

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEÓN
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS



Monografía para optar al Título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico

Detección de virus gastrointestinales en *Musca domestica* en puestos del Mercado La Terminal de la ciudad de León en el periodo de Junio –Septiembre del 2020

Autor: Br. Luis Eduardo Pozo Valdivia

Tutores: MSc. Yaoska Reyes

Profesor Titular

Departamento de Microbiología y Parasitología.

Facultad de Ciencias Médicas. UNAN-León

MSc. Fredman González

Profesor Asistente

Departamento de Microbiología y Parasitología.

Facultad de Ciencias Médicas. UNAN-León

Dr. Filemón Bucardo

Profesor Titular

Departamento de Microbiología y Parasitología.

Facultad de Ciencias Médicas. UNAN-León

León, Junio 2022

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEÓN
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS



Monografía para optar al título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico

Detección de virus gastrointestinales en *Musca domestica* en puestos del Mercado La Terminal de la ciudad de León en el periodo de Junio –Septiembre del 2020

Autor: Br. Luis Eduardo Pozo Valdivia

Tutores: MSc. Yaoska Reyes

Profesor Titular

Departamento de Microbiología y Parasitología.

Facultad de Ciencias Médicas. UNAN-León

MSc. Fredman González

Profesor Asistente

Departamento de Microbiología y Parasitología.

Facultad de Ciencias Médicas. UNAN-León

Dr. Filemón Bucardo

Profesor Titular

Departamento de Microbiología y Parasitología.

Facultad de Ciencias Médicas. UNAN-León

León, Junio 2022

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”

A mis padres, hermanos y demás familiares.

Mis padres *Pablino Pozo* y *Ana María Valdivia* por su apoyo incondicional, gracias por luchar día a día para que este sueño se hicieran realidad.

*Hacer siempre lo que a uno le gusta y solo eso,
es la fórmula magistral para una vida larga y feliz.*

Gabriel García Márquez

AGRADECIMIENTO

Primeramente, a *Dios* todo poderoso por derramar sabiduría y bendiciones sobre mi familia y los que me rodean. Por la vida que día a día nos permite.

De manera muy especial a mis padres por apoyarme en cada una de mis decisiones y proyectos. Principalmente en el transcurso de mi carrera universitaria.

A mis tutores MSc. Yaoska Reyes, MSc. Fredman González y Dr. Filemón Bucardo, mi más sincero agradecimiento por brindarme su apoyo, conocimiento y su tiempo en el transcurso de este trabajo investigativo.

A la Dra. Sylvia Becker-Dreps de la Universidad de Carolina del Norte por proporcionar las trampas para moscas utilizadas en el estudio.

A todos los dueños de negocio del Mercado La Terminal por participar de manera voluntaria en dicha investigación, por su disposición y tiempo brindado.

Detección de virus gastrointestinales en *Musca domestica* en puestos del Mercado La Terminal de la ciudad de León en el periodo de Junio –Septiembre del 2020

Br. Luis Eduardo Pozo Valdivia, MSc. Yaoska Reyes, MSc. Fredman González, Dr. Filemón Bucardo

Carrera de Bioanálisis Clínico, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas.

RESUMEN

La diarrea es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad y representa la tercera causa de muerte en niños menores de 5 años. Los patógenos virales son unos de los principales causantes de este problema y una de las principales vías de transmisión es mediante alimentos o aguas contaminadas y de persona – persona. El papel de *Musca domestica* en el posible transporte y transmisión de estos agentes virales no ha sido documentado en nuestro país. Se desarrolló un estudio de dos fases, la primera consta de dos ensayos experimentales por separados con la finalidad de evaluar la capacidad de *Musca domestica* en transportar y transmitir los gastrovirus (rotavirus, norovirus, sapovirus y astrovirus). En una segunda fase se realizó un estudio de campo en el Mercado La Terminal de la ciudad de León donde se estudiaron cuatro puestos en dos periodos distintos durante el mes de Junio y Septiembre del año 2020. Se evidenció que rotavirus y norovirus son capaces de ser transportados sobre la superficie de las moscas, sin embargo, la capacidad de esta para transmitir partículas de norovirus entre superficies no fue demostrada. Se colectaron un total de 13 muestras (pooles de moscas) en los dos periodos de muestreo. Cinco fueron positivas para rotavirus (38%) y 3 para norovirus (23%). Rotavirus fue detectado durante los dos periodos de muestreo, sin embargo, norovirus solo en el mes de Junio. Las densidades más altas se presentaron durante el mes de Junio y se encontró que las condiciones higiénicas sanitarias en los puestos muestreados eran deficientes. En conclusión, este es el primer estudio en demostrar que *Musca domestica* es capaz de transportar en su superficie a rotavirus y norovirus *in vitro* e *in vivo*, por lo tanto, este hallazgo repercute en las medidas higiénico-sanitarias que se deben tener al manipular alimentos.

Palabras claves: norovirus, rotavirus, *Musca domestica*, Nicaragua

ÍNDICE

Páginas

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	2
III. JUSTIFICACIÓN	4
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
V. OBJETIVOS.....	6
VI. MARCO TEÓRICO	7
VII. DISEÑO METODOLÓGICO	36
VIII. RESULTADOS	41
IX. DISCUSIÓN.....	47
X. CONCLUSIONES.....	50
XI. RECOMENDACIONES	51
XII. BIBLIOGRAFIA.....	52
XI. ANEXOS.....	57

Índice de abreviaturas

(*E. coli*) *Escherichia coli*

(GEA) Gastroenteritis aguda

(SLP) Partícula de una sola capa

(VP) Proteína viral

(ARN o RNA) Ácido ribonucleico

(dsRNA) Ácido ribonucleico doble hebra

(RdRp) Ácido ribonucleico dependiente de Ácido ribonucleico

(NS) Proteína no estructural

(ARNm) Ácido ribonucleico mensajero

(DLP) Partícula de doble capa

(MAbs) Anticuerpos monoclonales

(ssRNA+) Ácido ribonucleico monocatenario de sentido positivo

(TLP) Partícula de triple capa

($\alpha\beta$) Integrina

(RE) Retículo endoplasmático

(Ca) Calcio

(LC3) Proteína de autofagia

(LD) Gotas lipídicas

(Å) Angstrom

(dsRNA) Ácido ribonucleico bicatenario

(ORF) Marco de lectura abierta

(kDa) Kilo Dalton

(NTPasa) Nucleósido trifosfatasa

(G) Genogrupos

(HBGA) Antígenos de grupo histo-sanguíneo

(HAstV) Astrovirus humano

(CP) Cápside

I. INTRODUCCIÓN

La diarrea de etiología viral es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil en países industrializados así como en desarrollo, representando la tercera causa de muerte en niños menores de 5 años, ^(1,2,3) rotavirus es el principal agente etiológico de diarrea endémica seguido de astrovirus y adenovirus entéricos, ^(3,4) norovirus y sapovirus se presentan de forma epidémica. ⁽³⁾ Se conoce que los virus entéricos son transmitidos principalmente por alimento y aguas contaminadas, mediante el contacto persona-persona, sin embargo, también pueden existir otras rutas de contagio como lo son las vectoriales. ^(1,3)

La *Musca domestica* es uno de los insectos contaminantes más comunes en los asentamientos humanos, conociéndose esta relación como sinantropía, las razones para esta coexistencia en la biocenosis artificial humana son claras: las etapas inmaduras del ciclo de vida del insecto se desarrollan en materia orgánica en proceso de descomposición (basura, heces, carroña o drenajes) y los adultos se alimentan de las mismas fuentes, todas comúnmente presentes en los asentamientos humanos. ^(5,6,7) Se han planteado tres mecanismos de transmisión posible por parte de las moscas, transferencia mecánica del exoesqueleto, por regurgitación y depósitos fecales. ^(6,7,8,9)

Diferentes reportes evidencian de que las moscas actúan como vectores mecánicos de diversos patógenos gastrointestinales principalmente de etiología bacteriana y parasitaria, los agentes patógenos reportados a partir de muestras de moscas son el virus de la polio, virus Coxackie, numerosas bacterias como *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp*, *Listeria sp*, *Shigella sp*, *E. coli*, *Vibrio*; parásitos protozoos como *Giardia lamblia* y *Entamoeba*. Virus causantes de gastroenteritis como rotavirus y norovirus han sido reportados en muestras de moscas, sin embargo, el papel de las moscas en la transmisión de estos aun es incierta dado que en condiciones ambientales esta relación es difícil de comprobar. ^(5,8,10)

Este estudio contribuirá a la comprensión del rol de la *Musca domestica* como vector de agentes causantes de gastroenteritis de etiología viral.

II. ANTECEDENTES

Un estudio piloto realizado por Collinet-Adler y colaboradores, con el objetivo de caracterizar las densidades máscales y los determinantes de la diarrea infecciosa, en una población de 160 casas urbanas y 80 rurales, encontró un 72% de positividad en las muestras de moscas (43/60) para los siguientes patógenos, **rotavirus 6.7%**, *E. coli* 6.7 %, *Salmonella* 46.7% , **norovirus 50%**, 91 episodios de diarrea se registraron, 89 % en menores de 5 años, siendo el 33% (24/77) positivas para los siguientes patógenos, *E. coli*, *Shigella spp*, *Vibrio spp*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*.⁽⁸⁾

Klowden M y Greenberg B mediante un ensayo *in vitro* estudiaron la capacidad de hospedar al virus de la polio y coxsackie virus en líneas celulares de *Drosophila melanogaster* y cultivos primarios de *Musca domestica*. No se logró la infección en la línea celular *Drosophila melanogaster*, sin embargo, en el cultivo de *Musca domestica* el virus de la polio y el virus coxsackie lograron la infección de las células, demostrando una disminución de las cargas virales a los 16 y 14 días respectivamente durante el periodo de ensayo.⁽¹¹⁾

Tan SW y colaboradores estudiaron experimentalmente la eficiencia de las patas de las moscas doméstica en la captación de partículas virales de rotavirus usando diferentes medios líquidos, el número de partículas de virus adquiridas por las moscas varió notablemente independientemente del tipo de medio sobre el que caminaran. La adición de glicerol redujo 5 veces el número promedio de partículas de virus adquiridas por las moscas en comparación con las que caminan sobre un medio clarificado, además la adquisición de virus se vio reforzada por la presencia de heces, la adición de un 15% de heces al medio aumento 5 veces el número de partículas adquiridas y al aumentar 30% de heces se duplico la cantidad de partículas adquiridas. Todas las moscas contaminadas con rotavirus transfirieron el virus a las superficies que estuvieron en contacto, independientemente del tiempo de contacto o la naturaleza de la superficie, 11 moscas analizadas dispersaron más del 95% de partículas de virus durante los primeros 11 segundos del movimiento del vuelo.⁽⁹⁾

Haddow AD y colaboradores mediante un estudio experimental trataron determinar el potencial de transmisión mecánica del virus del Ebola por las moscas (*Musca domestica*), en el estudio se utilizaron moscas descendientes de mosca adultas capturadas y criadas por

métodos de adaptativos creados por *Moon y colaboradores*, se utilizaron monos de la especie *Cynomolgus macaques (Macaca fascicularis)*. Las moscas fueron expuestas a una mezcla de sangre/virus del Ebola en diferentes concentraciones de moderadas a altas, posteriormente se permitió que estas caminaran por la cara de los monos (cercano a los ojos, los labios y la nariz), el estudio concluyo que las condiciones del estudio no fueron las suficientes para iniciar una infección. ⁽¹²⁾

En Nicaragua no se han documentado estudios basados en determinar la capacidad de la *Musca domestica* como vector mecánico de los agentes virales o en la detección de estos agentes en muestras de moscas ambientales.

III. JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia de que la especie *Musca domestica* son portadoras de una gran variedad de patógenos para el hombre, sin embargo, su papel en la transmisión de enfermedades diarreicas, no es claro, esto se debe principalmente a que la estimación del número de microorganismos necesarios para transmisión es difícil de encontrar en condiciones naturales.

La relación causal entre la transmisión de agentes patógenos para el hombre y las moscas se da principalmente por condiciones higiénico-sanitarias deficientes, donde los niveles poblacionales de las moscas se ven mayormente incrementado, lo que lleva como consecuencia una relación más estrecha entre el hombre y las moscas.

Por esta razón se pretende estudiar el papel que juegan las moscas muestreadas de puestos de alimentos del Mercado La Terminal de la ciudad de León y la detección de agentes patógenos de origen viral, que contribuya a entender este fenómeno y poder facilitar información valiosa necesaria para la toma de decisiones.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Están las moscas (*Musca domestica*) del Mercado La Terminal contaminadas con agentes virales causantes de gastroenteritis?

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de virus causantes de gastroenteritis en muestras de moscas del Mercado La Terminal en el periodo Junio - Septiembre del 2020

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la transmisión mecánica *in vitro* de norovirus por *Musca domestica* sobre superficies inertes.
- Detectar la presencia de norovirus, rotavirus, astrovirus y sapovirus en moscas colectadas en el Mercado La Terminal.
- Describir las condiciones higiénicas – sanitarias de la zona en estudio

VI. MARCO TEÓRICO

La diarrea es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil en países en desarrollo, se define como mayor o igual a tres deposiciones anormales en 24 horas, esta representa la tercera causa de muerte en niños menores de 5 años, presentándose 5- 6 episodios/niño/ año en los países en vías de desarrollo, mientras tanto en los países desarrollo solamente de 1-2 episodios/niño/año en países desarrollados. ^(1, 2, 13)

La etiología de la diarrea infecciosa es variada, pudiendo ser de origen viral, bacteriano y parasitario, los principales agentes causante de diarrea registrados son: rotavirus, adenovirus, norovirus, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* y *Campylobacter*, *Criptosporidium sp*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*. ^(2, 13, 14)

Biología de la *Musca domestica*

La mosca común (*Musca domestica*) vive en contacto cercano con el ser humano, esto se le conoce como sinantropía. Las razones para esta coexistencia en la biocenosis artificial humana son claras: las etapas inmaduras del ciclo de vida del insecto se desarrollan en materia orgánica en proceso de descomposición (basura, heces, carroña o drenajes) y las etapas adultas se alimentan de las mismas fuentes, todas comúnmente presentes en los asentamientos humanos. ^(5,7)

Clasificación taxonómica de *la musca domestica* ⁽¹⁵⁾

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Familia: Muscidae

Subfamilia: Muscinae

Tribu: Muscini

Género: Musca

Especie: *M. domestica*

(Linnaeus, 1758)

Descripcion biologica de la *Musca domestica*

Pueden llegar a medir cerca de 4 a 7,5 mm de longitud, presentan un cuerpo dividido en tres partes: cabeza, torax y abdomen. (Fig. 1) ^(16,17)

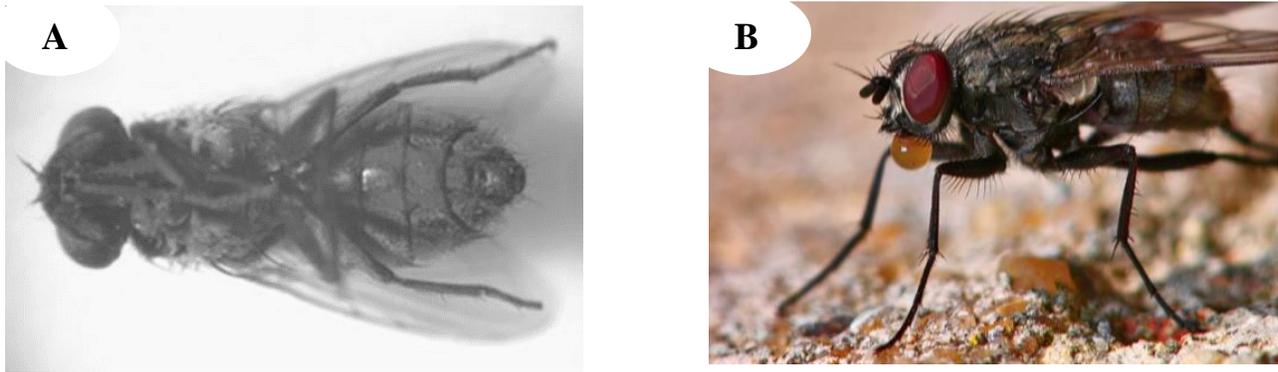


Figura N° 1 Estadio adulto de *Musca domestica*, **A)** se observan las tres partes; cabeza, tórax y abdomen, **B)** mosca regurgitando (lado izquierdo) ⁽¹⁶⁾

