

29  
1857

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"CARACTERIZACION DE ROTAVIRUS AISLADOS DE INFECCIONES SINTOMATICAS Y ASINTOMATICAS EN NIÑOS MENORES DE 3 AÑOS DE LA CIUDAD DE MEXICO".

Tesis que para obtener el grado de

Biólogo

p r e s e n t a

Claudia Santos del Real



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INTRODUCCION

Uno de los mayores problemas de salud en los países en vías de desarrollo, en donde las condiciones de salubridad y alimentación son malas, es el de las enfermedades intestinales, las cuales son una de las causas principales del elevado índice de mortalidad y morbilidad infantil.

Recientemente se ha identificado a los rotavirus como el principal agente etiológico de las diarreas en niños menores de 2 años (Davidson y col. 1975).

Estudios hechos en Bangladesh (Black y col. 1983), revelan que la mitad de los casos de gastroenteritis en niños pequeños están asociados con rotavirus. En México son los responsables de aproximadamente el 25% de los casos de gastroenteritis aguda (Espejo y col. 1979).

Los rotavirus fueron observados por primera vez en 1973 al analizar al microscopio electrónico una biopsia duodenal tomada de un paciente con gastroenteritis aguda no bacteriana (Bishop y col. 1973).

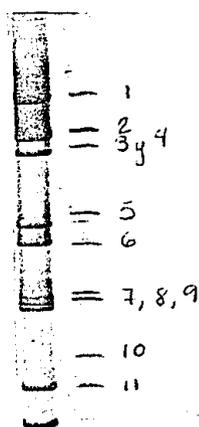
Además de haberse aislado de las heces fecales de niños, han sido encontrado también en las heces de las crías de un gran número de mamíferos, incluyendo becerros y lechones, donde los rotavirus causan grandes pérdidas económicas debido principalmente a la pérdida de peso de los animales en crecimiento, aunque también la mortalidad es importante (Snyder y col. 1982).

Los rotavirus pertenecen a la familia Reoviridae. Su nombre viene del

latin "rota" o rueda, ya que al microscopio electrónico dan la impresión de una rueda de carreta.

Los virus están formados por una doble cápside de proteínas que envuelve al genoma, el cual está compuesto por 11 segmentos de distinto tamaño de RNA de doble cadena (Rodger y Holmes, 1983). Estas partículas tienen una densidad de 1.36 g/ml en CsCl y un diámetro de 70 nm. Los rotavirus pueden perder las proteínas de la cápside externa, manteniendo únicamente la cápside interna. Estas últimas partículas a diferencia de las primeras no son infecciosas y tienen una densidad de 1.38 g/ml en CsCl y un diámetro de 60 nm.

Los 11 segmentos de RNA (cada segmento es un gen diferente) que componen al genoma del virus tienen un tamaño que oscila entre 660 y 4000 pares de bases. Estos 11 segmentos pueden separarse por electroforesis en geles de poliacrilamida, dando un patrón muy característico. Para los rotavirus aislados de humanos, se han reportado dos tipos de patrones electroforéticos, uno "corto" o 2S y uno "largo" o 2L. La migración de los segmentos 2, 10, y 11 es menor en el patrón "corto" con relación al "largo" (ver figura 1). En México el patrón que se presenta más frecuentemente es el largo (Espejo y col. 1978).



1 2

Fig. 1.- Gel de acrilamida - bisacrilamida (10%-0.27%) teñido con nitrato de plata, en el que se muestran los patrones electroforéticos característicos del genoma de rotavirus humano: 1) patrón "largo" o 2L; 2) patrón "corto" o 2S. A la derecha del gel se numeran los diferentes segmentos de RNA de acuerdo a su migración electroforética. Obsérvese la diferencia que hay en la migración de los segmentos 2, 10 y 11 en el patrón largo y en el corto.

La comparación de los patrones electroforéticos de distintos rotavirus aislados de una misma especie es útil en estudios epidemiológicos. En una epidemia pueden surgir rotavirus con electroferotipos diferentes, siendo uno o más los predominantes.

Las diferencias en migración de los segmentos podría deberse a diferencias en la secuencia nucleotídica de los mismos, lo que podría resultar en algunos casos, en diferencias en la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por esos genes con movilidad electroforética diferente (Espejo y col. 1980).

En el rotavirus SA11, aislado de simio, se han identificado 5 proteínas como componentes de la doble cápside (Espejo y col. 1981). La cápside externa está compuesta por dos proteínas: VP3 y VP7. VP3 (codificada por el gene 4) es una proteína que necesita ser cortada por tripsina para que el virus pueda infectar (Espejo y col. 1981). Este corte produce dos polipéptidos: VP5 y VP8. VP3 además tiene actividad de hemáglutinación y contiene algunos de los epitopes de neutralización del virus (Kalica y col. 1981). VP7, la otra proteína de capa externa, es una glicoproteína codificada por el segmento 9. Esta proteína también porta determinantes antigénicos de neutralización. A través de ensayos de neutralización se ha dividido a los rotavirus aislados de humanos en 4 serotipos diferentes. Los rotavirus de serotipo 1 son los que se aíslan con más frecuencia.

La cápside interna está formada por 3 proteínas: VP1, VP2 y VP6. La proteína VP6, codificada por el gene 6, es la que contiene los determinantes antigénicos comunes de grupo. Sin embargo, por ensayos de fijación de complemento, inmunoelectromicroscopia y ELISA, se ha descrito en este polipéptido la presencia de cuando menos un

determinante antigénico no común, el cual ha servido para clasificar a los rotavirus en dos subgrupos bien definidos: I y II.

