluciones de la misma 1/10. Estas se almacenaron a -20°C hasta su análisis.
- Las muestras de saliva se pipetearon de la boca del bebe (aproximadamente 200 ul), y se colocaron en un criovial estéril. Estas serán guardadas a -20°C hasta su posterior análisis.
- Para las muestras de sangre se tomaron 2 ml de sangre venosa en un tubo con EDTA, y se realizó el examen de tipo y Rh una vez que llegó al laboratorio de Microbiología.

➤ **Procesamiento de muestras**

Estado de secretor

• **Fenotipo de Lewis**

Se recubrieron brevemente placas de ELISA (Greiner Bio-One) con saliva, se diluirón 1: 5000 en tampón de recubrimiento (0,1 M de tampón de carbonato-bicarbonato, pH 9,6); Las placas se incubaron durante 1,5 h a 37°C, seguido de 4°C durante la noche. Al día siguiente, la placa se incubó durante 1.5 horas a 37°C con anticuerpos alfa-Lea (Seraclone, LE1 clon 78FR 2.3) y alfa-Leb (clones de Seraclone LE2 LM129-181 y 96FR2.10) (Biotest AG, Dreieich, Alemania). Los anticuerpos se diluirón 1: 5000 en solución salina tamponada con BSA 5% (Invitrogen AB, Lidingo, Suecia) y Tween 20 al 0,05% (Sigma-Aldrich). Después de 4 lavados, se agregó el conjugado HRP de cabra conjugado anti-IgG de ratón



(cadena ligera más pesada) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.), diluido 1: 10000.

- **Detección del Fenotipo Secretor en saliva.**

Las placas de ELISA se sensibilizaron con 100 ul de saliva diluida 1:5000 en PBS e incubaron a 4°C durante la noche, en cámara húmeda. Las placas se lavaron dos veces con PBS-Tween20 al 0.05% y se bloquearon con PBS-BSA al 3% durante 1 hora a 37°C, en cámara húmeda. Después de 2 lavados con PBS-Tween20 al 0.5%, se agregaron 100 uL de lectin peroxidasa SIGMA-28146-IMG diluido 1:400 en PBS-BSA 3% y se incubaron durante 1.5 horas a 37°C. Después de 4 lavados se agregaron 100 uL del sustrato de TMB y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción enzimática se detuvo con ácido sulfúrico 2N. Se obtuvieron lecturas de absorbancia a 450 nm con un filtro diferencial de 630 nm. Se usó PBS para controlar el fondo y se agregaron controles positivos y negativos.

- **Tipificación sanguínea ABO**

Para determinar los antígenos ABO se usó una prueba de hemaglutinación (Cypress Diagnostics, Bélgica). En resumen, se mezclaron tres gotas de sangre con anticuerpos anti-A, anti-B y anti-AB respectivamente. El tipo de sangre ABO se asignó según el examen visual de la hemaglutinación con un anticuerpo dado.

Muestras de heces

- **Extracción del ARN viral en heces**

Para realización de la extracción del ARN viral, la suspensión de heces (1:10) se descongeló a 4°C y se centrifugó a 5000 rpm por 3 minutos. Se tomaron 200 ul del sobrenadante, y el ARN viral se extrajo y purificó con el kit QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN) siguiendo las especificaciones del fabricante. Un total de 60 ul de ARN aislado será obtenido y guardado a -20°C hasta su posterior análisis (**Ver Anexo 1**).



Prueba de PCR en tiempo real para rotavirus

- **Ensayos de PCR en tiempo real para detección de rotavirus.**

Los cebadores y sondas basados en el gen NSP3 descrito por Freeman y colaboradores (19). Se utilizó para la detección del rotavirus. En resumen, se agregaron 5 ul de ARN a una mezcla de reacción que consiste en 12.5 ul de una mezcla de sonda de tampón 2X RT-PCR (Ag Path-ID™ one step RT-PCR Kit), 1 ul de cada NVP3-FDeg y NVP3-R primers, y 1 ul de NPV3-Probe, 1.67ul de Detection Enhancer, 3.75 de agua libre de ARNasa, hasta el volumen final de 25 ul. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en una placa de reacción de 96 pocillos utilizando el LightCycler@96 Roche. El PCR se realizó en las siguientes condiciones: 45°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 60°C durante 60 s. Un valor de umbral de ciclo (Ct) < 36 se considerará rotavirus positivo.

(Ver Anexo 3)

Se seguirá el siguiente esquema.