Cabeza: es convexa al frente, la cara posterior es casi plana y ligeramente cónica, el área frontal se denomina como *frons*, este ocupa la parte superior de la cara por debajo y entre las antenas, posee una trompa y dos antenas, un par de ojos compuestos y tres ojos simples. ^(16,17)

Trompa o probóscide: compuesta de una parte membranosa proximal y una distal, conocidas como *rostrum* y *haustellum* respectivamente, la probóscide termina en un labio que posee una esponja lo que le permite succionar alimentos líquidos o solubles en su saliva. ^(16,17)

Las antenas se encuentran por debajo del borde inferior de la *frons*, las cuales son apéndices multiarticulados, constan de tres articulaciones denominadas antenómeros, las dos primeras son únicas mientras la tercera comprende un número variable de antenómeros denominados escapo, pedicelo y flagelo o funículo respectivamente. ^(16,17)

Los ojos: están ubicados dorso-lateralmente (fig. 2), la superficie de cada ojo está dividida en un cierto número de áreas circulares o hexagonales llamadas facetas u omatidios. En

adición a los ojos compuestos tres ojos simples u ocelos ubicados en la parte superior de la cabeza, entre los ojos compuestos. ^(16,17)

Tórax: de color gris, presenta cuatro bandas longitudinales de igual ancho, de este emergen las patas y las alas; las pastas están compuestas por tres pares, cada una consta de coxa, trocánter, fémur, tibia y tarso. Los tarsos en su parte distal presentan un par de garras o uñas curvadas lateralmente, estas también son llamadas ungues. ^(16,17)

Las hembras se distinguen del macho ya que estas suelen ser relativamente más grandes y el espacio entre los ojos es más amplio que en los machos. (Fig. 2) ⁽¹⁶⁾



Figura 2. Dimorfismo sexual en *Musca domestica*
A) Macho y B) Hembra

Ciclo de vida de *Musca domestica*

Presenta una metamorfosis completa, siendo que su ciclo biológico consiste en los siguientes estadios, huevo, larva, pupa y adulto. Las larvas mudan dos veces por lo que hay una primera, segunda y tercera fase larvaria cada una de mayor tamaño que la precedente. (fig. 3) ^(16,17)

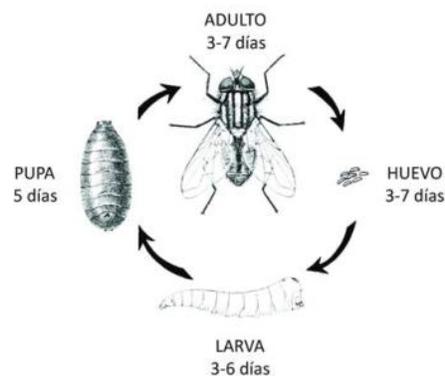


Figura. 3. Ciclo biológico de *Musca domestica*, en sentido de las agujas del reloj, adulto, huevo, larva, pupa. ⁽¹⁶⁾

La hembra pone sus huevos alrededor de dos días después de la cúpula, en condiciones ideales de 32 - 35°C y de nueve días si la temperatura es de 15°C, el sitio de la ovoposición es elegido a través del olor, factores como los gases desprendidos por la descomposición de la materia como dióxido de carbono, amoníaco son particularmente buscados por estos insectos. ^(16,17)

Huevo: presenta una forma elíptica de color blanco con un tamaño aproximado de 1 mm de longitud y 0.26 mm de anchura los extremos son arromados y la parte anterior ligeramente ahusada, la larva sale a través de una fisura en la parte dorsal de huevo. ^(16,17)

Larva: estas carecen de ojos y apéndices, sin embargo posee unas crestas espinosas, las cuales le sirven para la locomoción; presentan 13 segmentos, los dos primeros parecen parcialmente fusionados de modo que solo se observan 12, cuentan con dos espiráculos en la parte anterior lo que les permite la entrada de aire en el sistema respiratorio de la larva, poseen dos ganchos los cuales funcionan como mandíbulas para su alimentación, casi cualquier materia orgánica, húmeda y cálida puede suministrar alimento adecuado a la larva. Esta se desarrolla en el sitio de eclosión del huevo. ^(16,17)

Pupa: en el proceso de pupación se presenta una concentración general de la larva dentro de su propio tegumento, de modo que se convierte en un pupario cilíndrico de aproximadamente 6,3 mm de longitud. El pupario va oscureciéndose gradualmente hasta adquirir un intenso color marrón oscuro. ^(16,17)

Adulto: descrito anteriormente en el apéndice descripción biológica de la *Musca domestica*

La *Musca domestica* como vector mecánico de agentes patógenos

Previos estudios han identificado la presencia de agentes entéricos en la superficie de las moscas tales como: *Campylobacter*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter spp*, *Cryptosporidium spp*, *Giardia lamblia*, sin embargo, el reporte de agentes virales causantes de gastroenteritis se limita solo a rotavirus y norovirus. ^(5,8)

Se han planteado tres mecanismos posibles por los cuales las moscas pueden transmitir los diferentes agentes patógenos, mediante su superficie corporal, por regurgitación de comida contaminada y mediante defecación. (5, 7, 8.)

Virus causantes de gastroenteritis

Rotavirus

Los rotavirus fueron reconocidos como una de las principales causas de gastroenteritis aguda (GEA) en bebés y en niños pequeños en 1973 y fueron descritos por Ruth Bishop. Durante los últimos años se han desarrollado una enorme cantidad de investigaciones básicas sobre la estructura, la replicación, la patogenia y la respuesta inmunitaria de rotavirus. Debido a las modernas técnicas de diagnóstico, la epidemiología molecular de rotavirus se ha explorado ampliamente, y actualmente se han autorizado dos vacunas atenuadas con rotavirus en muchos países. ^(18, 19)

Morfología y estructura molecular

Rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*, la partícula de rotavirus completamente infecciosa (virión) consta de 3 capas de proteínas y presenta un tamaño 70 nm de diámetro, además presenta una estructura de simetría icosaédrica desprovisto de envoltura. La partícula de una sola capa (SLP: core Shell) está formado por 120 moléculas de la proteína viral (VP2) dispuesta en 60 dímeros en una simetría T. Cinco de los dímeros forman un decámero alrededor del eje de simetría quintuple y 1 decámero forma la capa de proteínas central; los complejos de enzimas de replicación que consiste en VP1 y VP3 están ubicados en el interior del núcleo y están en contacto intenso con un segmento genómico de RNA doble hebra (dsRNA). La capa central encierra el genoma viral de 11 segmentos de dsRNA, así como la polimerasa de ARN dependiente de ARN viral (RdRp), VP1, capping enzima, VP3. Cada segmento del genoma codifica para proteínas estructurales de VP1 a VP7 y no estructurales NS1 y NS5. (Fig. 4) ^(18, 19, 20)

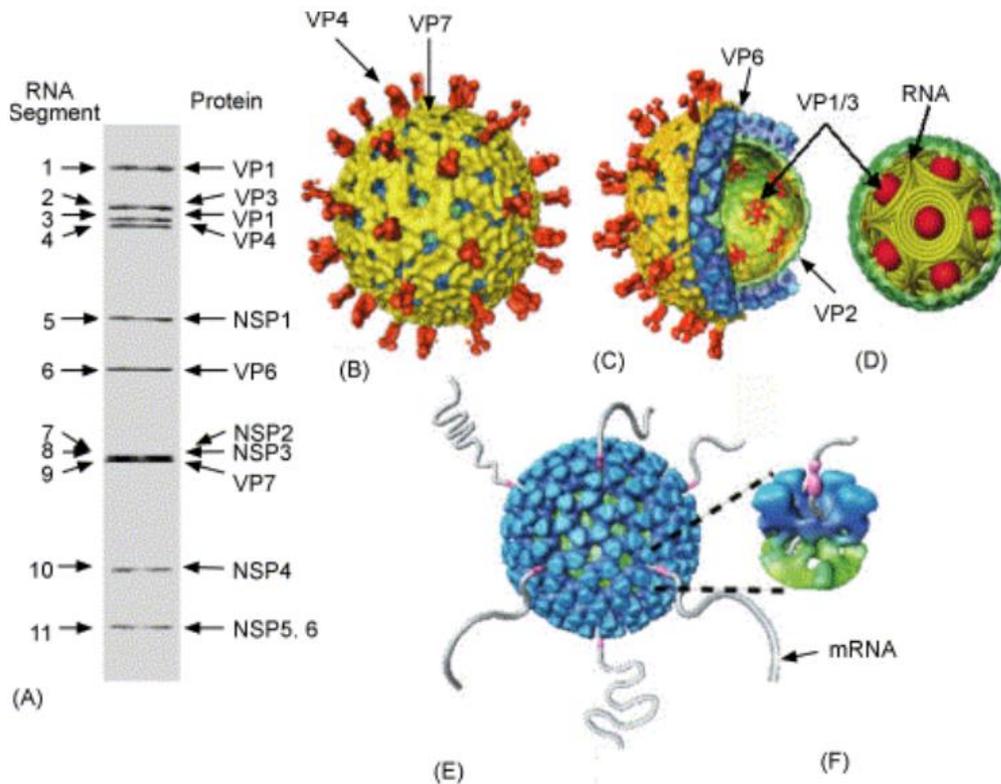


Figura. 4. Las características arquitectónicas de rotavirus. (A) ARN-PAGE que muestra, 11 segmentos de dsRNA que comprenden el genoma de rotavirus. Los segmentos de genes están numerados a la izquierda y las proteínas que codifican se indican a la derecha. (B) Cryo-EM reconstrucción de la partícula de triple capa rotavirus. La VP4 proteínas pico y la capa más externa VP7 se indican mediante flechas. (C) Una vista en corte de la triple capa de rotavirus que muestra las capas de VP6 y VP2 interiores y las enzimas transcripcionales ancladas a la capa de VP2 en los ejes de cinco veces. (D) Representación esquemática de la organización del genoma en rotavirus. Los segmentos del genoma se representan como espirales cónicas invertidas que rodean a las enzimas de transcripción dentro de la capa de VP2. (E y F) Modelo de Cryo-EM reconstrucción de la transcripción de partículas de doble capa (DLP). Los resultados de transcripción endógenos en la liberación simultánea del ARNm transcrito a partir de los canales situados en el vértice de cinco veces de la DLP icosaédrica. ⁽¹⁸⁾

Clasificación

Los rotavirus constituyen el género *Rotavirus*, uno de los 15 géneros de la familia *Reoviridae*. Rotavirus tiene tres especificaciones antigénicas importantes: serogrupo, subgrupo, serotipo. Se clasifican en 7 grupos designados por letras mayúsculas de la A a la G, los serogrupos pueden ser clasificados en cuatro subgrupos antigénicos (SG) basados en la especificidad de la reactividad de VP6 con anticuerpos monoclonales (MAbs), los serotipos se clasifican en base a la naturaleza antigénica de dos proteínas, la VP4 denominada como serotipo P por ser sensible a proteasas y la VP7 conocida como serotipo G por ser una glicoproteína. Se han identificado 15 serotipos G y 14 serotipos P, existen 20 genotipos P denominados por números del 1 – 20 entre corchetes; ejemplo P[4]. (Fig. 5) ^(14, 18, 19, 20)

Los genes que codifican los antígenos G y P se agregan independientemente, permitiendo observar varias combinaciones G y P, las principales combinaciones responsables de la mayoría de las infecciones de gastroenteritis severa en niños a nivel mundial son: G1[P8], G2P[4], G3P[8] y G4P[8]. ^(14, 18, 20)

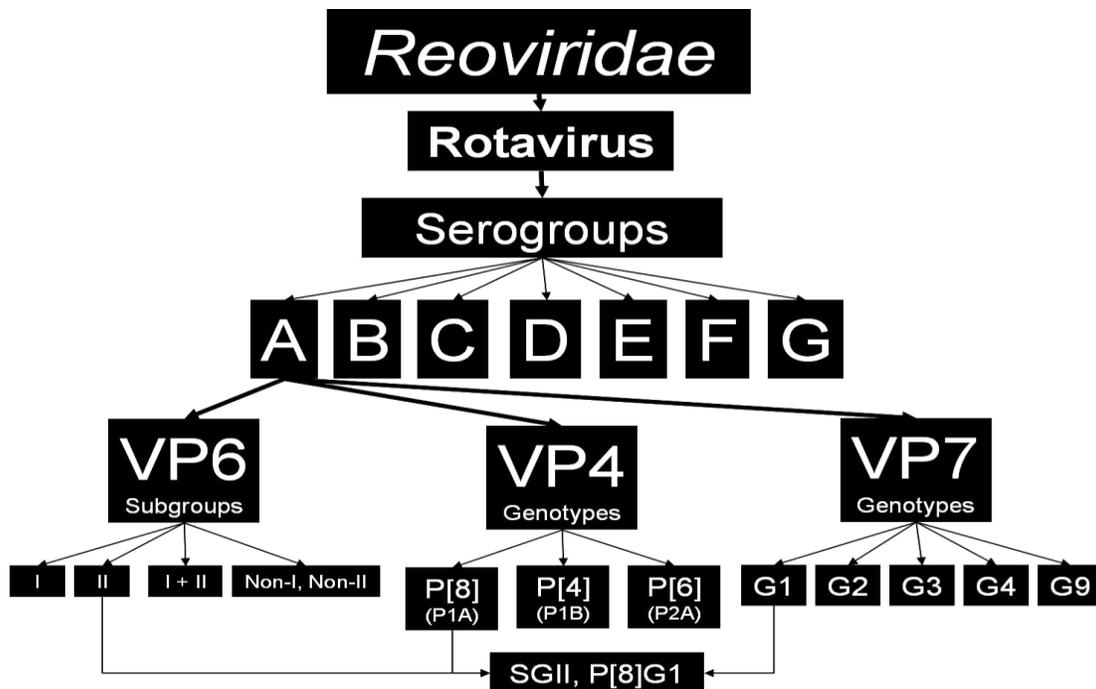


Figura. 5: Clasificación de los serogrupos de rotavirus ⁽¹⁸⁾

Ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación de rotavirus (Fig. 6) incluye los siguientes pasos:

- Fijación mediada por VP4 y VP7.
- Penetración y liberación.
- Síntesis de ssRNA (=mRNA) de cadena positiva, mediada por VP1, VP3 y VP2.
- Formación de viroplasma, mediación del empaquetamiento de ARN, síntesis de ARN de cadena negativa (= replicación de ARN) y formación de DLP.
- Maduración de partículas de virus (a TLP) y liberación.