Los patrones electroforéticos de rotavirus aislados de humanos pueden correlacionarse con los subgrupos. Así, los virus con patrón electroforético "corto" pertenecen al subgrupo I, mientras los de patrón "largo" pertenecen al subgrupo II.

Además, hasta ahora, todos los rotavirus aislados de humanos pertenecientes al subgrupo I son serotipo 2, mientras que los pertenecientes al subgrupo II pueden ser serotipo 1, 3 o 4.

Se ha observado que cambios en el patrón electroforético no siempre corresponden a cambios en el serotipo, ya que un cambio en la migración de los segmentos 4 y/o 9 no siempre corresponde a un cambio en la secuencia de los antígenos de capa externa.

Tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo la infección afecta a gente de todas las edades, pero la diarrea se presenta principalmente en los niños menores de 2 años, siendo los niños de 4 a 10 meses los más afectados.

Los niños de 12 a 24 meses presentan una frecuencia de infección sintomática menor que los de 4 a 10 meses, ya que adquirieron anticuerpos en edades más tempranas (Espejo y col. 1978).

En neonatos la infección es generalmente asintomática o muy leve. Gurwith y col. (1983) proponen como una posible explicación a esto la existencia de un número menor de receptores específicos al virus en las células del intestino de los neonatos. Estos receptores pudieran aparecer con la maduración intestinal.

Otra explicación para el bajo índice de diarrea causado por rotavirus en neonatos pudiera ser los niveles de tripsina en el intestino por debajo de lo necesario para activar la infectividad viral, ya que in vitro, la presencia de tripsina en el medio activa e incrementa la infectividad del virus. Además, in vivo, la tripsina parece jugar un papel similar, ya que para que la infección se produzca es necesaria su presencia (Mc Lean y Holmes 1981).

Los neonatos son una fuente importante de infección para sus padres y para los otros miembros de la familia. El contagio a través de niños pequeños infectados en la familia y la falta de sanidad, causan brotes de infección por rotavirus humano (RVH) (Engleberg y col. 1982).

Otros factores que incrementan estos brotes infecciosos son el descenso en la humedad y el comienzo de la estación fría (Echeverría y col. 1983).

En un estudio hecho en Japon por Konno y col. (1983), se observo que si la temperatura media es menor a los 5 grados centigrados durante un periodo de 10 dias (como sucede en los meses de noviembre y diciembre), la infeccion aparece abruptamente en humanos, alcanzando su pico maximo en enero y febrero, cuando la temperatura media es de cero grados centigrados. La infeccion casi no se presenta cuando la temperatura es mayor a los 20 grados (en verano).

En estudios similares realizados en la Ciudad de México por Espejo y col. (1978) y C. Soler (comunicación personal) se ha observado también que la frecuencia de infeccion aumenta en los meses frios (ver figura 2).

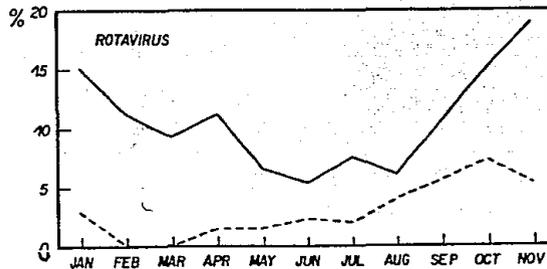


Fig. 2.- Frecuencia con que se identificó rotavirus humano en heces fecales colectadas de niños de 0 a 3 años de la Ciudad de México, de abril de 84 a marzo de 85 en la Ciudad de México (Carmen Soler y col. comunicación personal).

Los números en la ordenada corresponden a la frecuencia de infección. La línea continua corresponde a las infecciones sintomáticas y la punteada a las asintomáticas.

La respuesta a la infección por rotavirus varía de un individuo a otro. Esta variación puede deberse a distintos factores, tales como diferencias en la patogenicidad del virus infectante, diferencias en la dosis infecciosa ingerida; diferencias individuales en la respuesta inmune; cantidad de IgA en el lumen del intestino (los anticuerpos circulantes no parecen jugar un papel importante en la protección de la infección por rotavirus. Black y col. 1982); cantidad de inmunoglobulinas específicas antirotavirus y cantidad de inhibidores de tripsina recibidos del calostro y de la leche materna.

En general se ha observado que los niños que se alimentan de leche materna tienen una incidencia menor a la infección por el virus (Tollerdell y col. 1976). McClelland (1978) propone que la protección se debe a que el calostro de la leche materna contiene cantidades considerables de  $\alpha$ -1 antitripsina y otros inhibidores de tripsina.

Los niños de pecho que reciben leche con niveles muy bajos de estos inhibidores de tripsina, si se infectan.

El calostro, al igual que la leche materna, contiene además de inhibidores de tripsina, anticuerpos específicos antirotavirus, especialmente IgA secretora. La cantidad de IgA secretora en la leche materna disminuye del primer al quinto día post-partum. Después del quinto día el nivel se mantiene estable de 50 a 200 días más, durante los cuales la leche materna confiere protección (McLean y Holmes, 1981).

De modo similar, la cantidad de  $\alpha$ -1 antitripsina permanece constante durante el primer mes post-partum. Después de este tiempo, ya no es detectada, por lo que su efecto protector es más corto que el de la IgA secretora (Mc Lean y Holmes, 1981).