Componentes	Vol
2X RT-PCR Buffer	12.5 uL
Primer/Probe NSP3 Forward and reverse	1 uL
Detection Enhancer	1.67 uL
25X RT-PCR Buffer	1 uL
Nuclease free water	3.75 uL
Total	20 uL

- **Generación de la curva estándar**

La curva estándar se realizó utilizando una serie de siete diluciones 1:10 a partir de una solución estándar que contiene 0.5×10^8 plásmidos/ul de NSP3. El rango dinámico de cada una de estas series fue de 10^7 a 10^1 . Se colocaron 5 ul de cada estándar en una reacción de PCR en tiempo real, cuyo volumen final fue de 25 ul, como se describió anteriormente. Una vez que se obtuvo las lecturas de intensidad de fluorescencia (ARN) de cada uno de los estándares de la serie, se realizó un



análisis de regresión lineal simple y se determinará el valor de la pendiente y el coeficiente de correlación (R^2). Estos parámetros permiten determinar la eficiencia, reproducibilidad y rango dinámico de detección del método de PCR en tiempo real basado en LightCycler@96. **(Ver Anexo 2)**

➤ **Análisis estadísticos**

Los análisis de la curva estándar se obtuvieron mediante un modelo de regresión lineal utilizando un software HID Real-time PCR analysis v 1.1 para B-lightCycler@96. Se utilizó el programa estadístico SPSS (Statistical Program for Social Science. Inc. Chicago, IL) versión 17. También se presentaron tablas de frecuencias y porcentajes, además se realizó cruces de variables.



VIII. Resultados

Características de la población de estudio. La media de la edad de los niños fue de 2.5 meses con un rango dentro de 6 días a 1 año de edad. Los niños procedían de los 16 diferentes puestos de salud que componen el sector del Perla María Norori de la ciudad de León. El 51% de los niños procedían de León sur/este que corresponden a los puestos Antenor Sandino (33%) seguido por Rubén Darío (21%) y el menor número de niños procedieron de Villa 23 de Julio, Vigíl, Fundecí, Carlos Fonseca, Brisas Acosasco, Benito Mauricio Lacayo (0.8%) sitios céntricos de la ciudad de León. El 51% de los niños son masculinos, el 77% son lactantes y el 13% de los niños evaluados presento una infección por rotavirus.

Detección de rotavirus. De 100 niños en estudio, 13 (13%) presentaron diarrea por rotavirus, las características clínicas observadas de los niños al momento de su captación fueron 17% presentaron vómitos, 19% fiebre y el 6% estaban deshidratados. La mayoría (7/13) de los rotavirus-positivos había completado el esquema de vacunación contra el rotavirus y el resto tenía un esquema incompleto.

Ver tabla 1



Tabla 1. Características Sociodemográficas y clínicas de los niños en estudio

Rotavirus	Positivo 13 (13%)	Negativo 87 (87%)
Edad	\bar{x} = 2.5 m (1 mes – 5 meses). 0-1m : 2 2-4m: 11	\bar{x} = 6 m (0 meses – 1 año).
Sexo		
Masculino	7 (54%)	44 (51%)
Femenino	6 (46%)	43 (49%)
Procedencia		
Antenor Sandino	5 (37%)	28 (35%)
Calvario	2 (15%)	9 (10%)
Arrocera	1 (8%)	1 (1%)
Benito Mauricio	0 (0%)	1 (1%)
Brisas Acosasco	0 (0%)	1 (1%)
Carlos Fonseca	0 (0%)	1 (1%)
Guadalupe	1 (8%)	7 (8%)
Fundecí	0 (0%)	1 (1%)
Laborío	1 (8%)	3 (3%)
Mercede V	0 (0%)	1 (1%)
Rubén Darío	1 (8%)	20 (25%)
Salomón de la Selva	1 (8%)	0 (0%)
Santa Ana	0 (0%)	9 (10%)
Vigil	1 (8%)	0 (0%)
Villa 23 de Julio	0 (0%)	1 (1%)
Walter Ferreti	0 (0%)	3 (3%)
Vomito		
Si	1 (8%)	15 (17%)
No	12 (92%)	72 (83%)
Fiebre		
Si	4 (31%)	15 (17%)
No	9 (69%)	72 (83%)
Deshidratación		
Si	2 (15%)	4 (5%)
No	11 (85%)	83 (95%)
Lactante		
Si	10 (77%)	67 (77%)
No	3 (23%)	20 (23%)
Vacunación		
Si	7 (54%)	83 (95%)
No	6 (46%)	4 (5%)



Distribución fenotípica de Lewis, Secretor y ABO. Al realizar la determinación de histogrupos sanguíneos, se reportó que un 10% de estos niños fueron Lewis A, 76% Lewis B, y 14% Lewis negativo. De los cuales 90% fueron Secretores positivos y 10% Secretores negativos. Dentro del sistema ABO obtuvimos que un 25% son tipo sanguíneo A, 9% fueron B, 63% fueron O y no se reportó ningún AB. Al determinar el Rh de cada niño en estudio se obtuvo un 95% Rh positivo y 2% un Rh negativo. **Ver tabla 2**

Se observó mayor número de caso positivos para rotavirus en niños Lewis B 12/13 (92%) en comparación al Lewis A 1/13 (8%) y Lewis-negativo 0/13 (0%) con la misma tendencia para el Secretor positivo 12/13 (92%) y tipo sanguíneo O 9/12 (63%) respectivamente.