Fijación de la partícula viral: Es un proceso complejo, primero la partícula de rotavirus infecciosa, la TLP, interactúa mediante sus picos VP4 con receptores celulares (receptor e unión). Los receptores contienen ácido siálico (SA) en posiciones Terminales o sub terminales, la unión esta mediada por la subunidad VP8* de VP4, la superficie de VP8* interactúa con SA en los glicanos celulares, varias moléculas de la superficie celular pueden actuar como correceptores (pos unión) como varias integrinas ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$) que reacciona como ligandos de integrina en VP5*o VP7, todos los receptores están asociados con balsas lipídicas, es decir lípidos resistentes a detergentes cerca de la membrana plasmática celular que actúan como plataforma para la formación de las que se asocian los TLP del rotavirus. ^(18,19)

Penetración y liberación de partículas del virus: Al entrar en contacto con el receptor celular los picos de VP4 de los TLP del rotavirus experimentan cambios conformacionales de tal manera que los dominios lipofílicos de VP5* que normalmente están ocultos debajo de VP8* quedan expuestos en la superficie en forma de paraguas posterior a la penetración. El mecanismo de penetración de rotavirus sigue sin estar claro, puede ocurrir por endocitosis mediada por receptor o penetración directa en la membrana con solubilización de la partícula de rotavirus. ^(18,19)

Síntesis de ARNm de cadena positiva: las partículas de rotavirus poseen sus propios complejos de transcripción (TC), que consisten en VP1, la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (RdRp) y VP3, la enzima de protección viral con actividad de fosfodiesterasa, guanililtransferasa y metilasa. Los TC se localizan en la superficie interna de la capa VP2 (núcleo), cada TC forma un complejo con un segmento de ARN viral dedicado. Las DLP de

rotavirus en el citoplasma producen transcritos de ssRNA (+) protegidos no poliadenilados, que se liberan de la partícula a través de canales de clase I. Las transcripciones sirven para la producción de proteínas codificadas por virus (al principio de cada ciclo) o como plantilla para la replicación (al final del ciclo de replicación) para convertirse en los genomas de dsRNA de la progenie de rotavirus. ^(18,19)

Formación del viroplasma: Las proteínas y los ARN de los rotavirus interactúan específicamente en los cuerpos de inclusión citoplasmáticos denominados viroplasmas. Para la formación de los viroplasmas, la presencia de dos de las proteínas no estructurales de rotavirus, NSP2 y NSP5 es esencial y suficiente, la NSP2 citoplasmática también forma complejos con VP1, VP2 y tubulina lo que convierte a la tubulina en un componente de los viroplasmas e induce la despolimerización de los microtúbulos y estabilización por acetilación. Los proteosomas funcionales y los componentes de la vía autofágica son esenciales para la formación de viroplasmas y la replicación del rotavirus. NSP2 regula el equilibrio en la traducción y la replicación del ARN del rotavirus mediante actividad de nucleósido trifosfatasa, desestabilización de la hélice de ARN y nucleósido difosfato quinasa. ^(18,19)

NSP4 es una glicoproteína transmembrana que se encuentra en el retículo endoplasmático (RE) y tiene múltiples funciones: 1) sirve como receptor intracelular para la DLP al interactuar con VP6, 2) libera Ca^{2+} de las reservas intracelulares al actuar como una viroporina, 3) NSP4 forma capuchones en el viroplasma y se localiza con la proteína de autofagia LC3. El aumento desencadenado por NSP4 de Ca^{2+} intracelular activa una vía dependiente de quinasa, que conduce a la autofagia, 4) NSP4 altera la permeabilidad de la membrana plasmática y desestabiliza las uniones intercelulares, 5) NSP4 actúa como una enterotoxina viral. ^(18,19)

La proteína NSP3 interactúa con extremo 3' del ssRNA viral y con el factor de traducción el F4G, circularizando así el ARN viral y funcionando así como la proteína de unión a poliA para los ARNm celulares. NSP3 previene la traducción del ARNm celular de manera muy eficiente. ^(18,19)

NSP1 es la proteína de rotavirus más variable, es probable que esté involucrada en la restricción del rango de huéspedes, y una función importante es funcionar como antagonista de la respuesta inmune innata. ^(18,19)

Los viroplasmatas reclutan gotas de lípidos celulares (LD) que sirven como vehículos de almacenamiento y transporte de energía en la célula, la interferencia con la homeostasis de LD y el bloqueo de la degradación de grasas neutras disminuye el número y el tamaño de viroplasmatas, la producción e infectividad de la progenie viral. ^(18,19)

Empaquetamiento de ARN, síntesis de ARN de cadena negativa y formación de DLP:

Debido a su longitud de persistencia de 113 Å, los dsRNA desnudos no se pueden empaquetar en capas centrales. Los 11 segmentos de ssRNA diferentes se reorganizan e interactúan con las proteínas del núcleo viral y luego se empaquetan y replican. Los complejos de replicación primaria de VP1/VP3/ssRNA interactúan con un decámero de VP2 lo que conduce a la formación de partículas del núcleo. Durante este proceso, la carga negativa del ARN debe neutralizarse mediante el empaquetamiento conjunto con cationes divalentes o espermidina. El dominio N-Terminal de VP2 es esencial para la encapsidación de VP1. Una vez formadas las partículas del núcleo se transcapsidan rápidamente por VP6 que conduce a la síntesis de DLP. ^(18,19)

Maduración y liberación de partículas del virus: Los DLP de rotavirus, al salir de los viroplasmatas brotan a través del retículo endoplasmático (RE) para madurar. En este proceso NSP4 actúa como receptor intracelular al interactuar con VP6. Dentro del RE, las partículas de rotavirus nacientes están envueltas transitoriamente, la envoltura se pierde cuando las partículas de rotavirus adquieren la capa externa que consta de VP4 (60 trímeros) y VP7 (260 trímeros). NSP4 tiene una función crucial en el proceso de maduración, el bloqueo de la expresión de NSP4 conduce a defectos en la maduración de las partículas del rotavirus y la replicación del ARN también se ve afectada. Los TLP del rotavirus se liberan de células no polarizadas por lisis, mientras que las células epiteliales por un proceso de gemación que no mata inmediatamente la célula. ^(18,19)

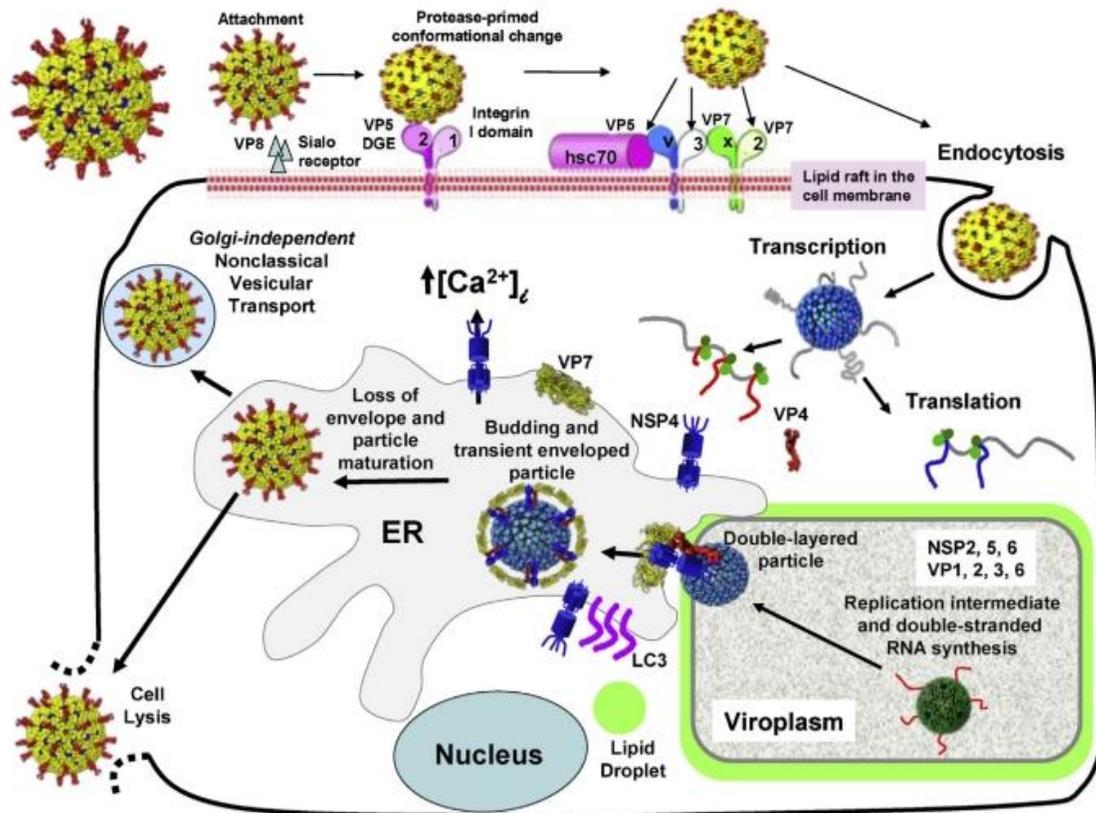


Figura 6. Ciclo de replicación de rotavirus: las partículas de triple capa (TLP) del rotavirus se unen primero a los sialoglucanos (o antígenos histo-sanguíneos) en la superficie de la célula huésped, seguido de interacciones con otros receptores celulares. Luego el virus se internaliza por endocitosis mediada por receptores. La eliminación de la capa exterior desencadenada por el bajo contenido de calcio del endosoma, da como resultado la liberación de la partícula de doble capa transcripcionalmente activas (DLP) en el citoplasma. Las DLP inician rondas de transcripción de ARNm y estos ARNm se utilizan para traducir proteínas virales. Una vez que se producen suficientes proteínas virales, el genoma de ARN se replica y empaqueta en DLP recién creados, estructuras especializadas llamada viroplasmos que interactúan con gotas de lípidos. Los DLP recién creados se unen a NSP4, que sirven como receptores del retículo endoplasmático (RE) y brotan en el RE. NSP4 también actúa como una vioporina para liberar Ca^{2+} de las reservas intracelulares. Las partículas envueltas transitoriamente se ven en el ER. Las membranas transitorias se eliminan a medida que se ensamblan las proteínas de la cápside externa VP4, lo que da como resultado la maduración de los TLP. Los viriones de la progenie se liberan a través de la lisis celular. En las células epiteliales polarizadas, las partículas se liberan mediante un mecanismo de transporte vesicular no clásica. ⁽¹⁸⁾

Patogénesis

Los rotavirus infectan principalmente a los enterocitos maduros en la parte superior de las vellosidades del intestino delgado de las especies de mamíferos, donde se puede observar vacuolización y pérdida epitelial, seguida de hiperplasia en las criptas. Aunque la diseminación extraintestinal del rotavirus ocurre con frecuencia como lo demuestra la detección de dsRNA de rotavirus, antígenos de rotavirus y rotavirus infecciosos en suero y otros sitios del cuerpo huésped, la importancia de estas observaciones para los hallazgos patológicos en huésped normales (inmunocompetentes) son controvertidos, por el contrario, en los huéspedes inmunocomprometidos, el rotavirus puede replicarse en el hígado, el sistema biliar y páncreas. Un hallazgo sorprendente (en modelos animales) es el inicio de la diarrea en un momento temprano cuando los cambios histopatológicos del intestino delgado están ausentes, probablemente debido a la acción temprana de NSP4 que forma oligómeros de diferentes tamaños. ⁽¹⁸⁾

La patogénesis de rotavirus es multifactorial, dependiendo sobretodo de la edad del huésped, homología/heterología de la interacción virus-huésped y productos genéticos virales particulares (VP3, VP4, VP7, NSP2, NSP3, NSP4). ⁽¹⁸⁾

Los factores del mecanismo de la enfermedad son: mala absorción seguida de la destrucción del epitelio, isquemia de las vellosidades, la acción de NSP4, una enterotoxina viral y activación del sistema nervioso entérico. La patogenia de los síntomas de vómitos se ha dilucidado por las observaciones que el rotavirus puede infectar las células enterocromafinas en el intestino y estimular la producción de 5-hidroxitriptamina (serotonina) que a su vez activa el nervio vagal aferente y estimula las estructuras del tronco encefálico que controla los vómitos. ^(18, 20)

Epidemiología

Rotavirus es la causa más común de gastroenteritis severa en niños menores de 5 años, se estima que produce alrededor de 2.4 millones de hospitalizaciones y 527,000 millones de muertes cada año, sin embargo, la mayoría de los casos de diarrea por rotavirus se tratan en el hogar, del 80 – 85 % de los casos no reciben tratamiento en ninguna unidad de salud. ^(21,22)

Rotavirus es un virus altamente infectante, las personas infectadas con este, pueden excretar grandes cantidades de partículas virales antes de que comiencen los síntomas de la enfermedad, el principal mecanismo de transmisión registrado es fecal – oral, el contagio de persona a persona a través de las manos parece ser la ruta responsable de diseminar el virus en ambientes cerrados, la transmisión entre niños en guarderías es causada por el contacto directo y mediante alimento o juguetes contaminados. ⁽²³⁾

En los países con climas templados las infecciones predominan en invierno, mientras que los países tropicales los casos suelen ocurrir durante todo el año, el periodo de incubación del virus en general es de 24- 48 horas y la dosis infecciosa es de 10,000 a 100,000 millones de partículas virales. ⁽²³⁾

A mediados de febrero del año 2005 en Nicaragua, se reportó un brote de diarrea aguda provocando 47,470 consultas y 52 fallecidos, y se encontró rotavirus en el 42% de muestras de niños hospitalizados. ⁽²¹⁾

Después de la introducción de la vacuna contra rotavirus, los casos de gastroenteritis por este virus han disminuido y se estima que es responsable de aproximadamente el 8% de los casos. ^(22,24)

Norovirus

Norovirus anteriormente denominado agente Norwalk, pertenece a la familia *Caliciviridae*.^(21, 22) Los norovirus fueron los primeros virus observados en heces, descubierto por Albert Kapikian en 1972, derivados de un brote de gastroenteritis aguda ocurrido entre alumnos y profesores de una escuela de Norwalk en Ohio, EEUU. El virus fue descubierto con una técnica nueva para la época conocida como microscopía inmunoelectrónica.^(25,26)

Morfología y estructura molecular

Los norovirus son virus pequeños, con un diámetro aproximado entre 27-35 nm son virus no envueltos cuya nucleocápside es de simetría icosaédrica, con depresiones en forma de copa o cálices de ahí el nombre de Calicivirus.^(25, 26,27)

El genoma de norovirus es un ARN monocatenario de sentido positivo (ssRNA +) con 7,5 – 7,7 kb, y contiene tres marcos de lectura abierta (ORF) que codifican para genes estructurales y no estructurales. (Fig. 7)^(25, 26,27)

El ORF 1 ubicado en el extremo 5' del genoma codifica para una lipoproteína de aproximadamente 194 kDa que se escinde por una proteasa viral en seis proteínas no estructurales (NS) involucradas en la transcripción y replicación, estas proteínas NS son p48, nucleósido trifosfatasa (NTPasa), p22, VPg, proteasa y la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp).^(25, 26, 27)

ORF2 codifica la principal proteína estructural de la cápside viral VP1, esta proteína presenta alta especificidad de reconocimiento del receptor, es altamente inmunogénica y proporciona diversidad entre cepas.^(25, 26,27)

ORF3 se encuentra el extremo 3' del genoma, codifica la proteína estructural menor de la cápside VP2, cuya función se relaciona con la expresión y la estabilidad de la proteína de la cápside VP1 al proporcionar estabilidad y protección de la degradación de proteasas.^(25, 26,27)

Clasificación y diversidad genética

Los norovirus son un género muy diversos tanto genética y antigénicamente, presentan aproximadamente 46% de divergencia en la secuencia de nucleótidos entre los genogrupos (GI-GVI).⁽²⁸⁾ La gran diversidad de los norovirus se atribuye a las acumulaciones de

mutaciones puntuales asociadas con la replicación del ARN propensos de errores por la falta de corrección de la ARN polimerasa, la recombinación genética que implica el intercambio de secuencias entre cepas altamente relacionadas. ^(25,28)

A pesar de esta diversidad, en los últimos años sólo unas pocas cepas, principalmente los genogrupo II, el genotipo 4 (GII.4), son responsables de la mayoría de los casos y brotes, se ha identificado a norovirus del genogrupo GII como la cepa más común en el mundo. ^(25,26)

Las cepas humanas se clasifican sobre la base de sus secuencias y se dividen en diez genogrupos (G), de los cuales el GI, GII y GIV afectan a humanos. Dentro de estos genogrupos existen diversos genotipos, con características antigénicas propias y virulencia variable. ⁽²⁹⁾