Sin embargo, existe un estudio hecho por Gurwith en 1983, en tres comunidades de Canadá, en el que reportó que la leche materna parece no proteger de la infección por rotavirus, ya que la infección ocurría con más frecuencia y en edades más tempranas en la comunidad donde la frecuencia de alimentación con leche materna era mayor. Bishop (1979) observa también que los niños alimentados con leche materna se infectan al igual que los que no la ingieren.

Mc Lean y Holmes (1981) proponen que la leche materna solo protege de la infección cuando los niveles de IgA secretora y de inhibidores de tripsina son altos, y que probablemente estos niños se alimentaron con leche materna con niveles bajos de estos dos componentes. Ellos han observado que cuando los niveles son altos la frecuencia de infección se reduce.

A lo largo de un estudio realizado en México, como parte del programa de la OMS sobre diarreas, se ha observado que la relación entre la excreción de rotavirus y la presencia de síntomas (en especial diarrea) no correlaciona totalmente, ya que se han encontrado niños que excretan el virus sin presentar la diarrea (C. Soler, R. Espejo, y J. Olarte. comunicación personal).

En esta relación huésped - parásito intervienen diversos factores que en combinación determinan la respuesta del huésped. De aquí que es importante el estudio individual de algunos de estos factores para poder entender un poco más sobre la infección por rotavirus.

## OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es:

Determinar si existe alguna diferencia entre los rotavirus aislados de heces fecales de niños con infección sintomática y los aislados de niños con infección asintomática, así como detectar si algún factor del huésped es importante en el tipo de infección que se presenta.

Para esto:

1) Se compararán genéticamente los rotavirus aislados de heces fecales de niños con infección sintomática (pacientes), con los de niños con infección asintomática (controles), a fin de establecer si la diferencia de respuesta a la infección se debe a que los virus que la producen son distintos.

2) Se determinará si hay una diferencia significativa en la cantidad de rotavirus excretado en infecciones sintomáticas y en asintomáticas.

3) Se buscará si existe un factor de protección a la infección en la leche materna.

4) Basándose en el patrón electroforético de los virus aislados, se comparará la frecuencia del patrón "corto" y la del "largo" para buscar

correlacion con alguno de los dos grupos de estudio.

5) Se determinara si existe una relacion entre la frecuencia de infeccion y algun grupo de edad en particular.

## MATERIALES Y METODOS

## 1.- Colección de muestras.

La colección de muestras se realizó como parte del programa "Multicentro" que realiza la OMS para el estudio de las diarreas en México, con la colaboración de los doctores Carmen Soler, Jorge Olarte y Alfonso Zamora.

Las muestras de heces fecales fueron obtenidas de niños menores de 3 años que asistieron a consulta externa al Hospital Infantil de México "Federico Gómez", en el período de abril de 1984 a febrero de 1985. El grupo de niños "pacientes" acudieron al hospital por diarrea, mientras que el grupo de "controles" acudieron a la consulta por causas diferentes a la gastroenteritis. Las muestras se colectaron en frascos y se guardaron a 4°C mientras fueron analizadas.

## 2.- Electroforesis.

a) Gel de acrilamida - bis acrilamida (10% : 0.33%) (Laemmli, 1970).

El gel se corre en solución amortiguadora tris-glicina con 0.1% dodecil sulfato de sodio, a 200V (30 mA), 4 hr o hasta que el segmento de RNA más ligero migre 3/4 partes de la altura total del gel. En el caso de los minigeles para rotavirus el gel solo se corre 30 min en las condiciones anteriores.

Se puede teñir con nitrato de plata y observar directamente, o con una solución de bromuro de etidio (1  $\mu$ g/ml), observándolo con luz UV.

b) Tinción con nitrato de plata (Beidler y col. 1982).

Se escogió este método de tinción porque es muy sensible, sólo en el caso de los gels que se hicieron en el experimento de hibridación se usó la tinción con bromuro de etidio.

El método es el siguiente:

- 1.- El gel se fija en alcohol etílico - ácido acético (10% - 0.5%), durante 30 min.
- 2.- Se coloca en una sol. de nitrato de plata 0.18% . 30 min.
- 3.- Se enjuaga 2 veces con agua desionizada.
- 4.- Se revela con 0.4 ml de formaldehído al 38% en 50 ml de hidróxido de sodio al 3%, hasta que aparezcan las bandas.
- 5.- Se para la reacción con ácido acético al 1%.

### 3.- Detección del virus en las muestras.

La detección del virus en las muestras de heces fecales colectadas se hizo por medio de rotaforesis (Espejo et al, 1977). Esta es una técnica que se basa en la detección del patrón electroforético característico del RNA del virus, en las heces fecales.