Tabla 2. Distribución de los fenotipos histosanguíneos en la población de estudio.

HBGAs	Rotavirus		Total
	Positivo 13 (13%)	Negativo 87 (87%)	
Lewis			
Lewis A	1 (8%)	9 (10%)	10 (10%)
Lewis B	12 (92%)	64 (74%)	76 (76%)
Lewis -	0 (0%)	14 (16%)	14 (14%)
			100 (100%)
Secretor			
Secretor +	12 (92%)	78 (90%)	90 (90%)
Secretor -	1 (8%)	9 (10%)	10 (10%)
			100 (100%)
*ABO			
A	3 (25%)	22 (26%)	25 (25%)
B	0 (0.0%)	9 (10%)	9 (9%)
AB	0 (0.0%)	0 (0%)	0 (0%)
O	9 (75%)	54 (64%)	63 (63%)
			97 (97%)
*Rh			
Positivo	12 (100%)	83 (98%)	95 (95%)
Negativo	0 (0%)	2 (2%)	2 (2%)
			97 (97%)

***Nota:** Tres niños no evaluados para el antígeno ABO y Rh.



Curva estándar y amplificación. Construcción de la curva de calibración utilizando una solución estándar de plásmidos/ul de NSP3 conocida. La figura 1, muestra la curva de calibración y amplificación. En la parte inferior se muestra la ecuación de la recta arrojada por el programa: $Y = 40.374 + -2.985$, $R^2 = 0.983$ E= 116.3%: donde el eje “X” corresponde a distintas diluciones de concentraciones conocidas del plásmido control NSP3 y el eje “y” corresponde al menor ciclo en el cual cada dilución supera el valor umbral de fluorescencia o “Ct”. **Ver figura 1.**

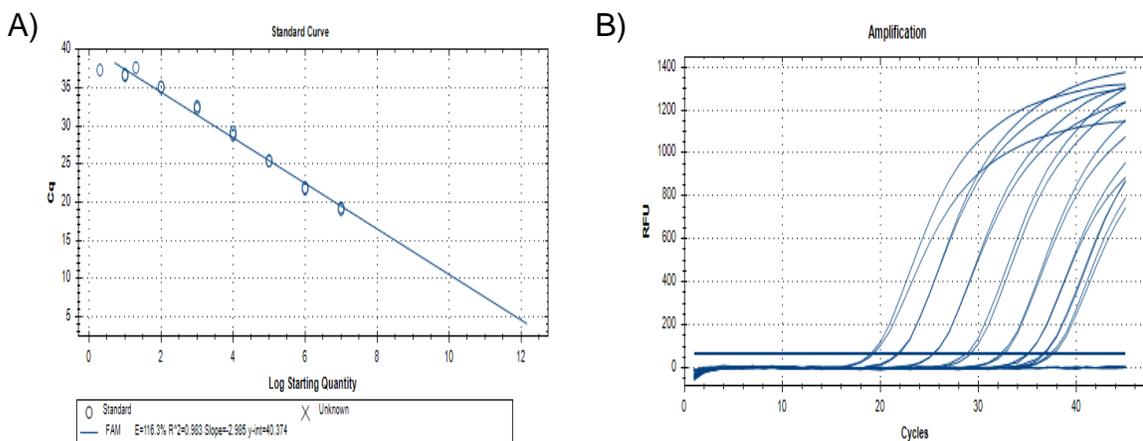


Figura 1. A) Izquierda. Curva de calibración donde se muestra en la parte inferior la ecuación de la recta arrojada por el programa: $Y = 40.374 + -2.985$, $R^2 = 0.983$ E= 116.3%: donde “X” corresponde a la carga viral e “Y” al valor de Ct. **B)** Derecha: Curva de amplificación de cada dilución de concentraciones conocidas. Para determinar la carga viral en los niños rotavirus positivos se cuantificó mediante PCR en tiempo real. Al calcular la media geométrica de la carga viral de los 13 niños positivos se obtuvo un resultado de 5×10^7 copias/gr.heces dentro de un rango 90×10^{10} a 20×10^1 copias/gr.heces.



Correlación de los factores genéticos y carga viral. Al asociar factores genéticos en este estudio (fenotipo Lewis, Secretor y ABO) con la cuantificación viral, de los 13 niños positivos para rotavirus, los que presentan Lewis B tuvieron una cuantificación más alta $\dot{x} = 50 \times 10^7$ copias/gr heces en comparación al Lewis A y Lewis negativo. En el fenotipo secretor la mayor cuantificación viral estuvo presente en los secretores positivos $\dot{x} = 50 \times 10^7$ copias/gr heces y el sistema ABO la mayor cuantificación viral fue del grupo O con $\dot{x} = 50 \times 10^5$ copias/gr heces (**Ver tabla 4**).