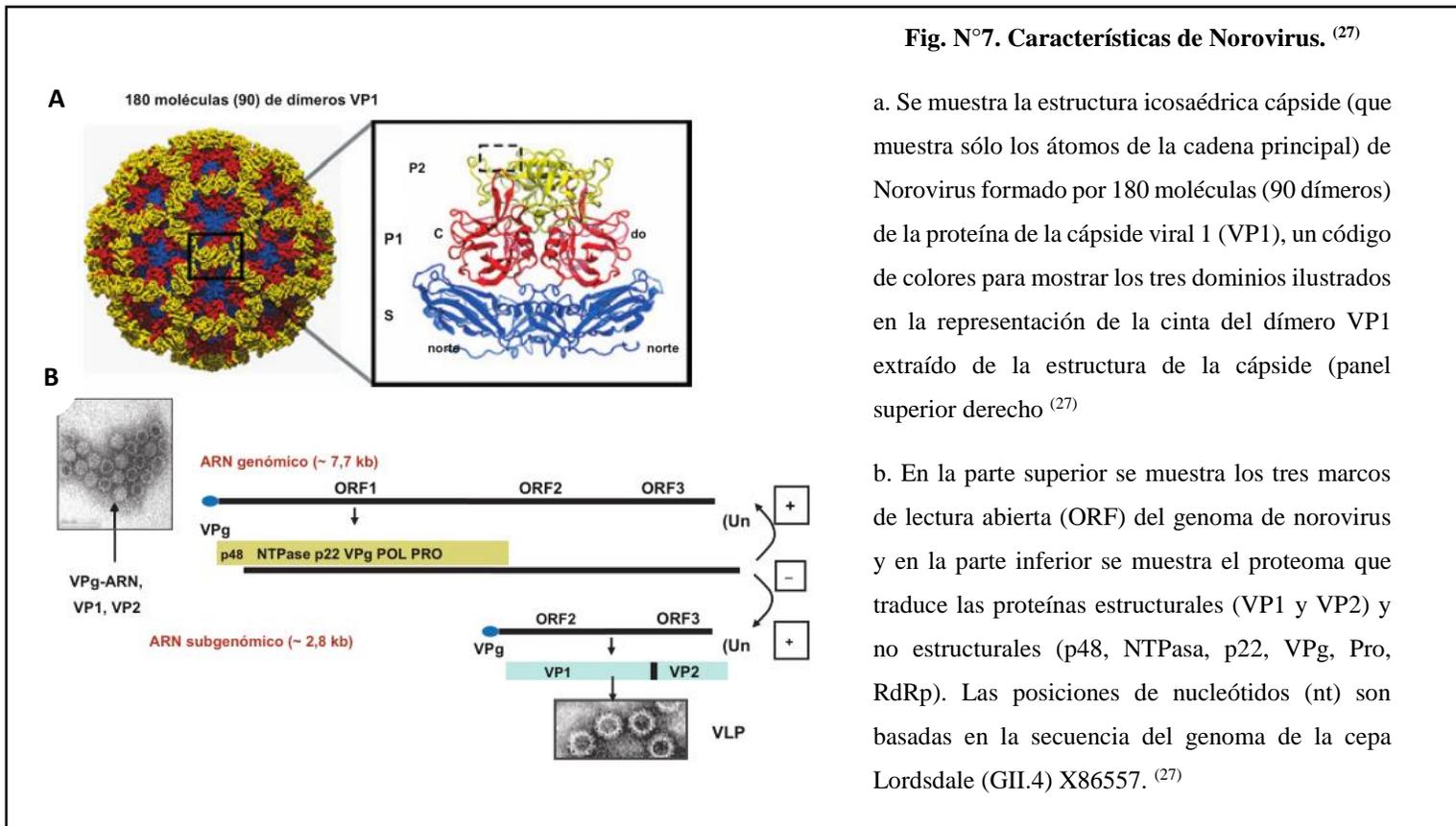
Ciclo de replicación viral

El ciclo replicativo de norovirus comienza con la interacción del virus con la célula diana a través del reconocimiento de receptores específicos, en caso de norovirus humano (HuNoV) el receptor principal aún se desconoce. Sin embargo, se han descrito algunos correceptores y factores de unión celular incluidos los antígenos de grupo histo-sanguíneo (HBGA) y ácidos biliares entre otros. norovirus se une a la célula por la interacción de la región P2 presente en el dominio P de la proteína VP1 con un receptor a un desconocido y algunos correceptores del huésped como HBGA. ⁽²⁷⁾

Después de la interacción de VP1 con los receptores celulares, ocurre la internalización del virus y el posterior desensamblaje de la cápside viral, liberando el ARN en el citoplasma celular. Una vez que se libera el genoma viral, la proteína VPg que está unida covalentemente en el extremo 5' del genoma viral, interactúa con el inicio de la traducción celular, factores como el F3 genera un complejo de traducción. Posteriormente se reclutan las sub unidades ribosómicas mayor y menor, lo que da como resultado la traducción de la poliproteína no estructural que contiene las proteínas no estructurales del virus. Una vez generada la poliproteína no estructural, la proteasa se escinde automáticamente, posterior la proteasa escinde postraduccionalmente el resto de la poliproteína generando tres precursores de proteínas: p48/NTPase, p22/VPg, Pro/Pol. El precursor Pro/Pol tiene dos funciones enzimáticas: actividad de proteasa y polimerasa. Posteriormente los tres precursores son

escindidos por acción del complejo Pro/Pol que a su vez se auto escinde y genera las seis proteínas no estructurales individuales. Estas proteínas tienen funciones específicas en los ciclos replicativo e infecciosos. ⁽²⁷⁾

El proceso de replicación se lleva a cabo por la acción de las proteínas Pol, VPg, NTPase. Este último tiene tres actividades: helicasa, NTP hidrolasa y chaperona, posteriormente la proteína P48 se integra al proceso lo que mejora la actividad de la proteína Pol. Luego se produce la síntesis de genoma viral y de los subgenomas con la proteína VPg, unida al extremo 5' que recluta los factores de iniciación de la traducción celular. Finalmente tanto el genoma como los subgenomas serán movilizados por la actividad chaperona de la NTPase. Se producirá una poliproteína viral a partir de la traducción del genoma viral y se generarán las proteínas VP1 y VP2 a partir de los subgenomas, una vez generadas las tres proteínas se produce el ensamblaje y liberación de los viriones. A través de un mecanismo que queda por dilucidar. p22 y la NTPasa favorece la actividad proapoptótica de la célula, facilitando la liberación de viriones de NoV de la célula huésped. ⁽²⁷⁾



Patogénesis

El mecanismo por el cual se produce la diarrea por norovirus es desconocido; sin embargo se ha sugerido que el retraso en el vaciamiento gástrico observado en estas gastroenteritis podría jugar un papel importante. En un estudio de más de 1000 voluntarios que participaron en un estudio de desafío, en muestras proximales de yeyuno de voluntarios enfermos se observó una expansión y embotellamiento de las vellosidades del intestino delgado proximal, mientras que las células epiteliales permanecieron intactas y se produjo un acortamiento de las microvellosidades, hiperplasia de las células de las criptas, vascularización citoplasmática e infiltración de células mononucleares y polimorfonucleares en la lámina propia, aunque la mucosa permanece intacta. ^(25,29)

El grado de participación del intestino delgado se desconoce porque no se ha podido estudiar la participación más distal del intestino delgado, y el sitio de replicación del virus no ha sido identificado, aunque se presume podría ser la parte superior del tracto intestinal. ⁽²⁶⁾

También hay disminución de la actividad enzimática (fosfatasa alcalina, sacarosa y trehalosa) en el borde de las vellosidades del intestino delgado, resultando en esteatorrea leve y malabsorción de carbohidratos transitorios. La actividad de la adenilatociclasa en el yeyuno no es elevada; la secreción gástrica, de ácido clorhídrico, pepsina y el factor intrínseco han sido asociados con estos cambios histológicos. Por el contrario, se retrasa el vaciamiento gástrico, y la reducida motilidad gástrica pueden ser responsables de las náuseas y vómitos asociados con esta gastroenteritis. ⁽²⁶⁾

Manifestaciones clínicas

Después de un período de incubación de 12-48 horas aparecen náuseas, vómitos y diarrea. El comienzo de los síntomas puede ser gradual o abrupto. La mayoría de las personas experimenta primero dolores, cólicos abdominales, con náuseas o sin ellas. También se observan mialgias, astenia y cefaleas ocasionales. En cerca de la mitad de los casos aparece fiebre de bajo grado (38.3°C a 38.8°C). Las manifestaciones persisten habitualmente entre 48 y 72 horas, pero pueden durar más tiempo de 4 a 6 días en brotes nosocomiales y en niños menores de 11 años. ^(25, 26)

En general, las heces diarreicas son de una cantidad moderada, con 4 a 8 deposiciones durante 24 horas. No contienen sangre ni moco, y pueden ser acuosas; tampoco se observan leucocitos fecales. La enfermedad normalmente es leve y auto limitada, pero tiene una tasa de ataque secundario elevada, resultando en altas tasas de transmisión. ^(25, 26)

La máxima eliminación de virus en las heces se produce en los primeros días tras la infección, pero puede continuar incluso después de tres semanas, especialmente en niños pequeños. Informes recientes de casos mostraron que las personas con inmunodeficiencias pueden eliminar el virus de forma crónica, aunque actualmente no se ha constatado transmisión de la infección por contacto con un eliminador crónico. Las personas sin síntomas pueden eliminar la misma cantidad de virus que las personas enfermas. Se calcula que aproximadamente el 50% de las infecciones por norovirus son asintomáticas. ⁽²⁶⁾

Epidemiología

En 1929, Zahorsky describe por primera vez el nombre "enfermedad del vómito invernal" que se refiere a la epidemiología observada para la enfermedad causada por Norovirus, caracterizada por la aparición de vómitos y diarrea autolimitada que alcanzaba su punto máximo durante los meses más fríos. ⁽²⁵⁾

La infección por norovirus está relacionada con la aparición epidémica y esporádica de gastroenteritis aguda tanto en el ámbito familiar como escolar o comunitario, debido a la baja dosis infecciosa (10 – 100 partículas virales) da las condiciones idóneas para la propagación persona-persona o ruta fecal-oral. Afecta a todas las edades, pero principalmente a niños y adultos mayores. En países desarrollados los anticuerpos frente al norovirus se detectan a los 3 - 4 años de edad, incrementando su prevalencia por encima del 50% en la quinta década de la vida. ⁽²⁹⁾

Como se sabe el único reservorio natural de los norovirus son los seres humanos, y las sustancias eliminadas por el organismo continuamente retornan el virus al ambiente, contaminando por esta vía los alimentos o el agua que constituyen la cadena alimenticia, el periodo de incubación para la presentación de síntomas luego de la infección, oscila entre 6 a 48 horas. Las personas infectadas con norovirus pueden transmitir el virus desde el

momento en que aparecen los primeros síntomas de la infección hasta aproximadamente 3 días posteriores a su recuperación. Algunas personas pueden llegar a ser transmisoras del virus por un período más largo de hasta 2 semanas después de su recuperación clínica. ⁽²⁵⁾

Los casos por norovirus tienen mayor incidencia durante el periodo de invierno, sin embargo, se han observado brotes de norovirus durante el verano, aunque a un ritmo reducido. Se estima que cada año norovirus causa 64,000 episodios de diarrea que requieren hospitalización y 900,000 visitas clínicas entre los niños en los países industrializados y hasta 218,000 muertes de niños < 5 años en los países en desarrollo. Norovirus representa el 12% de los casos de gastroenteritis severa entre los niños < 5 años de edad y también de los casos de diarrea leve y moderada entre las personas de todas las edades. ⁽²⁹⁾

Astrovirus

Los astrovirus humanos (HAstV) son virus de ARN monocatenario de sentido positivo (ssRNA+), no poseen envoltura, tienen una apariencia de estrella de cinco o seis puntos. Fueron detectados por primera vez en 1975 por Appleton y Higgins mediante microscopía electrónica en las muestras de heces de niños con gastroenteritis aguda. ^(30, 31, 32)

El genoma HAstV contiene tres marcos de lectura abiertos (ORFs): Los dos ORF en el extremo 5' del genoma, ORF 1a y ORF 1b, que codifican lipoproteínas estructurales NSP1a y NSP1ab, que se procesan proteolíticamente en proteínas más pequeñas incluida ARN polimerasa dependiente de ARN, una serina proteasa, una proteína ligada al genoma viral (VPg) y varias otras proteínas con funciones desconocidas. El ORF en el extremo 3' del genoma, ORF2, codifica la proteína de la cápside (CP) del AstV. ^(30, 31, 32)

Clasificación

La familia *Astroviridae* consta de dos géneros: *Mamastrovirus* y *Avastrovirus* (Fig. 8), que infectan a una amplia variedad de mamíferos y aves respectivamente, los Astrovirus humanos (HAstV) clásicos se clasifican en ocho serotipos del 1 al 8, según la reactividad de las proteínas de la cápside con anticuerpos específicos. ^(25, 26, 27) La mayoría de los estudios en diferentes países de todo el mundo indican que HAstV-1 es el serotipo más común, mientras que HAstV-6 y HAstV-7 rara vez se han aislado. ⁽³¹⁾

Replicación

AstV se sintetiza a partir del ARN subgenómico viral (sgRNA), después de la entrada en la célula y el desprendimiento, las dos poliproteínas no estructurales principales, NSP1a y NSP1a1b se traducen del ARN genómico unido a VPg. La poliproteína no estructural NSP1a1b se expresa gracias al RFS que existe entre ORF1a y ORF1b. La escisión de estas poliproteínas da como resultado las proteínas no estructurales individuales requeridas para la replicación del genoma, que tiene lugar en complejos de replicación ensamblados en estrecha asociación con las membranas intracelulares. Este proceso da como resultado la formación de ARN genómico y subgenómico, que se producen en grandes cantidades para garantizar la producción de alto rendimiento de proteínas estructurales. Después de la encapsidación y maduración, los viriones se liberan de las células. (Fig.9) ⁽³²⁾

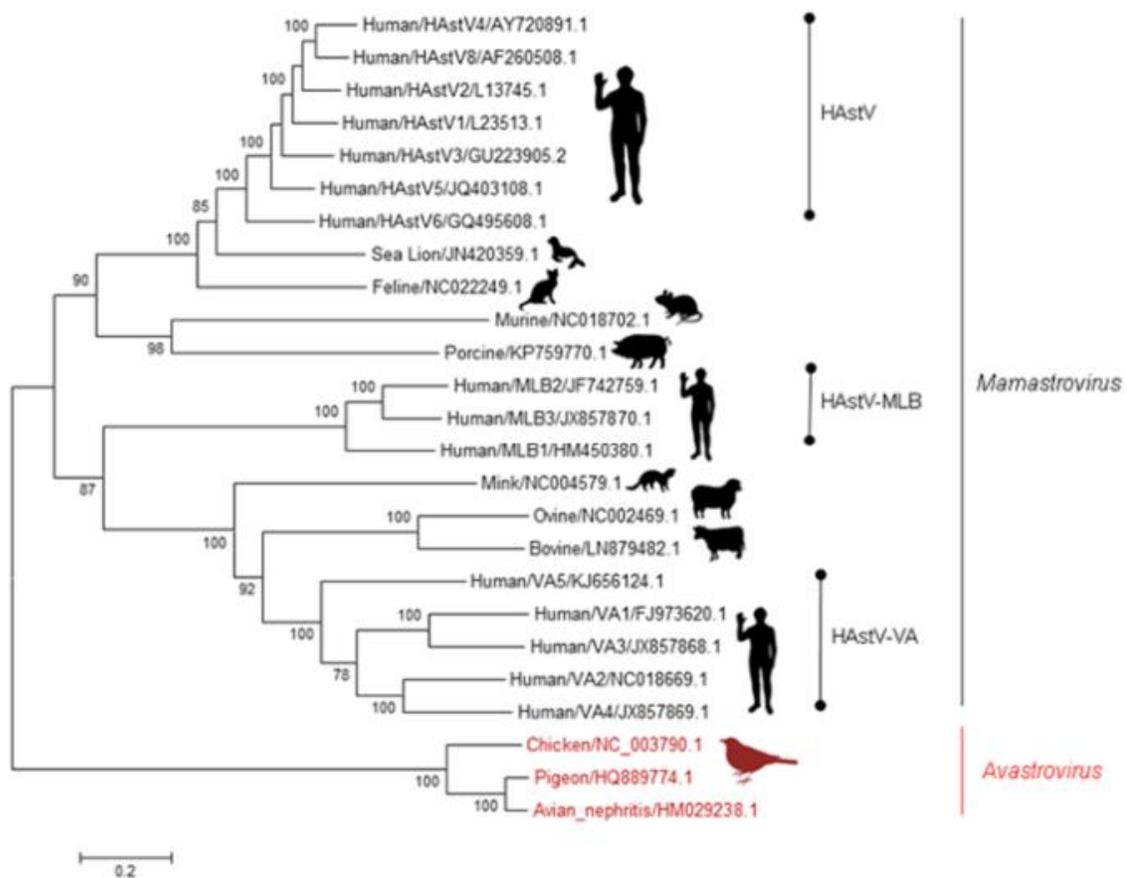


Figura 8. Árbol filogenético de la familia *Astroviridae*. Se representa los genotipos de *Avastrovirus* (rojo) y *Mammastrovirus* (negro). ⁽³¹⁾