En breve consiste en:

- a) Se hace una dilución de heces al 10% en 0.4ml de sol. salina (cloruro de sodio 0.85%). Si la muestra está muy líquida la dilución se hace al 50%.
- b) Se agrega un volumen igual de sol. solubilizadora (EDTA 36 mM, SDS 6%, 2 mercaptoetanol 0.6%), y se agita vigorosamente.
- c) Se extrae con 0.2 ml de fenol saturado (150 ml de fenol se saturan

con un volumen igual de una solución de EDTA 1mM, Tris 10mM pH 7.8), y luego con 0.2 ml de cloroformo.

d) Se centrifuga 10 min a 1500 rpm en la centrifuga clinica Sorvall GLC-2B. De este paso resultan dos fases. Se toman 15ml de la fase acuosa que debe ser clara.

e) A estos 15ml de muestra se le agrega una gota de azul de bromofenol en agarosa 50%, y se colocan en un minigel de acrilamida - bis acrilamida 10% : 0.27% (Laemmli, 1970).

f) Una vez solidificada la muestra, se corre el gel en sol. amortiguadora Tris - glicina (trizma base 0.24%, glicina 1.152% en agua).

g) El gel se tinte con nitrato de plata.

La muestra se considera positiva para rotavirus, si aparecen las 4 primeras bandas del patrón característico.

#### 4.- Purificación del RNA viral (doble cadena).

a) Se diluyen 3g de heces fecales en 1ml de sol. TSM (Tris (hidroximetil) aminometano 10mM pH 8.2, NaCl 150mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM).

b) Se extraen con un volumen igual de trifluoro tricloroetano (freon), durante 10 min.

c) Se separan las fases por centrifugación a 6000 rpm, en la centrifuga Sorvall RC-5B, rotor SS34, 10 min a 4°C.

d) Se toma la fase acuosa, que es donde se encuentra el virus, y se precipita con polietilenglicol (PEG) a una concentración final de 8% durante 12 hr a 4°C.

e) Se centrifuga por 30 min a 10,000 rpm, en la centrifuga Sorvall RC-5B, rotor SS34 a 4°C.

- f. Se tira el sobrenadante, y se resuspende el boton en 0.1 ml de sol. TSM. Se coloca en un gradiente discontinuo de cloruro de cesio (0.2 ml de una sol. de CsCl de densidad 1.3 g/cm<sup>3</sup>, y 1.5 ml del de densidad 1.4 g/cm<sup>3</sup>).
- g) Se centrifuga en la ultracentrifuga Beckman, rotor Beckman SW50.1, 2 hr a 40,000 rpm.
- h) Se colecta la banda que aparece arriba de la interfase que es la que contiene al virus y se diluye en 5 ml de Tris 20mM pH 7.4.
- i) Se coloca sobre un gradiente de cloruro de cesio que tiene una densidad inicial de 1.36 g/cm<sup>3</sup> y se centrifuga a equilibrio en la ultracentrifuga Beckman, 17 hr a 40,000 rpm, en el rotor SW50.1.
- j) Se colecta la banda opalescente que migra en la parte inferior del gradiente y que corresponde a las particulas virales. Se resuspende la banda colectada en 5 ml de Tris 20mM pH 7.4.
- k) Para sedimentar el virus, se centrifuga 1 hr a 40,000 rpm en la misma centrifuga y rotor antes mencionados. El boton se resuspende en 0.25 ml de solución solubilizadora, y se incuba 30 min a temperatura ambiente.
- l) Se extrae con fenol saturado y cloroformo.
- m) El RNA doble cadena se precipita con etanol frio, a una concentración final de 66%, 1 hr a -70°C.
- n) Se centrifuga 15 min a 12,000 rpm, en el rotor SS34 en la centrifuga Sorvall RC-SB a 4°C y el boton se resuspende en agua desionizada estéril.

##### 5.- Purificación de virus sin capa externa.

Se sigue del paso (a) al (h) descritos para la purificación de RNA

viral doble cadena.

Despues se siguen los siguientes pasos:

- a) Se centrifuga 1 hr a 40,000 rpm y el boton se resuspende en 250  $\mu$ l de Tris 20mM pH 7.4, EDTA 15mM (el EDTA se usa para quitar las proteinas de la capa externa, y asi activar la transcriptasa, ya que sólo es activa en las particulas virales que han perdido la capsida externa) (Cohen y col. 1979).
- b) Se incuba 30 min a temperatura ambiente.
- c) Se coloca sobre una sol. de cloruro de cesio de densidad 1.36 g/cm<sup>3</sup> y se centrifuga en una ultracentrifuga Beckman, rotor SW50.1 17 hr a 40,000 rpm.
- d) Se colecta la banda opalescente correspondiente a los virus sin capa externa y se resuspenden en 5 ml de sol. TSM.
- e) Se centrifuga en la ultracentrifuga Beckman, rotor SW50.1, 1 hr a 40,000 rpm.
- f) El virus sedimentado se resuspende en 50  $\mu$ l de agua destilada estéril.

#### 6.- Transcripción in vitro del genoma viral.

Esta técnica se empleó con el objeto de obtener RNA viral de cadena sencilla, marcado radioactivamente, para usarlo en el experimento de hibridación.

- a) A 50  $\mu$ l de virus sin capa externa, se agregan 200  $\mu$ l de la sol. amortiguadora para transcripción 2X (Tris 70mM pH 8.0, acetato de sodio 100mM y acetato de magnesio 20mM, ATP 32mM, GTP 10mM, CTP 5mM, UTP 5mM, S-adenosil metionina 1mM).
- b) Se añade 40  $\mu$ l de bentonita al 4%.