Tabla 4. Asociación de antígenos histosanguíneos y cuantificación viral.

Fenotipos	Frecuencia 13 (100%)	Cuantificación
Lewis		
Lewis A	1 (8%)	$\dot{x} = 59 \times 10^1$ copias/gr.heces
Lewis B	12 (92%)	$\dot{x} = 50 \times 10^7$ copias/gr.heces
Lewis -	0 (0%)	0 (0%)
Secretor		
Secretor +	12 (92%)	$\dot{x} = 50 \times 10^7$ copias/gr.heces
Secretor -	1 (8%)	$\dot{x} = 59 \times 10^1$ copias/gr.heces
*ABO		
A	3 (25%)	$\dot{x} = 10 \times 10^2$ copias/gr.heces
B	0 (0%)	0 (0%)
AB	0 (0%)	0 (0%)
O	9 (75%)	$\dot{x} = 50 \times 10^5$ copias/gr.heces

***Nota:** Un niño rotavirus positivo no evaluado para el antígeno ABO.



IX. Discusión

Este estudio extiende el conocimiento previo del rol de los antígenos histosanguíneos en la infección con rotavirus y muestra tendencias similares a las reportadas en estudios realizados en Francia, Suecia, China, Taiwan, Pakistan, Gana, Malawi, Nueva Zelanda y Nicaragua. Donde se ha reportado que los niños con el fenotipo de Lewis A tienen menor probabilidad de infectarse con los genotipos de rotavirus más comunes como él (P[8]).⁽⁵²⁾

La determinación de rotavirus positivo en este estudio fue del 13%, siendo menor que la reportada por Espinoza F y colaboradores en 2004 donde fue detectada en un 28 – 40%.⁽¹³⁾ La primera razón que puede explicar esta diferencia, es por la implementación de la vacuna contra rotavirus a partir del 2006 la cual redujo el número de casos de infecciones, sin embargo a pesar de esta significativa reducción es importante destacar que la vacuna tiene una efectividad del 58% en Nicaragua, esto supone que el 42% de los niños pueden infectarse por rotavirus. La otra razón es la persistencia de diarrea debido a este patógeno por la circulación de cepas de manera natural. Tal y como indicó el estudio realizado del año 2003 al 2009 por Becker-Dreps S y colaboradores, en el cual se muestra que se redujo en un 50% la carga de la infección por rotavirus en niños menores de 5 años relacionada a su mortalidad, sugiriendo que aún persisten casos de rotavirus independientes de la introducción de la vacuna.⁽⁹⁾

En este estudio observamos claramente 6 infecciones de origen natural producidas por rotavirus ya que estos niños no habían recibido ningún tipo de vacunación al momento de presentar diarrea, lo que evidencia infecciones por rotavirus en niños previo a la vacunación, así como la circulación de cepas naturales. No obstante, existe una proporción de 7 individuos cuya detección de rotavirus fue un mes después de haberse vacunado lo que puede indicar la posibilidad de estar detectando la excreción de la cepa vacunal o bien una infección natural. El estudio de Richardson y colaboradores excreción prolongada de rotavirus después de diarrea severa en niños pequeños, explica que se ha logrado detectar la presencia



de rotavirus en las heces de niños vacunados entre 4 y 57 días después del inicio de la diarrea. Sin embargo hay un estudio de Patel y colaboradores, el cual demostró que la efectividad de la vacuna es de 58% por lo tanto todavía podemos encontrar niños positivos a rotavirus aun hayan recibido la vacuna y más aún en estos niños que solo han recibido una dosis y no han completado su esquema de vacunación.

En nuestra investigación un dato importante es que de los 13 niños rotavirus positivos el 46% de los casos en edades de 0 a 4 meses no habían recibido la vacuna, lo que indica que tenían una infección natural por rotavirus. Se estima que todos los niños se infectarán al menos una vez en los primeros 5 años de vida, desarrollando una inmunidad protectora de por vida independientemente de si son o no vacunados. ^(10,11) Lo que aumenta significativamente el riesgo de sufrir diarrea severa y hospitalización. Este riesgo se ve aumentado en niños (entre 6 y 24 meses).

Se observó que las características clínicas predominantes en los niños rotavirus positivos, fueron vómito (16%), fiebre (18%), 2% deshidratados. Lo que puede estar confirmando la infección natural asociado a un cuadro clínico típico de gastroenteritis y el 77% son lactantes, mientras que el 50% de los niños habían completado su esquema de vacunación. Menor de la reportada en un estudio por Pastora Linares. Estudio clínico epidemiológico de las infecciones por Rotavirus en Niños menores de 5 años con Diarrea Aguda atendidos en las unidades de salud de la ciudad de León Febrero 2000. La razón que puede explicar esta diferencia, es que el 50% de los niños habían completado su esquema de vacunación y esto redujo las características clínicas de la enfermedad.