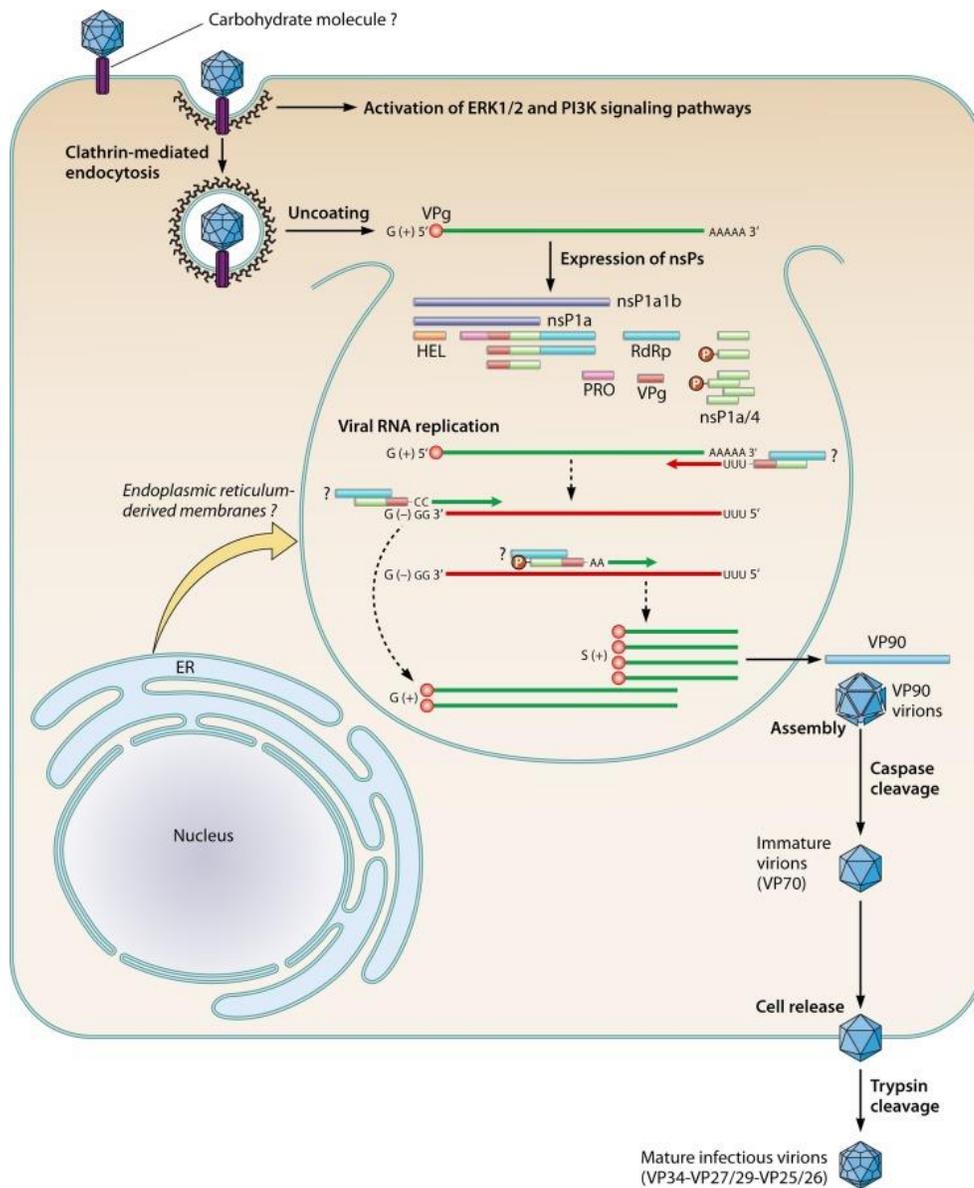


Figura 9. Ciclo de replicación de los Astrovirus humanos **a)** síntesis de la proteína de la cápside (VP90) de HAstV de 90 kDa a partir de ARN subgenómico viral (sgRNA) , **b)** ensamblaje de proteínas VP90 (180 copias con ARN genómico viral en partículas HAstV **c)** escisión mediada por caspasa de VP90 C –Terminal para formar VP70 y posterior liberación de partículas de HAstV inmaduras **d)** Escisión de proteasa extracelular de partículas de HAstV inmaduras para formar partículas HAstV infecciosas y maduras; **e)** las partículas extracelulares de HAstV inducen la producción de anticuerpos del huésped e inhiben la activación del complemento del huésped **F)** unión y endocitosis dependiente de clatrina de partículas de HAstV **g)** Descubierta del genoma del virus en el endosoma tardío. La cinasa regulada por señales extracelular (ERK ½) y la fosfoinositida 3-cinasa (PI3K) se activan durante unión o entrada de HAstV en la célula. ⁽³²⁾

Epidemiología

Desde su primer descubrimiento en 175 en muestras de heces de niños con diarrea, los HAstV han sido agentes etiológicos bien establecidos de gastroenteritis viral con una distribución mundial, si bien se han informado en casos de gastroenteritis en adultos, se consideran predominantemente una causa común de gastroenteritis viral en la población pediátrica, también afecta con frecuencia a los ancianos y a personas inmunocomprometidas. ⁽³³⁾

Los HAstV clásicos son una causa frecuente de gastroenteritis leve en niños menores de dos a cinco años de edad y por lo general, causan enfermedad autolimitada, en particular diarrea acuosa de dos a tres días. ⁽³³⁾

Estudios de seroprevalencia indican que la mayoría de los niños, adquieren anticuerpos contra HAstV durante los primeros años de la vida, un 90% de la población menor de 9 años tiene anticuerpos contra HAstV tipo 1. En consecuencia, una nueva apreciación del papel de HAstV en la enfermedad diarreica ha evolucionado, y en muchos casos los HAstV son considerados como la segunda causa más común de gastroenteritis viral en los niños después de rotavirus. Están implicados aproximadamente en el 10% de casos de diarrea en niños menores de 2 años. ⁽³⁴⁾

Manifestaciones clínicas

Los síntomas se manifiestan dentro de 2-3 días después de la infección y tienen una duración de aproximadamente la misma cantidad de tiempo. La infección por astrovirus se asocia principalmente con la diarrea, aunque los vómitos, dolor abdominal, dolor de cabeza y deshidratación leve en ocasiones se observan también. La diarrea inducida por astrovirus generalmente no es lo suficientemente grave como para requerir hospitalización y se resuelve espontáneamente. ⁽³³⁾

Las infecciones por AstV son de interés clínico en la población inmunocomprometida debido a su mayor gravedad de los síntomas y participación extra-gastrointestinal. HAstV También se ha sugerido que es agente causante de la encefalitis y meningitis, que fue sacada a la luz en un caso clínico de un niño de 15 años de edad con gammaglobulinemia ligada al cromosoma X. ⁽³³⁾

Patogénesis

A pesar de la alta prevalencia de HAstV y los avances en la identificación de nuevos genotipos, todavía hay poco conocidos sobre la patogénesis de HAstV especialmente entre los diferentes genotipos. Estudios anteriores demostraron que HAstV aumenta la permeabilidad de las células epiteliales mediante la interrupción de complejos de unión intracelulares. En el tracto intestinal depende estas uniones estrechas son separadas del lumen de la lámina basal, causando la pérdida de la integridad lo cual aumenta la concentración de iones solubles y el tráfico de agua es poco filtrable a través de los compartimentos, lo que reduce la capacidad del intestino para reabsorber agua y nutrientes conduciendo a la diarrea. La enfermedad extra intestinal por HAstV ha sido reportada en humano y animales. ⁽³⁵⁾

Cambios histológicos en infecciones por astrovirus

Modelos humanos. En los individuos con infección sintomática por AstV, se detectaron partículas virales en el bajo de las vellosidades menores y no específicas. En particular, la respuesta inflamatoria fue leve a pesar de una buena evidencia de injerto, y otras reacciones inflamatorias agudas y crónicas. Estos resultados confirman la aparentemente pequeña contribución de daño histológico y la inflamación de la diarrea inducida por astrovirus. ⁽³⁵⁾

Los modelos animales. Aunque la infección por astrovirus se ha demostrado en una variedad de especies, estudios de patogénesis exhaustivas se han limitado a corderos, terneros y pavos. En cada uno de estos sistemas de modelos, la replicación astrovirus se ha demostrado en el intestino delgado, aunque el patrón exacto de la infección y las manifestaciones clínicas de la infección difiere entre animales. ⁽³⁵⁾

Sapovirus

Los sapovirus forman un género de la familia *Caliciviridae*, que también incluye a norovirus. Recibieron su nombre de un brote de diarrea en niños en Sapporo, Japón. La carga de la enfermedad por sapovirus se subestimó durante varias décadas desde su descubrimiento, si bien todos los grupos de edades se ven afectados, los niños menores de cinco años tienen mayor carga de enfermedad. ^(36,37)

Estructura genómica

Sapovirus es un virus sin envoltura, tiene un ARN monocatenario de sentido positivo. El genoma tiene un tamaño de 7,1 a 7,7 kb y tiene una cola poli(A) de tres extremos. El genoma contiene dos marcos abiertos de lectura (ORF). ORF1 codifica una poliproteína grande que contiene las proteínas no estructurales (NS) (NS1, NS2, NS3) seguidas por la proteína de la cápside VP1. ORF2 codifica la proteína menor estructural VP2. VPg está vinculada a el extremo 5' del ARN viral y es fundamental para el genoma de sapovirus (replicación, transcripción y traducción) (Fig.10) ⁽³⁸⁾

Calificación

LA ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) o la región VP1 parcial, se pueden utilizar para caracterizar parcialmente los sapovirus detectados. Se han descrito 19 genogrupos de sapovirus (GI – GXIX) con los genogrupos GI, GII, GIV, GV limitados a humanos (Fig. 11.). En humanos se han descrito un total de 19 variantes genéticas dentro de los genogrupos, denominados genotipos (GI, 1-7; GII.1-8; GV.1 y GC.1-2) ^(36, 37, 38)

Los sapovirus GI y GII se subdividen en siete genotipos cada una (GI.1 a GI.7 y GII.1 a GII.7), GIV se coloca en un solo genotipo (GIV.1) y GV se subdivide en dos genotipos (GV.1 y GV.2). ^(37, 38)

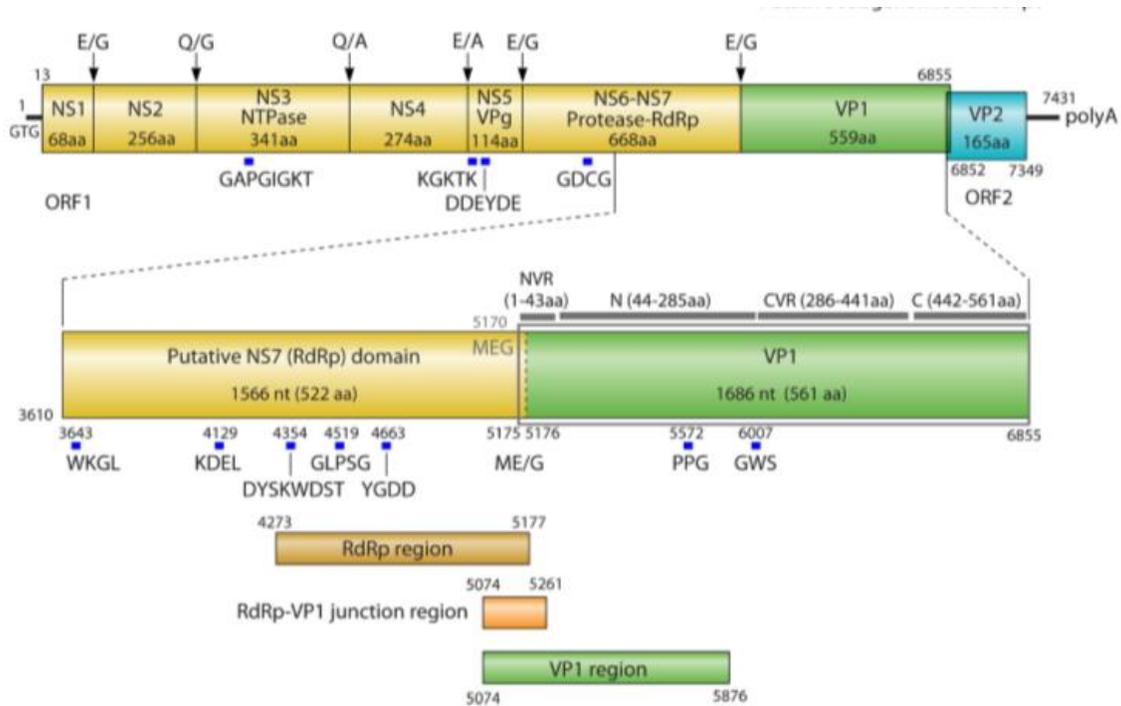


Figura 10. Diagrama de organización del genómica de Sapovirus y las regiones diana de la RT-PCR para los Sapovirus humanos según la cepa GI.1 manchester. Un diagrama esquemático de la organización genómica de Sapovirus, incluida la transcripción subgenómica putativa, dos marcos de lectura abierto comunes (ORF1 Y ORF2), las proteínas no estructurales virales previstas (NS1, NS2, NS3 [NTPasa], NS4, NS5[VPg] y NS6NS[proteasa ARN dependiente de polimerasa de ARN]) y se muestran las proteínas estructurales VP1y VP2. Se indican los sitios de corte putativos en la poliproteína ORF1 y sus tamaños provistos. También se muestran motivos de aminoácido típicos para NS3 (GAPGIGKT), NS5 (KGKTK y DDEYYDE), NS6 (GDCG), NS7 (WKGL,KDEL,DYSKWDST, GLPSG y YGDD) y VP1 (PPG y GWS), se muestra una descripción general de las regiones diana de la RT.PCR (región RdRp, región de unión RdRp-VP1 y la región VP1) ,la poliproteína ORF1 también se muestra con sus posiciones de nucleótidos.