- c) Se agregan 25  $\mu$ Curies de  $\alpha$ ATP<sup>32</sup>.
- d) Se lleva a 0.4ml con agua destilada estéril, y se incuba la mezcla a 42°C.
- e) Se detiene la reacción centrifugando 5 min a 4°C en la microcentrífuga Eppendorf, para quitar las partículas virales.
- f) Se extrae la mezcla con fenol y cloroformo para dejarla libre de RNAsas y de otras impurezas.
- g) Se toma el sobrenadante y se agrega una cantidad igual de LiCl 4 M para precipitar el RNA de cadena sencilla recién sintetizado.
- h) Se incuba 12 hr a 4°C.
- i) Se centrifuga 15 min a 4°C en la microcentrífuga Eppendorf.
- j) Se retira con cuidado el sobrenadante. El botón que contiene el RNA recién transcrito se lava con etanol absoluto, y luego con etanol 70%.
- k) Se resuspende en 100 a 200  $\mu$ l de agua destilada estéril.

7.- Medición de la incorporación de  $\alpha$ ATP<sup>32</sup> en el RNA de cadena sencilla durante la transcripción.

- a) Se toma una alícuota de 5  $\mu$ l del transcrito y se coloca en un papel filtro DE81.
- b) Se deja secar. Se lava 6 veces con bifosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0.5M, 5 min cada vez.
- c) Se lava 2 veces con agua bidestilada, 1 min cada vez.
- d) Se lava 2 veces con etanol 90%, 1 min cada vez.
- e) Se dejan secar los filtros y se colocan en un frasco con 5 ml de 2-5 difeniloxazol (PPO) al 0.8% en tolueno.
- f) Se determina en el contador de centelleo la cantidad de radioactividad incorporada.

Todo se hace por duplicado para comprobar que la medición es exacta.

8.- Hibridación de RNA cadena sencilla (transcrito marcado) contra RNA cadena doble (purificado a partir de virus excretados en las heces). El objetivo de esta técnica es conocer el grado de homología en la secuencia de dos segmentos de RNA. Se basa en que solo las secuencias complementarias pueden hibridar entre sí. Las hebras del RNA de doble cadena se separan con calor y se ponen a hibridar con la hebra de RNA de cadena sencilla marcada radioactivamente.

- a) Se ponen en un tubo eppendorf estéril 0.2  $\mu$ g de dsRNA y 10,000 cpm del transcrito marcado radioactivamente.
- b) Se agrega EDTA a una concentración final de 5 mM y se lleva a un volumen final de 100  $\mu$ l con agua destilada estéril.
- c) Se hierve por 2 min e inmediatamente se enfría 2 min en hielo.
- d) Se agrega la sol. para hibridación 2 X (Tris 100mM pH 7.5, NaCl 400mM, EDTA 2 mM), llevando a un volumen final cercano a 0.2 ml.
- e) Se incuba a 65°C toda la noche.
- f) Se para la reacción añadiendo 3 volúmenes de etanol absoluto frío, y se deja precipitando 12 hr a - 20°C.
- g) El RNA doble cadena obtenido de la hibridación se separa en un gel de acrilamida-bisacrilamida (10%-0.27%).
- h) El gel se expone a una placa de rayos X (Kodak X-OMAT-K), proceso conocido como autorradiografía.

9.- Análisis estadístico de las muestras.

Se aplicó la prueba de  $t$  de Student para analizar si había una diferencia significativa en la media de dos muestras poblacionales de distinto tamaño, usando el error estándar de cada muestra.

## RESULTADOS

## 1.- Cuantificación de la cantidad de RNA doble cadena excretado por niños "pacientes" y "controles".

Se determinó la cantidad de RNA doble cadena en heces con el fin de tener una medida de la excreción de virus por cada uno de los grupos de estudio. Para esto, se purificó el RNA viral partiendo de cantidades iguales de heces fecales de niños pacientes y de controles por medio de la técnica descrita en Materiales y Métodos, y luego se corrió en geles de acrilamida al 10% (ver figura 3).

Para poder estimar con más facilidad la cantidad relativa de RNA en el gel, se asignaron valores numéricos a las bandas observadas de acuerdo a su intensidad (ver tabla 1). Se dio un valor de 1 a las bandas menos intensas en el gel, y en base a esta unidad y a la comparación contra una curva patrón, se asignó un valor al resto de las bandas.

La curva patrón se hizo corriendo una electroforesis en las mismas condiciones en las que se corrieron los geles de la cuantificación. Se usó una concentración inicial conocida de RNA de rotavirus humano, y se hicieron diluciones a partir de ella. Además, se tomó en cuenta que la diferencia en intensidad que se observa entre el segmento de RNA más grande (segmento 1) y el más pequeño (11) es de 10 veces el peso molecular, o sea 10 veces la cantidad de RNA.

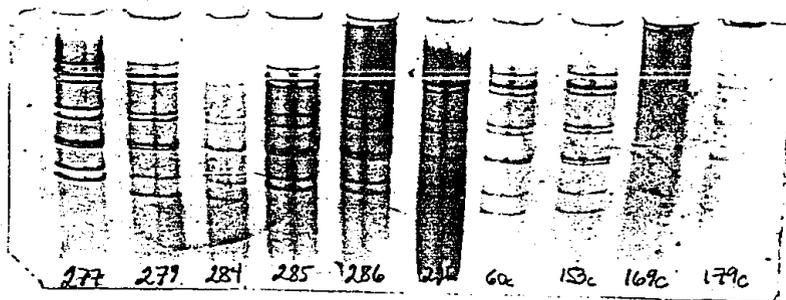


Fig. 3.- Gel de acrilamida - bisacrilamida (10%-0.27%) teñido con nitrato de plata, de RNA de rotavirus humano purificado a partir de heces fecales colectadas de niños "pacientes" y "controles". Los números debajo de cada carril corresponden al número de la muestra de heces.