Las infecciones naturales por rotavirus identificadas en este estudio fueron más prevalentes en niños Lewis B secretor positivo que los otros fenotipos sanguíneos nuestros datos son consistentes con los de Bucardo F y colaboradores donde dice que Lewis A es un factor de restricción para las infecciones por rotavirus. ⁽⁸⁾

Estos niños Lewis B son más susceptibles y replican mejor a los virus intestinales, mientras que el Lewis A no replica la vacuna y la elimina. Aquellos niños que tienen estos fenotipos tienen mayor capacidad replicativa por lo tanto son más susceptibles que los otros grupos sanguíneos.



X. Conclusión

- La media de la edad de los niños fue de 2.5 meses con un rango dentro de 6 días a 2 años de edad. El 51% de los niños procedían de León sur/este. El 51% de los niños son masculinos y el 13% de los niños evaluados presento una infección por rotavirus. Las manifestaciones clínicas más asociadas a la infección por rotavirus fueron 16% presentaron vómitos y 19% fiebre.
- Rotavirus fue encontrado en el 13% de los niños < 2 años de edad la media de la carga viral fue de 5×10^7 copias/gr.heces dentro de un rango 9×10^{10} a 2×10^1 copias/gr.heces.
- Al realizar la determinación de histogrupos sanguíneos, se reportó que un 10% de estos niños fueron Lewis A, 76% Lewis B, y 14% Lewis negativo. De los cuales 90% fueron Secretores positivos y 10% Secretores negativos. Dentro del sistema ABO obtuvimos que un 25% son tipo sanguíneo A, 9% fueron B, 63% fueron O y no se reportó ningún AB. Al determinar el Rh de cada niño en estudio se obtuvo un 95% Rh positivo y 2% un Rh negativo. Se observó mayor número de caso positivos para rotavirus en niños Lewis B 12/13 (92%) en comparación al Lewis A 1/13 (8%) y Lewis-negativo 0/13 (0%) con la misma tendencia para el Secretor positivo 12/13 (92%) y tipo sanguíneo O 9/12 (63%) respectivamente.
- De los 13 niños positivos para rotavirus, las infecciones naturales se presentaron con mayor porcentaje en los Lewis B y secretor positivo con una cuantificación $\bar{x} = 5 \times 10^7$ copias/gr.heces y el sistema ABO con mayor cuantificación viral fue del grupo O con $\bar{x} = 5 \times 10^5$ copias/gr. heces.



XI. Recomendaciones

- Investigar que otros factores predisponen a la infección por rotavirus en niños vacunados.
- Evaluar la excreción viral de rotavirus en niños vacunados y no vacunados.
- Obtener una población de estudio con mayor número de niños con los diferentes fenotipos.



XII. Bibliografía

1. de Oliveira LH, Danovaro-Holliday MC, Andrus JK, de Fillipis AMB, Gentsch J, Matus CR, et al. Sentinel hospital surveillance for rotavirus in Latin American and Caribbean countries. *The Journal of infectious diseases*. 2009;200(Supplement_1):S131-S9.
2. Espinoza F, Paniagua M, Hallander H, Hedlund K, Svensson L. Prevalence and characteristics of severe rotavirus infections in Nicaraguan children. *Annals of tropical paediatrics*. 1997;17(1):25-32.
3. Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Reviews of infectious diseases*. 1991;13(3):448-61.
4. Lundgren O, Svensson L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes and infection*. 2001;3(13):1145-56.
5. Nordgren J, Bucardo F, Svensson L, Lindgren P-E. Novel light-upon-extension real-time PCR assay for simultaneous detection, quantification, and genogrouping of group A rotavirus. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(5):1859-65.
6. Giaquinto C, Van Damme P, Group RS. Age distribution of paediatric rotavirus gastroenteritis cases in Europe: the REVEAL[†] study. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2010;42(2):142-7.
7. Nordgren J, Sharma S, Bucardo F, Nasir W, Günaydin G, Ouermi D, et al. Both Lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Clinical Infectious Diseases*. 2014;59(11):1567-73.
8. Bucardo F, Nordgren J, Reyes Y, Gonzalez F, Sharma S, Svensson L. The Lewis A phenotype is a restriction factor for Rotateq and Rotarix vaccine-take in Nicaraguan children. *Scientific reports*. 2018;8(1):1502.
9. Becker-Dreps S, Paniagua M, Dominik R, Cao H, Shah NK, Morgan DR, et al. Changes in childhood diarrhea incidence in Nicaragua following 3 years of universal infant rotavirus immunization. *The Pediatric infectious disease journal*. 2011;30(3):243.
10. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging infectious diseases*. 2003;9(5):565.
11. Troeger C, Forouzanfar M, Rao PC, Khalil I, Brown A, Reiner Jr RC, et al. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017;17(9):909-48.
12. O'RYAN M, Perez-Schael I, Mamani N, Pena A, Salinas B, Gonzalez G, et al. Rotavirus-associated medical visits and hospitalizations in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals. *The Pediatric infectious disease journal*. 2001;20(7):685-93.
13. Morales Rodríguez AM. Comportamiento clínico y epidemiológico de los pacientes menores de 5 años con enfermedad diarreica aguda causada por rotavirus, ingresados en el Hospital Manuel de Jesús Rivera comprendido en el período de 1º Mayo 2012 a 31 Diciembre 2014: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua; 2015.
14. Espinoza F, Paniagua M, Hallander H, Svensson L, STRANNEGÅRD Ö. Rotavirus infections in young Nicaraguan children. *The Pediatric infectious disease journal*. 1997;16(6):564-71.
15. Barbé L, Le Moullac-Vaidye B, Echasserieau K, Bernardeau K, Carton T, Bovin N, et al. Histo-blood group antigen-binding specificities of human rotaviruses are associated with gastroenteritis but not with in vitro infection. *Scientific reports*. 2018;8(1):12961.
16. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. 2008 estimate of worldwide 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(2):136-41.

17. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3:17083.
18. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1989;53(4):410-49.
19. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in medical virology*. 2005;15(1):29-56.
20. Nabuurs M. Weaning piglets as a model for studying pathophysiology of diarrhea. *Veterinary Quarterly*. 1998;20(sup3):42-5.
21. Ball JM, Tian P, Zeng CQ-Y, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*. 1996;272(5258):101-4.
22. Boshuizen JA, Reimerink JH, Korteland-van Male AM, van Ham VJ, Koopmans MP, Büller HA, et al. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. *Journal of virology*. 2003;77(24):13005-16.
23. Kapikian AZ. Rotaviruses. *Fields virology*. 1996:1657-708.
24. Fukudome K, Yoshie O, Konno T. Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology*. 1989;172(1):196-205.
25. Srnka CA, Tiemeyer M, Gilbert JH, Moreland M, Schweingruber H, de Lappe BW, et al. Cell surface ligands for rotavirus: mouse intestinal glycolipids and synthetic carbohydrate analogs. *Virology*. 1992;190(2):794-805.
26. Helmberger-Jones M, Patton JT. Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. *Virology*. 1986;155(2):655-65.
27. Estes MK, Graham D, Gerba CP, Smith E. Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. *Journal of virology*. 1979;31(3):810-5.
28. Merino Ordoñez EA. Estudio piloto de la actividad oncolítica del rotavirus WTEW en un tumor alogénico: Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá.
29. Estes M. Rotaviruses and their replication. In "Fundamental Virology" (BN Fields, D. Knipe, Howley, et al., Eds.). 1996.
30. Spencer E, Arias ML. In vitro transcription catalyzed by heat-treated human rotavirus. *Journal of virology*. 1981;40(1):1-10.
31. Patton JT, Jones MT, Kalbach AN, He Y-W, Xiaobo J. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *Journal of virology*. 1997;71(12):9618-26.
32. Prasad BV, Rothnagel R, Zeng C-Y, Jakana J, Lawton J, Chiu W, et al. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature*. 1996;382(6590):471.
33. Gallegos CO, Patton JT. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology*. 1989;172(2):616-27.
34. Patton JT. Evidence for equimolar synthesis of double-strand RNA and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *Virus research*. 1990;17(3):199-208.
35. Stacy-Phipps S, Patton JT. Synthesis of plus-and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *Journal of virology*. 1987;61(11):3479-84.
36. Afrikanova I, Fabbretti E, Miozzo MC, Burrone OR. Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *Journal of General Virology*. 1998;79(11):2679-86.