(38)

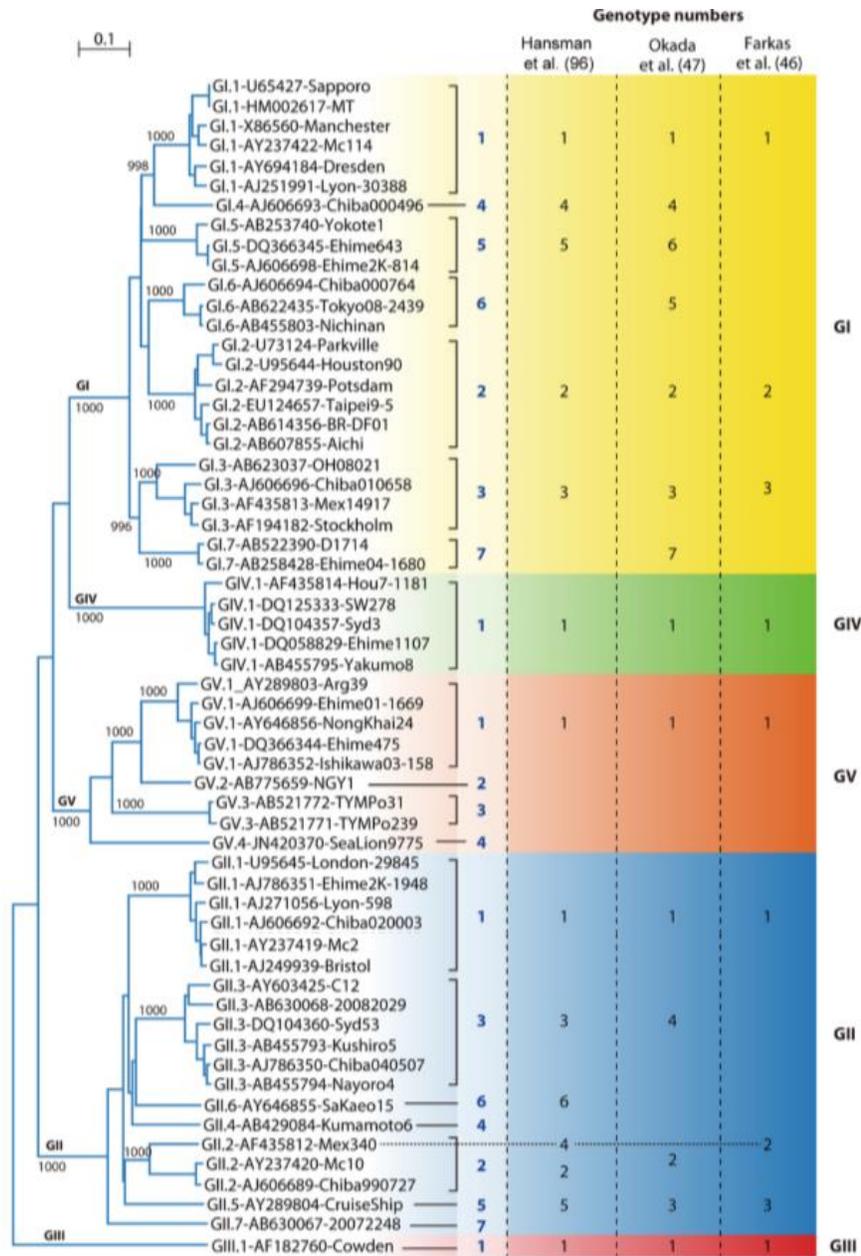


Figura 11. Genogrupos y genotipos de sapovirus: GI, GII, GIII, GIV y GV basado en la secuencia completa de nucleótidos de VP1. El árbol filogenético se basa en las secuencias de nucleótidos de VP1 completas (aproximadamente 1,60 nt) de un total de 59 cepas de sapovirus (que representan 58 cepas de sapovirus correspondientes a todos los genotipos dentro de GI, GII, GIV y GV y una cepa porcina que representa GIII).⁽³⁸⁾

Transmisión

Se cree que sapovirus se transmite de persona a persona a través de la intrusión de aguas residuales en fuentes de agua potable y a través de alimentos contaminados, además el hacinamiento en el hogar y contacto reciente con personas con enfermedades gastrointestinales. Entre la transmisión alimentaria los mariscos son una fuente reconocida de infecciones por sapovirus. ⁽³⁷⁾

Epidemiología

El periodo de incubación varía de 1 día a 4 días, y la mortalidad por sapovirus es extremadamente baja. Sapovirus se ha notificado principalmente en guarderías, escuelas, en instituciones militares, hospitales y hogares para ancianos. ^(37,38)

La frecuencia de detección de sapovirus es variable entre ubicaciones geográficas y grupos de edades, pero se ha informado que está asociado con 1% a 17% de los casos de diarrea en diferentes entornos. ⁽³⁷⁾ Los sapovirus se han detectado en todo el mundo (en más de 35 países), y se han reportado casos de gastroenteritis esporádica causada por cepas de Sapovirus. ^(37,38) En las infecciones subclínicas (asintomáticas), se observó que las personas infectadas excretan virus en niveles comparables a las personas con gastroenteritis. ⁽³⁸⁾

Durante el periodo prolongado de excreción (25 días a 28 días después del inicio de la enfermedad) en algunos individuos en brotes, se han identificado sustituciones de nucleótidos en la región codificante de VP1 y este puede ser un posible mecanismo para la generación de nuevas cepas variantes de sapovirus. Además, se ha detectado sapovirus en pacientes inmunocomprometidos que presentan diarrea. ⁽³⁸⁾

En Nicaragua en el periodo de Junio del 2017 hasta julio del 2019 se identificaron 63 episodios de gastroenteritis atribuidas a sapovirus. ⁽³⁹⁾

Manifestaciones clínicas

Los síntomas clínicos de la infección por sapovirus son similares a otros virus intestinales. Los síntomas incluyen diarrea y vómitos, también se pueden presentar náuseas, calambres estomacales/abdominales, escalofríos, dolor de cabeza, mialgia o malestar general. Al igual

que el caso de la enfermedad por norovirus la fiebre es un síntoma clínico raro, la diarrea generalmente se resuelve en 1 semana. ^(37,38)

En general, la gravedad de la gastroenteritis por sapovirus es más leve que la de rotavirus y norovirus, los síntomas suelen ser autolimitados y los pacientes suelen recuperarse dentro de un par de días. ⁽³⁸⁾

VII. DISEÑO METODOLOGICO

Tipo de estudio: Descriptivo de corte transversal

Área de estudio: Mercado La Terminal – León, ubicado en la sexta calle noreste (NE) de la ciudad de León, al costado oeste de la Terminal de buses en el reparto primera de mayo.

Muestra: se tomaron cuatro diferentes puestos que expendían productos como carnes, mariscos, lácteos y frutas

Unidad de análisis: *Musca domestica* capturadas en los diferentes puestos seleccionados durante los meses de Junio y Septiembre del 2020.

Fuente y recolección de información

La información sobre las condiciones higiénicas sanitarias que presentaba el puesto o área cercana se obtuvo mediante el llenado de fichas por medio de la observación (**Ver anexo I**)

Aspectos Éticos

Se les solicitó permiso a los comerciantes dueños de cada tramo para la colocación de las trampas atrapa moscas, con la debida explicación del propósito del estudio y con la garantía de que los resultados obtenidos son exclusivamente con fines académicos.

Procesamiento de las muestras:

I. Optimización de método para la detección de virus gastrointestinales en *Musca domestica*

Capturas de las moscas. Para la captura de las moscas se utilizaron trampas comerciales marca *Convenientools* para usos de exteriores (**Ver anexo II**), fueron colocadas a una altura de 1.50 metros por un tiempo de 30 minutos en zonas donde la población de estos dípteros era más abundante. Pasado los 30 minutos las trampas fueron retiradas y plegadas sobre sí misma, con cuidado de no aplastar las moscas, se transportaron a temperatura ambiente al Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León.

Solución de contaminación: se realizaron pools de los diferentes virus gastrointestinales rotavirus, sapovirus, astrovirus y norovirus, a partir de muestras de heces previamente

analizadas mediante el método molecular Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En un volumen de 1 ml de PBS 1X se agregó una pequeña porción de heces positiva para los diferentes virus mencionados anteriormente, sin embargo no se determinó la carga viral en los pools. Luego se homogenizo mediante vortex.

Exposición de moscas ante solución de contaminación: Se contaminó la superficie de tres platos petri divididos en dos secciones (sección 1 y 2) y posteriormente se expusieron las moscas ante esta superficie.

Cantidad de moscas expuestas: en cada sección se expusieron una cantidad diferente de moscas, en la sección 1 - 3 moscas, sección 2 - 6 moscas.

Tiempo de exposición: en cada caja petri se tomó un intervalo de tiempo diferente siendo en la caja 1 - 2 minutos, caja 2 - 4 minutos.

Separación de partículas virales de la superficie de *Musca domestica*: luego de transcurrido cada tiempo de exposición, las moscas se transfirieron a viales con un volumen de 1 ml de PBS 1X, se dio vortex para separar las posibles partículas virales adheridas al exoesqueleto de las moscas.

Solución para extracción y amplificación de ácidos nucleicos: se retiraron las moscas de los viales y la solución resultante se utilizó para realizar el proceso de extracción y purificación de ARN, seguido del proceso de amplificación de los ácidos nucleicos mediante el método de Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real (RT- PCR).

Extracción de ARN: El ARN viral fue extraído de la solución mencionada anteriormente, mediante el uso del kit QIAmp (**QIAmp, cat. No 52906**) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se tomaron 140 ul de muestra y se mezclaron con una solución que contiene sales caotrópicas que favorece la unión de los ácidos nucleicos a la membrana de sílice, luego se realizaron dos pasos de lavado (buffer de lavado 1 [AW1] y 2 [AW2]) permitiendo remover sales, proteínas y otras impurezas. Finalmente, los ácidos nucleicos fueron eluidos con un buffer libre de nucleasas y concentraciones bajas de sal (AVE). Al final se obtuvo un volumen de 50 ul de ARN aislado, se guardó a -20°C hasta su posterior análisis. (Ver Anexo III)

RT-PCR para la detección de gastrovirus modificado por Liu et.al 2013 y adaptado del CDC: Se preparó el master mix utilizando la mezcla AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents, con un volumen total de 20ul, el cual está conformado por 12.5 ul de 2X RT-PCR Buffer, 1 ul de primers, 1 ul de Enzima 25X RT-PCR Mix, y 5.5 ul de agua libre de nucleasas. Posteriormente se colocaron los 20 ul del Master Mix y 5 ul del ARN aislado en cada pozo de la placa. Finalmente se selló la placa y se corrió el siguiente programa:

A). 10 min a 50°C (Temperatura de la Transcripción reversa).

B). 10 min a 95°C (Activación de la Taq Polimerasa).

C). 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min a 60°C (Ver anexo IV)

Se consideraron positivos los resultados con valores ct iguales o menores a 35 en caso de sapovirus, 37 norovirus GII y 38 en caso de rotavirus. Valores inferiores a estos indican una mayor carga viral.

II. Simulación de la transmisión de norovirus por *Musca domestica*

Con la finalidad de simular la posible transmisión de virus gastrointestinales por *Musca domestica*, se introdujeron cierta cantidad de moscas vivas con la capacidad de poder volar en un sistema cerrado, dentro de este sistema se introdujeron dos tomates ya que es uno de las verduras consumidas cotidianamente. Antes de su uso, estos fueron esterilizados mediante radiación Ultravioleta (UV), posteriormente uno de ellos fue contaminado con una suspensión preparada a partir de heces positivas para norovirus, y se introdujeron en el sistema a una distancia de 20 cm durante un cierto periodo de tiempo permitiendo a las moscas entrar en contacto con el tomate contaminado y el tomate estéril. Este proceso se realizó por triplicado variando en la cantidad de moscas introducidas en el sistema y el tiempo de exposición de estas; en la primera prueba se utilizó una cantidad de 6 moscas exponiéndolas por un periodo de 10 minutos y en la segunda prueba se duplico la cantidad de moscas y el tiempo de exposición siendo 12 moscas por 20 minutos de exposición, en la tercera etapa la cantidad de moscas se triplico e igual el tiempo, siendo 24 moscas y 30 minutos, posterior a cada proceso y transcurrido el tiempo de exposición se tomaron los dos tomates para ser analizados. Se muestreo la superficie de cada tomate mediante el uso de un hisopo estéril previamente humedecido en PBS 1X, y posteriormente este fue sumergido en

un vial que contenía 560 µl de buffer de lisis AVL para liberar las posibles partículas virales presentes. Seguido se procedió a realizar el proceso de extracción de ácidos nucleicos y RT-PCR como se describió anteriormente

III. Estudio de campo.

Muestreo: se realizaron dos muestreos de los puestos seleccionados en dos periodos distintos.

Capturas de las moscas: al igual que en el estudio experimental las moscas fueron atrapadas mediante el uso de trampas comerciales marca *Convenientools*, se colocó una trampa por puesto, ubicadas a una altura de 1.50 a 2 metros del suelo, cercanas al producto comercializado, sin que ésta obstruyera el desempeño del comerciante, y se dejaron por un periodo de 30 minutos.

Transporte y almacenamiento: luego de transcurrido el tiempo las trampas fueron retiradas y plegadas sobre sí mismas, se transportaron a temperatura ambiente al Laboratorio de Microbiología y Parasitología del campus Medico de la UNAN León. Una vez en el laboratorio se procedió a la realización de los diferentes pooles y el etiquetado de las muestras. Los pooles fueron realizados con un número de 5 a 6 moscas con un volumen 1 ml de PBS 1X, y se almacenaron a una temperatura de – 20°C hasta el momento de su procesamiento.

Procesamiento de las muestras: la solución de PBS que contenía cada pool de moscas fue utilizado para realizar la extracción del ácido nucleico y RT-PCR, como se describió anteriormente en el acápite de “**Optimización de un método para la detección de virus gastrointestinales**”.

OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES

Variable	Definición	Indicador
Agentes virales en estudio		
Sapovirus	Moscas presentes en sitio de muestreo	Positivo Negativo
Rotavirus	Virus causante de gastroenteritis	Positivo Negativo
Norovirus	Virus causante de gastroenteritis	Positivo Negativo
Astrovirus	Virus causante de gastroenteritis	Positivo Negativo
Puestos elegidos para estudio		
Puestos	Puestos seleccionado para el muestreo	Mariscos Carnes Queso Frutas
Condiciones higiénicas sanitarias del puesto		
Presencia de basureros	Basureros o cúmulos de basura en el puesto o cercanos a este	No Si.
Aguas residuales	Aguas de desecho que fluyen o están estancadas frente o cerca a los apuestos	Si No
Presencia de animales	Perros Caballos	Si No
Presentación de productos comercializados	Forma en que el comerciante presenta su producto al público	Cubierto (bolsa , mantel de tela) En vitrinas Ninguna de la anteriores
Manipulación del producto comercializado	Manera de manipular el producto expendido	Guantes Bolsa Ninguna de las anteriores
Mecanismo de regulación de las densidades móscales	Producto químicos o instrumentos utilizado para disminuir el número de moscas	Insecticidas Cintas adhesivas para moscas Matas moscas Ninguna de las anteriores

VIII. RESULTADOS

El siguiente estudio se realizó en dos fases, la primera consistió en dos experimentos para evaluar la capacidad de transporte y la posible transmisión de virus gastrointestinales por *Musca domestica* entre superficies inertes y la segunda fase consistió en la detección de virus gastrointestinales en moscas provenientes del Mercado La Terminal en los periodos de Junio – Septiembre del 2020.

Optimización de un método molecular para detección de gastrovirus en la superficie de *Musca domestica*: Para investigar la capacidad de transporte de las partículas virales de los diferentes gastrovirus por las moscas, se realizó un ensayo experimental donde se expusieron diferentes cantidades de *Musca domestica* por tiempos definidos ante los diferentes gastrovirus. Se logró la detección de norovirus y rotavirus sobre la superficie de las moscas. La detección de norovirus no se vio influenciada por el tiempo (2-6 minutos de exposición) ni por la cantidad de moscas expuestas a la superficie contaminada (3 -6 moscas), dado que se detectó en todos los ensayos realizados. Sin embargo, rotavirus se detectó únicamente en los ensayos en los cuales se duplicaron la cantidad de moscas (6 moscas) y el tiempo de exposición (4-6 minutos), en caso de sapovirus y astrovirus no se lograron detectar siendo posible que se necesitara un mayor tiempo de exposición o un mayor número de vectores (Tabla 1)

Simulación de la transmisión de norovirus por *Musca domestica*: Una vez demostrado que las moscas son capaces de transportar partículas virales de norovirus en su superficie, se decidió estudiar si estas eran capaces de transmitir las partículas de norovirus entre superficies. Para este ensayo se utilizaron dos superficies, una de las superficies fue contaminada con una suspensión de norovirus (realizada a partir de una muestra de heces), mientras que la segunda superficie permaneció estéril. Se estudiaron las moscas implicadas en el experimento, de igual forma se muestrearon las superficies mediante el uso de un hisopo de dacrón. (Figura 1)

Durante el experimento se observó que las moscas se posaban ocasionalmente sobre las superficies en estudio, sin embargo, durante el curso del experimento las moscas no permanecían por un tiempo mayor a un minuto sobre las superficies. Además, se observó que

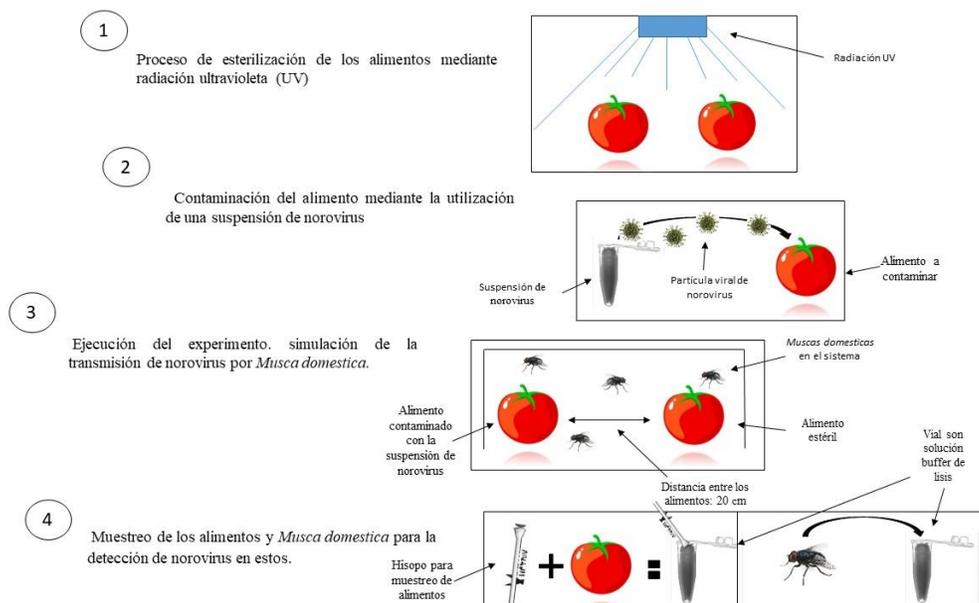
luego del contacto de las moscas con la superficie contaminada estas no se posaban directamente sobre la superficie estéril, entrando en contacto primeramente con la superficie del sistema cerrado. No se logró detectar las partículas virales de norovirus en las moscas utilizadas en el experimento, de igual forma no se detectó las partículas virales de norovirus sobre las superficies estudiadas.