TABLA 1

Cantidades relativas de RNA doble cadena excretado en heces por niños "pacientes" y "controles" en muestras colectadas de mayo de 1984 a enero de 1985.

-----  
 número de cantidad rela- Patron Fecha de co-  
 la muestra tiva de RNA lecta  
 -----

9P <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	2L <sup>c</sup>	5/4/84
25P	2	2L	24/4/84
39P	5	2L	4/5/84
45P	25	2L	5/84
74P	2	2S <sup>d</sup>	29/5/84
89P	50	2L	7/6/84
122P	5	2L	3/7/84
170P	5	2S	2/8/84
181P	1	2S	13/8/84
184P	5	2L	14/8/84
211P	5	2L	31/8/84
213P	5	2S	31/8/84
252P	5	2S	3/10/84
258P	5	2L	9/10/84
267P	5	2L	19/10/84
271P	1	2L	26/10/84
276P	1	2S	6/11/84
277P	7	2S	6/11/84
279P	2	2L	7/11/84
284P	1	2L	19/11/84
285P	5	2S	21/11/84
286P	5	2S	22/11/84
292P	5	2L	26/11/84
296P	5	2S	29/11/84
29P	25	2L	22/1/85
42P	1	2L	25/1/85
47P	1	2L	30/1/85
62P	1	2L	8/2/85
129P	5	2S	22/3/85
134P	7	2S	26/3/85
135P	5	2L	26/3/85

número de la muestra	cantidad relativa de RNA	Patron	Fecha de colecta
60C <sup>e</sup>	2	2L	22/5/84
61C	2	2S	22/5/84
153C	2	2L	25/4/84
169C	1	2L	3/8/84
179C	1	2L	13/8/84
227C	1	2L	13/9/84
238C	1.5	2L	20/9/84
261C	1.5	2L	17/10/84
273C	3	2L	29/10/84
280C	1	2L	21/11/84
291C	1	2L	28/11/84

<sup>a</sup>P = pacientes (infección sintomática)

<sup>b</sup>cantidad relativa de RNA doble cadena encontrado en heces de cada niño analizado (ver texto).

<sup>c</sup>2L = patrón "largo"

<sup>d</sup>2S = patrón "corto"

<sup>e</sup>C = controles (infección asintomática)

El análisis estadístico de las cantidades relativas de RNA doble cadena excretado por niños "pacientes" y "controles" (prueba de t de Student) indica que los niños "pacientes" excretan cantidades de dsRNA significativamente mayores ( $p < 0.01$ ) que los "controles".

En la tabla 1 también observamos que la frecuencia con que aparece el patrón "largo" (69%) es mayor que la del "corto" (31%). De las 42 muestras analizadas que resultaron positivas para rotavirus, 31 fueron tomadas de niños con infección sintomática; de estas, 12 (39%) tienen patrón "corto" y 19 (61%) patrón "largo". Las 11 muestras restantes fueron tomadas de niños con infección asintomática; 10 (91%) de ellas presentan patrón "largo" y 1 (9%) "corto".

2.- Frecuencia de infección por RVH durante el periodo de agosto de 1985 a febrero de 1986.

La tabla 2 muestra la frecuencia de infecciones sintomáticas y asintomáticas durante el periodo de agosto de 1985 a febrero de 1986. La colección se hizo en los meses fríos ya que se sabe que es cuando se eleva la frecuencia de infección por RVH en la Ciudad de México (Espejo y col. 1978) (ver fig. 2).

La frecuencia con que se aisló rotavirus de niños sintomáticos y asintomáticos durante este periodo fue de 26% y 4.5% respectivamente.

TABLA 2

Frecuencia de infección por rotavirus en niños "pacientes" y "controles".

	# total de muestras	# de muestras positivas	% de muestras positivas
Pacientes	61	16	26%
Controles	89	4	4.5%

### 3.- Hibridación cruzada de los genomas de rotavirus aislados de infecciones sintomáticas y asintomáticas.

La hibridación entre RNA de cadena sencilla y RNA de cadena doble se realizó con el fin de poder conocer el grado de homología que hay entre la secuencia del genoma de los virus que producen infecciones sintomáticas y la de los que producen las asintomáticas.

A partir de muestras de heces fecales, se aislaron 4 virus, 2 de niños pacientes (89, S) y 2 de niños controles (60c, 273c).

Usando la técnica de transcripción in vitro descrita en Materiales y Métodos, se obtuvo a partir de ellos RNA de cadena sencilla marcado radioactivamente con  $\alpha$  ATP<sup>32</sup>.

Por otro lado, se purificó RNA de doble cadena a partir de 14 muestras de heces fecales tomadas de 5 niños controles y de 9 pacientes.

Cada uno de los cuatro RNAs de cadena sencilla marcado radioactivamente se hibridó con las 14 muestras de RNA a ser probadas, y posteriormente se corrieron en geles de poliacrilamida 10%. Los geles se tñeron con bromuro de etidio (figs. 4 y 6) y posteriormente se expusieron a una placa fotográfica durante 2 semanas a  $-70^{\circ}\text{C}$  (figs. 5 y 7). Se muestran los resultados de hibridación del RNA del virus S (paciente) y del virus 60 (control) con los dsRNA obtenidos de heces).