37. Gombold J, Ramig R. Genetics of the rotaviruses. *Current topics in microbiology and immunology*. 1994;185:129-77.
38. Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*. 2006;24(15):2718-31.
39. Desselberger U, Huppertz H-I. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;203(2):188-95.
40. Rojas A, Boher Y, Guntinas M, Pérez-Schael I. Homotypic immune response to primary infection with rotavirus serotype G1. *Journal of medical virology*. 1995;47(4):404-9.
41. Chiba S, Nakata S, Urasawa T, Urasawa S, Yokoyama T, Morita Y, et al. Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *The Lancet*. 1986;328(8504):417-21.
42. Coulson B, Grimwood K, Masendycz P, Lund J, Mermelstein N, Bishop R, et al. Comparison of rotavirus immunoglobulin A coproconversion with other indices of rotavirus infection in a longitudinal study in childhood. *Journal of clinical microbiology*. 1990;28(6):1367-74.
43. Hoshino Y, Sereno MM, Midthun K, Flores J, Kapikian AZ, Chanock RM. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82(24):8701-4.
44. Coulson BS, Grimwood K, Hudson I, Barnes G, Bishop R. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(7):1678-84.
45. Jaimes MC, Rojas OL, González AM, Cajiao I, Charpilienne A, Pothier P, et al. Frequencies of virus-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes secreting gamma interferon after acute natural rotavirus infection in children and adults. *Journal of virology*. 2002;76(10):4741-9.
46. Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME, Fletcher D, Nedrud JG. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(15):6901-5.
47. Dorak MT. *Real-time PCR*: Taylor & Francis; 2007.
48. Ijzerman MM, Dahling DR, Fout GS. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*. 1997;63(1-2):145-53.
49. Dahling DR. Detection and enumeration of enteric viruses in cell culture. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 1991;21(3-4):237-63.
50. Milena EUA, Marcela SCS. COMPLETO DEL TRABAJO: "Detección de rotavirus mediante la. *Microbiology*. 60:3704-10.
51. Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(1):11-22.
52. Sharma S, Hagbom M, Svensson L, Nordgren J. The Impact of Human Genetic Polymorphisms on Rotavirus Susceptibility, Epidemiology, and Vaccine Take. *Viruses*. 2020;12(3):324.



XIII. Anexos

Anexo #1

Extracción de ARN

Kit QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN) siguiendo las especificaciones del fabricante:

- 1- Descongelar las muestras y mantenerlas en hielo.
- 2- Mezclar 140 ul de la muestra con 560 del buffer AVL (previamente mezclado con ARN carrier) en un vial de 1.5 ml estéril.
- 3- Dar vortex por 15 seg e incubar por 10 minutos a T° ambiente.
- 4- Centrifugar brevemente.
- 5- Agregar 560 ul de etanol grado reactivo (96-100%) a la mezcla anterior y de vortex por 15 seg.
- 6- Depositar cuidadosamente 630 ul de la mezcla anterior en una columna contenida en un tubo colector. Centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto.
- 7- Descartar el tubo colector que contiene el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo colector. Agregar el restante de la mezcla y centrifugar a 8,000 rpm por minuto.
- 8- Descartar el tubo colector que contiene el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo colector. Agregar 500 ul de solución de lavado AW1. Centrifugar a 14,000 rpm por 3 minutos.
- 9- Descartar el tubo colector que contiene el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo colector. Agregar 500 ul de solución de lavado AW2. Centrifugar a 14,000 rpm por 3 minutos.
- 10- Colocar la columna en un eppendorf estéril de 1.5 ml, agregar 60 ul del buffer de elución AVE y centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto.
- 11- Descartar la columna y rotular el vial que contiene el ARN.
- 12- Guardar a -20°C hasta su uso.



Anexo #2

Curva estándar

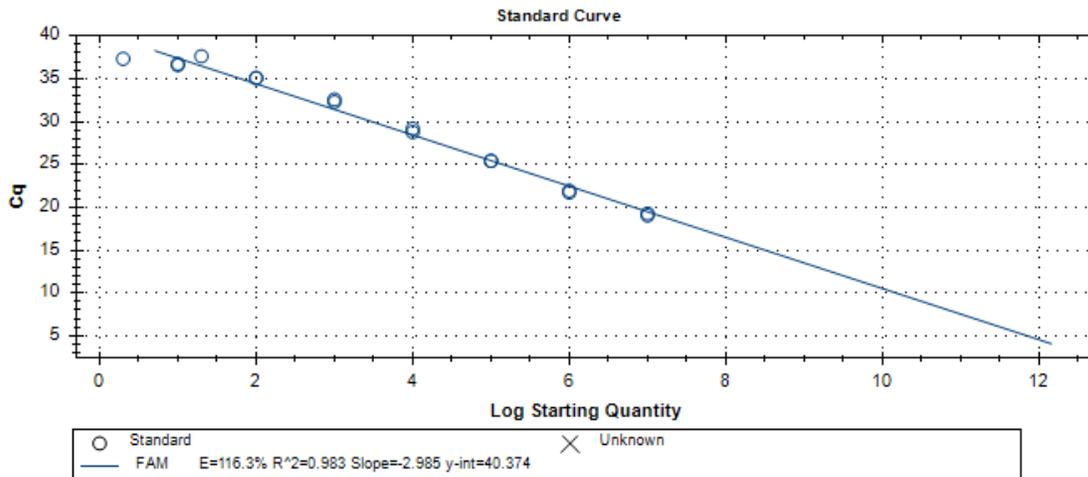


Figura 1. Curva de calibración donde se muestra en la parte inferior la ecuación de la recta arrojada por el programa: $Y = 40.374 - 2.985X$, $R^2 = 0.983$, $E = 116.3\%$: donde “X” corresponde a la carga viral e “Y” al valor de Ct.