Tabla N° 1. Parámetros evaluados para la detección de gastrovirus sobre la superficie de *Musca doméstica*,

Cajas	Tiempo (minutos)	# de moscas	Gastrovirus			
			Norovirus	Rotavirus	Astrovirus	Sapovirus
1	2	3	+	-	-	-
		6	+	-	-	-
2	4	3	+	-	-	-
		6	+	+	-	-
3	6	3	+	+	-	-
		6	+	+	-	-

P:+ N: -

Figura 1. Esquema de ensayo experimental simulación de la transmisión de norovirus por *Musca doméstica* entre superficies.



Densidad de moscas en los puestos estudiados del Mercado La Terminal de la ciudad de León durante los meses de Junio- Septiembre del 2020. Se seleccionaron cuatro puestos del Mercado la Terminal: mariscos, carnes, lácteos y frutas, en cada puesto seleccionado se ubicaron trampas para la recolección de las moscas presentes en estos. La cantidad de moscas obtenidas por cada puesto en los dos periodos de estudio fue 0 hasta 18 moscas en un tiempo de 30 minutos. Las moscas fueron agrupadas en pools, cada pool constó de una cantidad de 5 a 6 moscas almacenadas en un volumen de 1 ml de buffer PBS 1X. En aquellos puestos donde la densidad de moscas era más elevada se realizaron un máximo de hasta tres pools. (Figura.2)

Durante el mes de Junio se observó una mayor densidad de moscas obteniéndose un total de 8 muestras (pools de moscas) en comparación a las 5 muestras obtenidas en el mes de Septiembre. Los puestos donde se presentó una mayor densidad de mosca fueron los que distribuían mariscos y carnes, en los cuales se alcanzó a obtener hasta tres muestras por puesto. El puesto que presento una menor densidad de moscas fue donde se distribuían frutas, siendo que durante el mes de Septiembre no se capturaron moscas en un periodo de 30 minutos. (Figura. 2)

Prevalencia de gastrovirus en muestras de los puestos estudiados del Mercado la Terminal. De los puestos seleccionados para el estudio durante los periodos de muestreo se colectaron un total de trece muestras, las cuales se analizaron para cada gastrovirus en estudio (norovirus, rotavirus, sapovirus y astrovirus). Se encontró la presencia de rotavirus en un 38% (n=5) y norovirus en un 23% (n=3) (Grafico 1). Además, se encontró una de las muestras estudiadas, positiva para norovirus y rotavirus. Astrovirus y sapovirus no fueron detectados en las muestras analizadas. Al relacionar las muestras positivas con los puestos, se encontró que 2 de ellos fueron positivos para norovirus y rotavirus siendo estos los que distribuían mariscos y carnes. Estos puestos fueron positivos durante los dos periodos de estudio, sin embargo, durante el segundo periodo de estudio (septiembre) solamente se detectó rotavirus (Tabla 2).

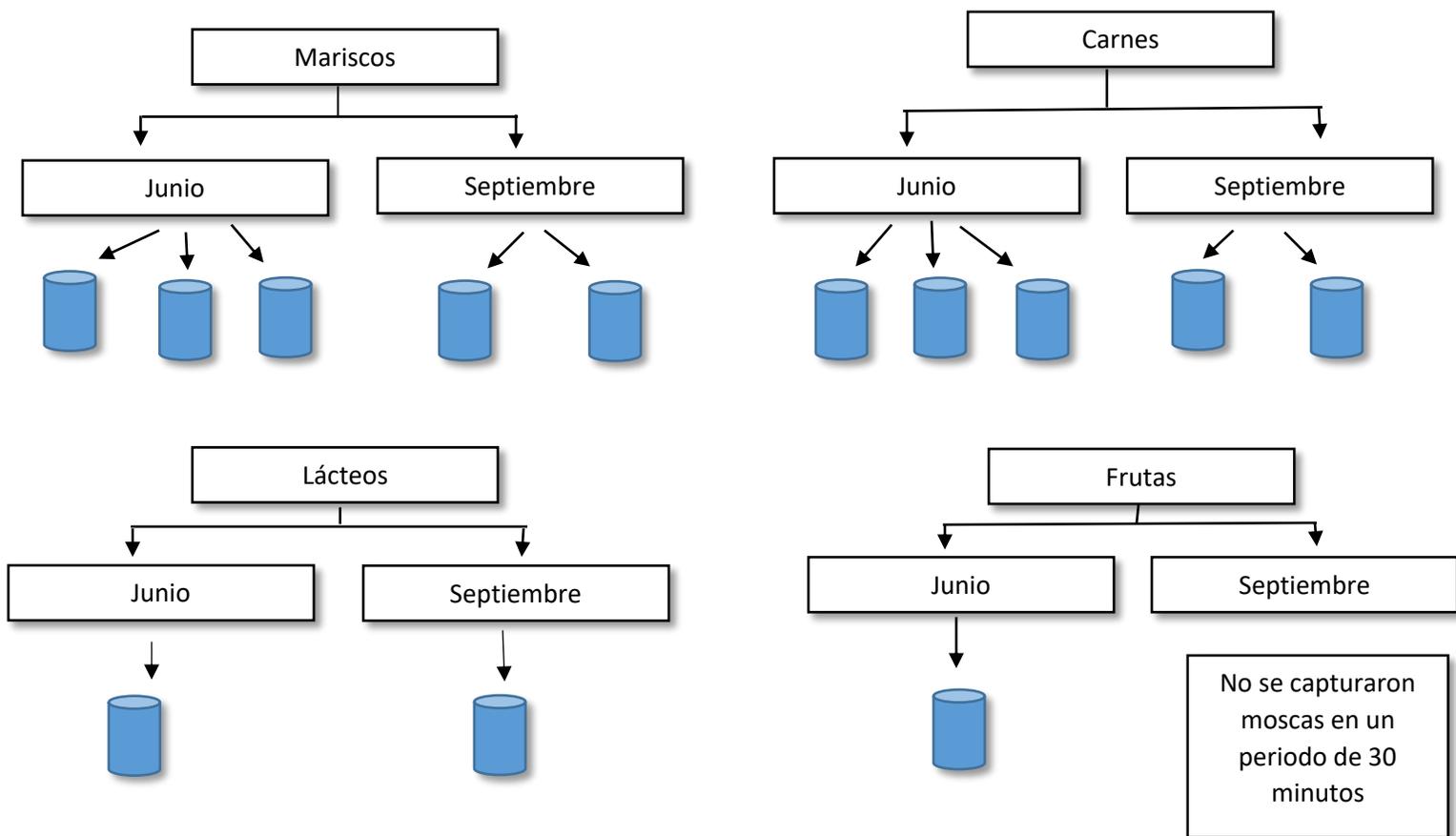


Figura 2. Puestos muestreados en los periodo Junio-Septiembre del 2020: en la siguiente figura se muestran los puestos del Mercado la Terminal de la ciudad de León que fueron muestreados en los dos periodos de Junio y Septiembre, se observa la cantidad de muestras obtenidas en cada puesto por periodo de muestreo (las muestras se reflejan como las figuras cilíndricas). Los puestos donde se muestran mayor número de muestras son proporcional a una mayor densidad de moscas.

Tabla 2. Presencia de gastrovirus en puestos del Mercado la Terminal de la ciudad de León, en los periodos Junio – Septiembre 2020.

Puestos estudiados	Periodo de estudio							
	Junio				Septiembre			
	norovirus	rotavirus	astrovirus	sapovirus	norovirus	rotavirus	astrovirus	sapovirus
Mariscos	+	+	-	-	-	+	-	-
Carnes	+	+	-	-	-	+	-	-
Lácteos	-	-	-	-	-	-	-	-
Frutas	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Positivo, - : Negativo

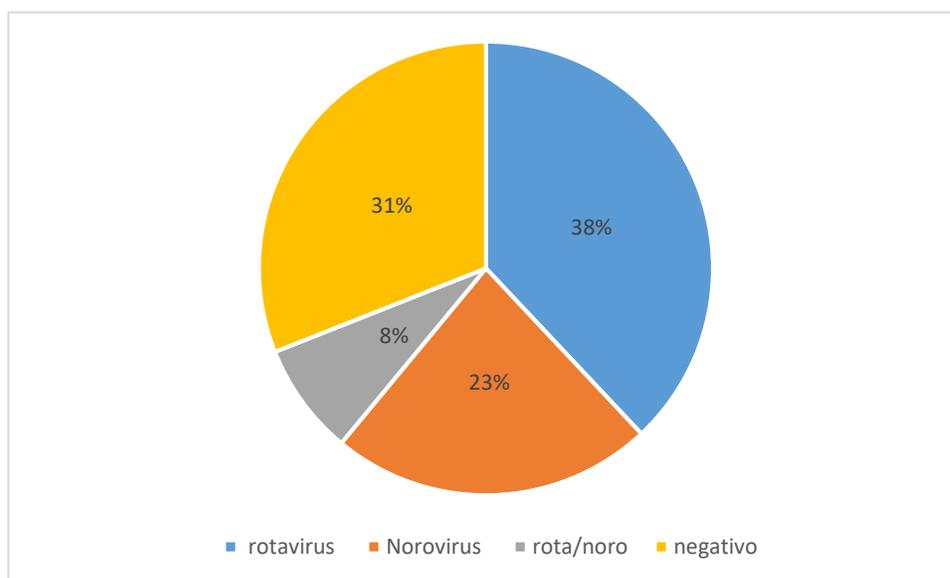


Grafico N° 1. Gastrovirus detectados en muestras de moscas obtenidas del Mercado La Terminal-León en el periodo de Junio- Septiembre del 2020.

Condiciones higiénicas sanitarias de puestos muestreados. El Mercado la Terminal León se caracteriza por ser uno de los mercados más visitados por la población leonesa. Se estudiaron las condiciones higiénicas sanitarias de cada uno de los puestos seleccionados en el estudio para establecer una posible relación con la alta densidad de moscas y por lo tanto la presencia de gastrovirus.

Las principales características higiénicas sanitarias más deficientes encontradas en los cuatro puestos muestreados fue: la presencia de basura contiguo a los puestos o cercana a estos, la circulación de moscas, presentándose una mayor población de moscas en los puestos que expendían mariscos y carnes en comparación a los puestos de frutas y lácteos, la presencia de aguas residuales se observó únicamente en el puesto de mariscos, ninguno de los puestos seleccionados utilizaba el lavado de manos o algún tipo de protección para la manipulación del producto, de igual forma no se utilizaba ningún producto para la regulación de las densidades moscales.

IX. DISCUSIÓN

Algunos estudios han evaluado la capacidad de *Musca domestica* para transportar y transmitir diferentes agentes virales ^(9, 10, 11), sin embargo, en nuestro país no hay reportes del posible papel de estas como transportadoras o trasmisoras de distintos agentes virales causantes de gastroenteritis.

Con el propósito de evaluar el papel de las moscas en el transporte de los virus gastrointestinales más prevalentes en Nicaragua se llevó a cabo un experimento en el cual las moscas fueron expuestas a una suspensión que contenía partículas virales de rotavirus, norovirus, sapovirus y astrovirus. Se evidenció que estas eran capaces de transportar las partículas virales de norovirus y rotavirus sobre su superficie, al igual que lo reportado en el estudio realizado por *Tan SW y colaboradores*, en el cual se demostró la capacidad de las patas de *Musca domestica* en la captación de partículas virales de rotavirus, sin embargo, no se encontró estudios *in vitro* donde se evalúe la capacidad de estas en transportar partículas virales de norovirus. ⁽⁹⁾ Este hallazgo es de gran importancia, ya que abre la posibilidad de que la mosca sea potencial vector de estos agentes y contribuyan durante brotes epidémicos, sobre todo en condiciones insalubres que propician el aumento de las poblaciones de moscas.

Habiendo demostrado que *Musca domestica* es capaz de transportar partículas virales de rotavirus y norovirus sobre su superficie, se hace necesario investigar la transmisión de estos agentes a fómites o directamente al hombre. Para esto se llevó a cabo un ensayo experimental en el cual las moscas no fueran manipuladas y estas adquirieran y transmitieran las partículas de norovirus de forma natural. No se logró evidenciar la transmisión de las partículas virales de norovirus por las moscas ni se detectaron en las superficies estudiadas. Muchos factores pudieron contribuir a esto, entre ellos podría ser el poco tiempo de contacto de las moscas con las superficies en estudio, ya que se observó que durante el curso del ensayo las moscas se posaban por mayor tiempo sobre las paredes del sistema cerrado y ocasionalmente sobre las superficies en estudio, otro factor tomado en cuenta fue el método de contaminación o recuperación de las partículas virales de las superficies, donde en los dos procedimientos se utilizaron hisopos de dacrón, pudiendo llegar a disminuir la cantidad de partículas virales de norovirus adicionadas al sistema.

El estudio de campo se llevó a cabo con la finalidad de demostrar que las moscas que circulaban en uno de los mercados con condiciones insalubres podrían estar contaminadas con los diferentes gastrovirus. La presencia de rotavirus y norovirus en dos de los cuatro puestos estudiados comprueba que las moscas son transmisores o portadoras de estos virus. Un hallazgo similar fue reportado en el estudio realizado por *Collinet-Adler* en India, donde detectaron distintos agentes patógenos causantes de gastroenteritis incluidos rotavirus y norovirus. ⁽⁸⁾ Aunque la detección de los gastrovirus no se realizó en muestras de heces de los comerciantes de los puestos estudiados, diferentes estudios comprueban que norovirus, sapovirus y rotavirus son los agentes virales más comunes causante de gastroenteritis en Nicaragua. ^(40, 41,42) La ausencia de sapovirus y astrovirus sobre la superficie de *Musca domestica* podría estar relacionado a que no hubo circulación de estos virus durante los meses de estudio, o que la concentración de las partículas virales era demasiado baja.

La naturaleza sinantrópica de *Musca domestica* la convierte en un vector ideal para diferentes patógenos virales causantes de gastroenteritis, sin embargo, no se logró evidenciar la transmisión de norovirus a la superficie de un alimento durante el ensayo experimental. En condiciones ambientales naturales este hecho es más difícil de comprobar, aunque no se puede descartar, para ello sería necesario estudiar los alimentos expendidos en los puestos, de igual forma a los comerciantes o personal involucrado en la manipulación del producto expendido. En congruencia con lo que sugiere *Collinet- Adler y colaboradores* las moscas pueden adquirir estos patógenos de humanos que están infectados de otra fuente y, por lo tanto, pueden servir como marcadores en lugar de ser una causa de enfermedad humana ⁽⁸⁾.

Distintas condiciones propician el aumento o disminución de las densidades moscales, la temperatura, humedad, presencia de materia orgánica son factores determinantes para el desarrollo del ciclo biológico de *Musca domestica* ya que estos pueden acelerar o retrasar este proceso ^(11, 12). El departamento de León posee un clima tropical seco con un verano e invierno definidos, los meses en los cuales se realizaron los muestreos presentan climas distintos, el mes de Junio marca el inicio de temporada lluviosa y suele presentar precipitaciones ocasionales, por otro lado, el mes de Septiembre es el mes con más precipitaciones del año. Las condiciones climáticas presente en estos meses reflejan los cambios de densidades moscales encontradas en el estudio, durante el mes de Junio la

humedad y temperatura son más aptas para un desarrollo óptimo del ciclo de vida de *Musca domestica*, en comparación al mes de Septiembre que presenta demasiada humedad y por lo tanto el ciclo de estas se ve prolongando. ⁽⁴³⁾

X. CONCLUSIONES

- Se logró evidenciar que *Musca domestica* es capaz de transportar norovirus y rotavirus sobre su superficie *in vitro*.
- No se logró evidenciar la transmisión de norovirus por *Musca domestica* de una superficie contaminada hacia superficie estéril *in vitro*.
- Las moscas colectadas en el Mercado La Terminal de la ciudad de León se encontraban contaminadas con rotavirus y norovirus durante los meses de Junio y Septiembre del año 2020.
- Las condiciones higiénicas sanitarias del Mercado La Terminal fueron deficientes y podrían contribuir a la diseminación de los gastrovirus a través de las moscas.