267 291 267 135 122 45 25 A 280c 26c 238c 61c 60c 60c S S -S

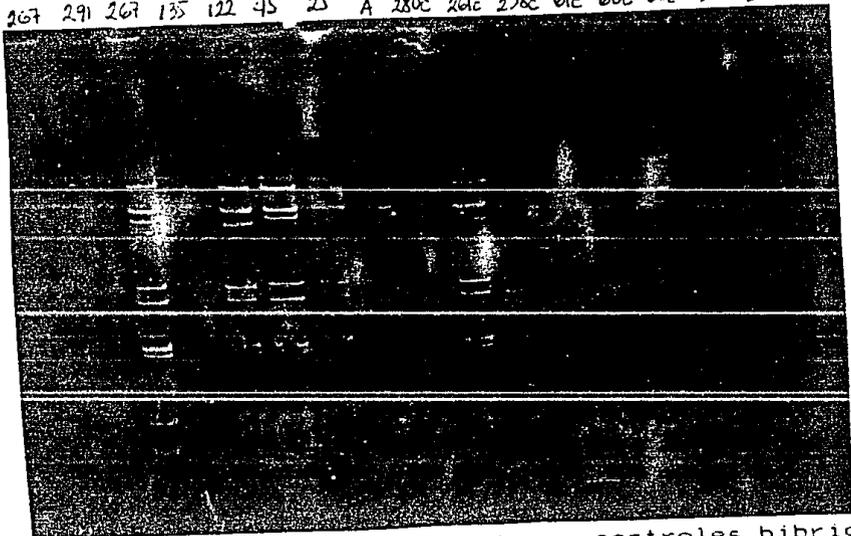


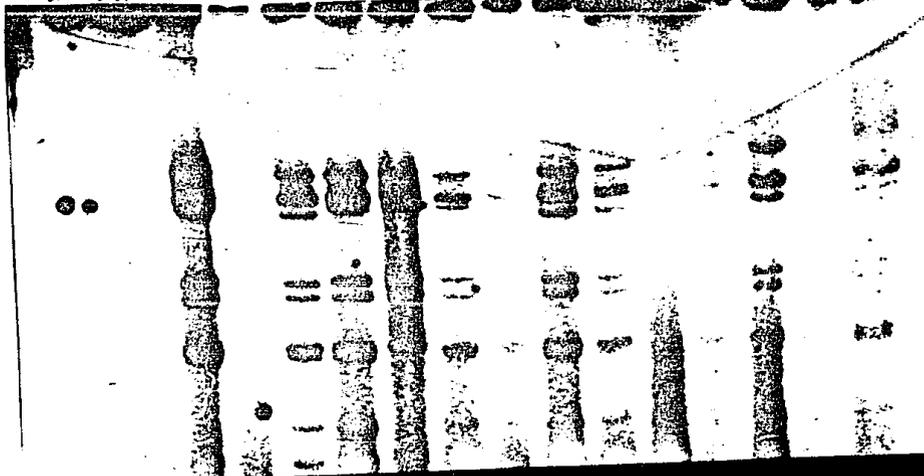
Fig. 4.- RNA obtenido de niños pacientes y controles hibridado con RNA marcado radioactivamente del virus S, separado en un gel de poliacrilamida 10% y teñido con bromuro de etidio.

Fig. 6.- Autorradiografía del gel de la fig. 4.

Los números en la parte superior de las figuras son los que se asignaron a las muestras según el orden en que fueron colectadas. Junto a ellos aparece el número del ssRNA contra el que se hibridaron.

La letra "c" junto a los números indica que se trata de un control.

267 291 267 135 122 45 25 A 280c 26c 238c 61c 60c 60c S S -S



267 291 267 135 122 45 25 A 280c 261c 238c 61c 60c — 60c

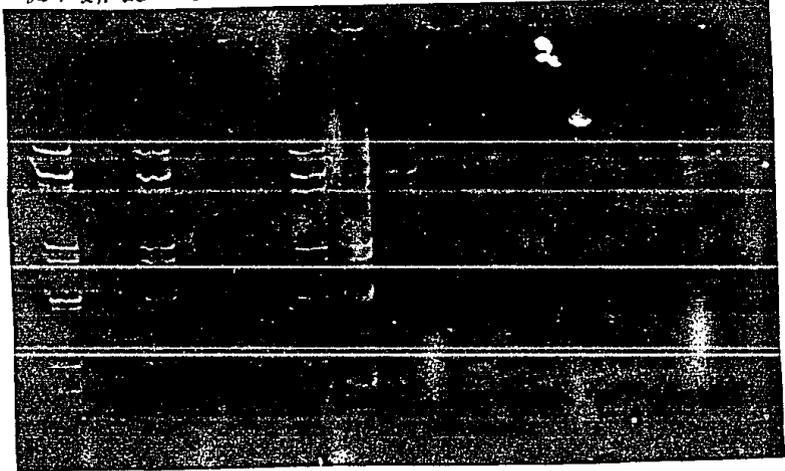
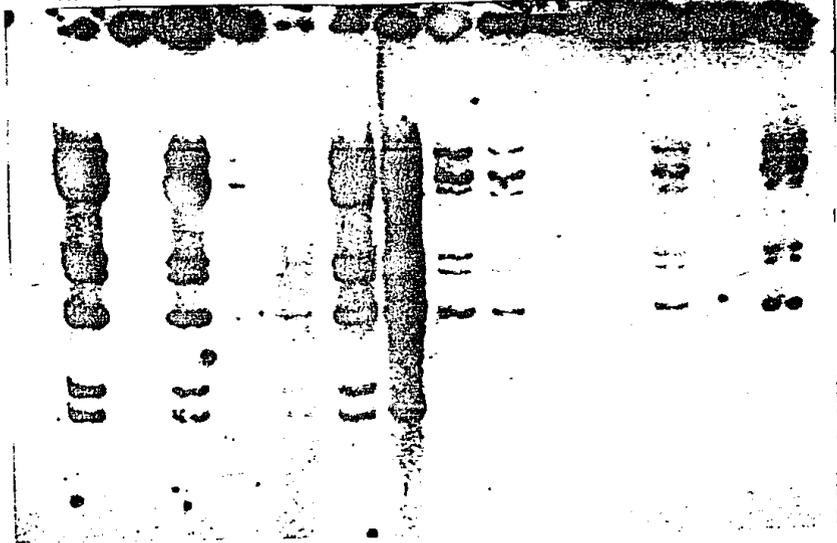