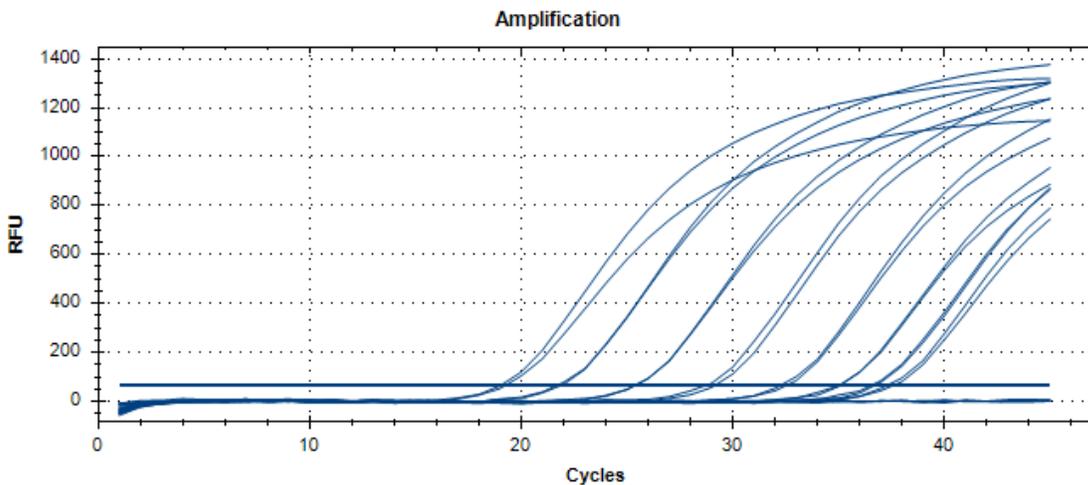


Figura 2. Curva de amplificación de cada dilución de concentraciones conocidas.



Anexo #3

Los cebadores y sondas basadas en el gen NSP3 descrito por Freeman y colaboradoras fueron sintetizados con los siguientes cambios:

- 1- Bases anómalas se introdujeron en el forward primers para dar cuenta de variación de la secuencia en P [4], cepas G2 en esta región, observado en alineamientos de secuencia de rotavirus humano genes NSP3 de la base de datos GenBank.
- 2- El reverse primers fue alargado por cuatro bases en el extremo 3" con el fin de reducir la estabilidad en ese extremo, el tamaño de amplicón esperado de 87 pb se confirmó en un gel de agarosa. La sonda descrita por Freeman fue etiquetado en el extremo 5" con la molécula fluorescente 5-carboxifluoresceína (FAM) y en el extremo 3" con la molécula inhibidora TAMRA. La nueva sonda también fue etiquetada con FAM en el extremo 5", pero TAMRA fue reemplazado por un quencher 1 (BHQ1; Biosearch Technologies Inc., San Francisco, C.A). Otro cambio fue que BHQ1 fue agregado a un residuo T interno en lugar del extremo 3" para disminuir el distancia entre las moléculas fluorescentes y quencher con el fin de prevenir la extensión por la tag polimerasa, se añadió un espaciador de 6 carbonos (1,6 hexanodiol glicina cpg) hasta terminar en el extremo 3". Todos los cebadores y sondas fueron sintetizados y modificado en la Instalación Biotecnológica Básica en el centros para el Control y Prevención de Enfermedades (Atlanta, GEORGIA).

Los cebadores (la concentración final 1,0 mM de cada uno) fueron mezclado con 1 mL de ARN y desnaturalizado en un termociclador (97°C por 5 min) seguido de una incubación de 1 minuto en hielo.

La etapa de desnaturalización fue necesaria para fundir el ARNdc genoma del rotavirus. La RT-PCR mezcla maestra se hizo siguiendo el fabricante protocolo (kit QuantiTect, Qiagen) y 15 ml fue alícuotas en 20 ml de capilares LightCycler refrigerados (Roche Applied Science) antes de añadir 5 ml de ARN desnaturalizado



más primera mezcla capilares fueron centrifugados brevemente antes de ser cargados en Instrumento LightCycler2.0 (Roche Applied Science).

Los productos fueron amplificados y detectados bajo las siguientes condiciones, según lo recomendado por el fabricante:

- 50°C durante 20 min (1 ciclo para transcripción inversa)
- 95°C durante 15 minutos (1 ciclo para la desactivación de enzimas)
- 95°C para <1 seg y 60C durante 60 seg (45 ciclos de amplificación),
- 40°C durante 30 segundos (1 ciclo de enfriamiento).

La fluorescencia era medida después del paso de extensión de cada ciclo de amplificación.