XI. RECOMENDACIONES

- Realizar nuevos experimentos en el cual se ajusten nuevas condiciones que permita optimizar la recuperación de las partículas de las superficies expuestas, de igual forma poder analizar la cantidad de partículas virales que pueden adquirir las moscas.
- Llevar a cabo un estudio de campo con un mayor número de puestos a muestrear. De igual forma hacer un muestreo en las personas que manipulan el producto expendido y en los diferentes productos para comprender la transmisión de los diferentes virus.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Gorter AC, Sánchez G, Pauw J, Pérez RM, Sandiford P, Davey Smith G. Diarrea infantil en la Nicaragua rural: creencias y prácticas de salud tradicionales. Bol Oficina Sanit Panam OSP1195nov 1995; Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/15536>
2. Vargas M, Gascon J, Casals C, Schellenberg D, Urassa H, Kahigwa E, et al. Etiology of diarrhea in children less than five years of age in Ifakara, Tanzania. Am J Trop Med Hyg. 2004;70(5):536-9.
3. Avila L, M; TESIS ROTAVIRUS Y ADENOVIRUS. Disponible en: <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17844/1/TESIS%20ROTAVIRUS%20Y%20ADENOVIRUS.pdf>
4. Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H, et al. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. Microbiol Immunol. 2005;49(2):121-8.
5. Muñoz DJ. Bacterial and Parasite Agents in Adult Housefly *Musca domestica* Collected in El Peñón, Sucre State, Venezuela. :9.
6. Nadeem Abbas M. House fly (*Musca domestica*), a challenging pest; biology, management and control strategies. Elixir Entomol. 1 de enero de 2013;64:19333-8
7. Pablo C M saide. Importancia de las moscas como vectores potenciales de enfermedades diarreicas en humanos. Disponible en: <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=22109>
8. Collinet-Adler S, Babji S, Francis M, Kattula D, Premkumar PS, Sarkar R, et al. Environmental Factors Associated with High Fly Densities and Diarrhea in Vellore, India. Appl Environ Microbiol. Septiembre de 2015;81(17):6053-8.

9. Tan SW, Yap KL, Lee HL. Mechanical transport of rotavirus by the legs and wings of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). J Med Entomol. Septiembre de 1997;34(5):527-31.
10. Barin A, Arabhazaeli F, Rahbari S, Madani S. A. The housefly, *Musca domestica*, as a possible mechanical vector of Newcastle disease virus in the laboratory and field - PMC Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168502/>
11. Klowden M, Greenberg B. House fly and Drosophila cell cultures as hosts for human enteroviruses. J Med Entomol. agosto de 1974;11(4):428-32.
12. Haddow AD, Nasar F, Schellhase CW, Moon RD, Padilla SL, Zeng X, et al. Low potential for mechanical transmission of Ebola virus via house flies (*Musca domestica*). Parasit Vectors. 3 de mayo de 2017;10(1):218.
13. Yalda Lucero A. Etiología y manejo de la gastroenteritis aguda infecciosa en niños y adultos. Rev Médica Clínica Las Condes. 1 de mayo de 2014;25(3):463-72.
14. Binka E, Vermund SH, Armah GE. Rotavirus diarrhea among children less than 5 years of age in urban Ghana. Pediatr Infect Dis J. agosto de 2011;30(8):716-8.
15. Chia Linnaeus, 1958. Disponible en: <https://www.gbif.org/es/species/4882533>
16. 12_-_boletin_mosca_domestica_web.pdf. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/12_-_boletin_mosca_domestica_web.pdf
17. Cardiel Hernández Blanca Yadira.pdf [Internet]. [citado 27 de abril de 2022]. Disponible en:<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/46233/Cardiel%20Hern%C3%A1ndez%20Blanca%20Yadira.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
18. Desselberger U. Rotaviruses. Virus Res. 22 de Septiembre de 2014;190:75-96.
19. Suzuki H. Rotavirus Replication: Gaps of Knowledge on Virus Entry and Morphogenesis. Tohoku J Exp Med. agosto de 2019;248(4):285-96.

20. Salud OP de la. Vigilancia epidemiológica de diarreas causadas por rotavirus: guía práctica [Internet]. OPS; 2007 [citado 27 de abril de 2022]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/49140>
21. Orozco M, Vasquez J, Pedreira C, De Oliveira LH, Amador JJ, Malespin O, et al. Uptake of rotavirus vaccine and national trends of acute gastroenteritis among children in Nicaragua. *J Infect Dis.* 1 de noviembre de 2009;200 Suppl 1:S125-130.
22. Becker-Dreps S, Meléndez M, Liu L, Zambrana LE, Paniagua M, Weber DJ, et al. Community diarrhea incidence before and after rotavirus vaccine introduction in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* agosto de 2013;89(2):246-50.
23. Granera Salgado TG. Caracterización clínico-epidemiológica de diarrea aguda con sospecha por rotavirus en menores de 5 años en Hospital Alemán Nicaragüense en 2015 y 2016 [Internet] [other]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua; 2017 [citado 27 de abril de 2022]. Disponible en: <https://repositorio.unan.edu.ni/4469/>
24. Bucardo F, Mercado J, Reyes Y, González F, Balmaseda A, Nordgren J. Large increase of rotavirus diarrhoea in the hospital setting associated with emergence of G12 genotype in a highly vaccinated population in Nicaragua. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* Junio de 2015;21(6):603.e1-7.
25. Bucardo-Rivera F. Pediatric rotavirus and norovirus diarrhea in Nicaragua. [Stockholm]: Karolinska institutet; 2008.
26. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus Gastroenteritis. *N Engl J Med.* 29 de octubre de 2009;361(18):10.1056/NEJMra0804575.
27. Campillay-Véliz CP, Carvajal JJ, Avellaneda AM, Escobar D, Covián C, Kalergis AM, et al. Human Norovirus Proteins: Implications in the Replicative Cycle, Pathogenesis, and the Host Immune Response. *Front Immunol.* 2020 11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00961>

28. Zheng D-P, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. 15 de marzo de 2006;346(2):312-23.
29. P C, M de G, Gi P, Mc C, K G, V M, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol* [Internet]. octubre de 2019 [citado 30 de abril de 2022];100(10). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31483239/>
30. Ykema M, Tao YJ. Structural Insights into the Human Astrovirus Capsid. *Viruses*. mayo de 2021;13(5):821.
31. Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N, et al. Molecular Epidemiology of Astrovirus Infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol*. enero de 2002;40(1):133-9.
32. Arias CF, DuBois RM. The Astrovirus Capsid: A Review. *Viruses*. 19 de enero de 2017;9(1):15.
33. Vu D-L, Bosch A, Pintó RM, Guix S. Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond. *Viruses*. 18 de febrero de 2017;9(2):33.
34. Moser LA, Schultz-Cherry S. Pathogenesis of astrovirus infection. *Viral Immunol*. 2005;18(1):4-10.
35. Johnson C, Hargest V, Cortez V, Meliopoulos VA, Schultz-Cherry S. Astrovirus Pathogenesis. *Viruses*. 22 de enero de 2017;9(1):E22.
36. Becker-Dreps S, González F, Bucardo F. Sapovirus: an emerging cause of childhood diarrhea. *Curr Opin Infect Dis*. octubre de 2020;33(5):388-97.
37. Becker-Dreps S, Bucardo F, Vinjé J. Sapovirus: an important cause of acute gastroenteritis in children. *Lancet Child Adolesc Health*. noviembre de 2019;3(11):758-9.
38. Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev*. enero de 2015;28(1):32-53.

39. Vielot N, González F, Reyes Y, Zepeda O, Blette B, Paniagua M, et al. Risk Factors and Clinical Profile of Sapovirus-Associated Acute Gastroenteritis in Early Childhood: A Nicaraguan Birth Cohort Study. *Pediatr Infect Dis J*. 1 de marzo de 2021;40(3):220-6
40. Reyes Y, González F, Gutiérrez L, Blandón P, Centeno E, Zepeda O, Toval-Ruíz C, Lindesmith LC, Baric RS, Vielot N, Diez-Valcarce M, Vinjé J, Svensson L, Becker-Dreps S, Nordgren J, Bucardo F. Secretor Status Strongly Influences the Incidence of Symptomatic Norovirus Infection in a Genotype-Dependent Manner in a Nicaraguan Birth Cohort. *J Infect Dis*. 2022 Jan 5;225(1):105-115. doi: 10.1093/infdis/jiab316. PMID: 34129046; PMCID: PMC8730499
41. Bucardo F, Mercado J, Reyes Y, González F, Balmaseda A, Nordgren J. Large increase of rotavirus diarrhoea in the hospital setting associated with emergence of G12 genotype in a highly vaccinated population in Nicaragua. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Jun;21(6):603.e1-7. doi: 10.1016/j.cmi.2015.01.022. Epub 2015 Feb 9. PMID: 25677631
42. Vielot NA, González F, Reyes Y, Zepeda O, Blette B, Paniagua M, Toval-Ruíz C, Diez-Valcarce M, Hudgens MG, Gutiérrez L, Blandón P, Herrera R, Cuadra EC, Bowman N, Vilchez S, Vinjé J, Becker-Dreps S, Bucardo F. Risk Factors and Clinical Profile of Sapovirus-associated Acute Gastroenteritis in Early Childhood: A Nicaraguan Birth Cohort Study. *Pediatr Infect Dis J*. 2021 Mar 1;40(3):220-226. doi: 10.1097/INF.0000000000003015. PMID: 33464013; PMCID: PMC7878336.
43. Clima de la ciudad de León. Disponible en:<https://es.weatherspark.com/y/14373/Clima-promedio-en-Le%C3%B3n-Nicaragua-durante-todo-el-a%C3%B1o>

XI. ANEXOS



ANEXOS I

Ficha de selección de datos

TRABAJO INVESTIGATIVO PARA OPTAR AL TITULO EN LIC. EN BIOANALISIS CLINICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA – LEON

Autor _____

Fecha ___/___/___ Hora de muestreo _____

N° de puesto _____

Producto que ofrece

Mariscos _____ Frutas _____ Lácteos _____ Carnes _____

Condiciones higiénico sanitarias

Presencia de

Basureros o basura: Si _____ No _____

Moscas Sí _____ No _____

Agua residuales Sí _____ No _____

Animales Sí _____ No _____

Presentación del producto: vitrinas _____ cubierto (bolsa, mantel) _____

Manipulación del producto por el despachador

Uso del lavado de manos: Si ____ No ____

Manipulación de dinero: Si ____ No ____

Uso de equipo de protección para manos:

Si ____ Cuales: Guantes ____, bolsa ____

No ____

Mecanismos de regulación de las densidades moscales uso de

Insecticida Sí ____ No ____

Cintas adhesivas para moscas Sí ____ No ____

Mata moscas (clásico o eléctrico) Sí ____ No ____

ANEXO II

TRAMPAS PARA MOSCAS COMERCIALES CONVENIENTOOLS.



ANEXOS III

Protocolo de extracción y purificación de ácidos nucleicos

QIAMP (QIAmp, cat. No 52906)

Soluciones AVE : Azida de Sodio (NaN₃) 0.04%, Agua libre de ARNse.

AVL : Tiocianato de Guanidina, agregar ARN carrier antes de usar.

AW1, AW2: Hidrocloruro de Guanidina, Etanol 99%

Procedimiento

1. Centrifugar brevemente (short spin) la muestra una vez descongelada a 4°C.
2. Mezclar 140ul de muestra con 560ul de buffer AVL y dar vortex.
3. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 10 min y centrifugar brevemente.
4. Agregar 560ul de etanol (96-100%) y dar vortex. 5. Colocar 630ul de la mezcla anterior en una columna QIAamp contenida en un tubo colector y centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
6. Descartar el tubo colector que contiene el filtrado, colocar la columna en otro tubo colector y agregar 630ul de la mezcla anterior. Centrifugar a 8000 rpm 1 min.
7. Descartar el tubo colector que contiene el filtrado, colocar la columna en otro tubo colector y agregar 500ul de Buffer de lavado 1 (AW1) y centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
8. Descartar el tubo colector que contiene el filtrado, colocar la columna en otro tubo colector y agregar 500ul de Buffer de lavado 2 (AW2) y centrifugar a 14000 rpm por 3 min.
9. Descartar el tubo colector que contiene el filtrado, colocar la columna en un tubo eppendorf (1.5ml) y agregar 60ul de buffer de elución (AVE), incubar 1 min a T° y centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
10. Descartar la columna y guardar el filtrado que contiene el ARN a -20°C.

ANEXO IV

Método de detección de gastrovirus mediante RT-PCR

1. Descongelar los reactivos (AgPath-ID™ One-Step RT-PCR) y el ARN viral a 4°C.
2. Preparar el master mix.

Rotavirus

Componentes	vol (µL)/rxn
2X RT-PCR Buffer	12.5
Primer/probe mix RoV	1
25X RT-PCR Mix	1
Detection enhancer	1.67
Agua libre de nucleasas	3.83
Volumen total	20

Astrovirus

Componentes	vol (µL)/rxn
2X RT-PCR Buffer	12.5
Primer/probe mix AstV	1
25X RT-PCR Mix	1
Detection enhancer	1.67
Agua libre de nucleasas	3.83
Volumen total	20

Norovirus

Componentes	vol (µL)/rxn
2X RT-PCR Buffer	12.5
Primer/probe mix NoV	1
25X RT-PCR Mix	1
Detection enhancer	1.67
Agua libre de nucleasas	3.83
Volumen total	20

Sapovirus

Componentes	vol (µL)/rxn
2X RT-PCR Buffer	12.50
Primer/probe mix SaV	1.05
25X RT-PCR Mix	1.00
Detection enhancer	1.67
Agua libre de nucleasas	3.78
Volumen total	20

3. Mezcle el Master Mix.
4. Coloque 20 µl de cada Master Mix en cada pozo de la placa a utilizar
5. Agregue 5 µl de cada muestra de ARN y mezcle (Nota: el ARN y control positivo para RoV deberán ser calentadas previamente a 97°C por 5 min).
6. Agregue 5 µl de Nuclease Free Water al Control Negativo (NTC).
7. Por último agregue 5 µl del Control Positivo (VTC). **Según se especifica a continuación**

A	1 NoV (GI,GII)	2 NoV (GI,GII)	3 AstV	4 AstV	5 RoV	6 RoV	7 Sapovirus	8 Sapovirus
A	1	9	1	9	1	9	1	9
B	2	10	2	10	2	10	2	10
C	3	11	3	11	3	11	3	11
D	4	12	4	12	4	12	4	12
E	5	13	5	13	5	13	5	13
F	6	C+	6	C+	6	C+	6	C+
G	7	C-	7	C-	7	C-	7	C-
H	8	-	8	-	8	-	8	-

8. Cuidadosamente mezcle la placa y asegúrese de que no se formen burbujas.
9. Selle la placa con el adhesivo
10. Coloque la placa en el equipo y corra el siguiente programa:
 - a. 10 min a 50°C (Temperatura de la Transcripción reversa)
 - b. 10 min a 95°C (Activación de la Taq Polimerasa)

c. 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min a 60°C

Lista de primers para este PCR

Primers	Sequence	Reference
Astrovirus	F, CAGTTGCTTGCTGCGTTCA 4 R, CTTGCTAGCCATCACACTTCT P, CACAGAAGAGCAACTCCATCGC	Liu J, 2011
Norovirus GII	F, CARGARBCNATGTTYAGR TGGATGAG R, TCGACGCCATCTTCATTCACA P, TGGGAGGGCGATCGCAATCT	Kageyama T, 2003
Rotavirus	F, ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG R, GGTCACATAACGCCCCTATAGC P, AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA	Zeng SQ, 2008