Fig. 5.- RNA obtenido de niños pacientes y controles hibridado con RNA marcado radioactivamente del virus 60C, separado en un gel de poliacrilamida 10% y teñido con bromuro de etidio.

Fig. 6.- Autorradiografía de la fig. 5

267 291 267 135 122 45 25 A 280c 261c 238c 61c 60c — 60c



Las figuras 4 y 6 corresponden a geles de acrilamida - bisacrilamida (10%-0.27%) que fueron corridos en solución amortiguadora tris-boratos, 1 hr a 30 mA. Estos geles fueron teñidos con bromuro de etidio, y en ellos aparecen todas las bandas que componen el genoma de los virus. Las figuras 5 y 7 corresponden a las autorradiografías de los geles 4 y 6 respectivamente. En ellas solo aparecen los segmentos del genoma que hibridaron con el ssRNA marcado.

Cuando se comparan las fotografías de los geles teñidos con bromuro de etidio con las autorradiografías correspondientes (en las que solo aparecen las bandas que si hibridaron con el RNA radioactivo), se observan algunas diferencias. El segmento 10 de RNA del virus 267 no hibrida con el RNA marcado del virus S (ver fig. 5), mientras que todos los otros segmentos si hibridaron. En el caso del segmento 10 las dos hebras del RNA doble cadena simplemente renaturalizaron, y es lo que se observa en el gel teñido con bromuro de etidio (ver fig. 4).

El segmento 9 marcado radioactivamente, obtenido de la muestra 60C, no hibrida prácticamente contra ningún otro gene 9, ni de los aislados de niños controles, ni de los de niños pacientes (ver figs. 5 y 7). Tampoco se observa hibridación entre los genes 9 de los virus 25 y S. Los genes 4 de los virus 60C y S hibridan bien contra todos los genes homólogos de los rotavirus probados.

El resto de los segmentos de los virus 60C y S si hibridan con los segmentos correspondientes.

Los transcritos aislados de los virus 89 y 273 incorporaron poca marca por lo que no se muestran los resultados.

Los resultados anteriores muestran que el grado de homología entre las secuencias de RNA de los virus aislados de niños pacientes y controles es alto, lo cual sugiere que el tipo de infección (sintomática o asintomática) probablemente no se debe a grandes diferencias génicas entre virus.

#### 4.- Papel de la leche materna en la frecuencia de infecciones sintomáticas y asintomáticas por rotavirus.

Para ver si la ingesta de leche materna influenciaba de alguna manera la presencia o ausencia de manifestaciones clínicas en las infecciones con rotavirus, se correlacionó el número de niños que tomaban leche materna y de los que no lo hacían, con el tipo de infección que presentaban (ver tabla 3).

En la tabla 3 se muestran datos de los expedientes médicos de los niños de quienes se tomaron las muestras y que resultaron positivos para RVH. Podemos observar que un 16% de los niños con infecciones sintomáticas (pacientes) se alimentaban con leche materna, mientras que de aquellos niños que presentaron infección asintomática (controles) un 33% ingería leche materna.

Estos datos podrían indicar que la alimentación con leche materna sí juega un papel en la presencia o ausencia de síntomas, ya que la frecuencia de niños alimentados con leche materna es mayor en el grupo de los que presentan infección asintomática que en el de los que presentan sintomática. Sin embargo el tamaño de la muestra es muy pequeño para poder obtener resultados estadísticamente significativos.

TABLA 3

Efecto de la ingesta de leche materna sobre las manifestaciones clínicas en infecciones por rotavirus.

tipo de ali-	# de P	% de P	# de C	% de C
mentacion				

---

Leche materna	6	16%	3	33%
---------------	---	-----	---	-----

Leche de vaca	30	84%	6	66%
---------------	----	-----	---	-----

---

P= niños pacientes

C= niños controles

5.- Frecuencia de infección de acuerdo a la edad.

La frecuencia de infección por rotavirus se analizó con relación a la edad (ver fig. 8).

El grupo de niños que tienen de 7 a 12 meses de edad es el que presenta mayor frecuencia de infección. En los niños mayores de 12 meses la frecuencia de infección disminuye.

Dentro del grupo de niños de 19 a 24 meses no se presentó ningún caso de infección.

Fig 8

POCENTAJE DE MUESTRAS POSITIVAS

Nº DE MUESTRAS COLECTADAS

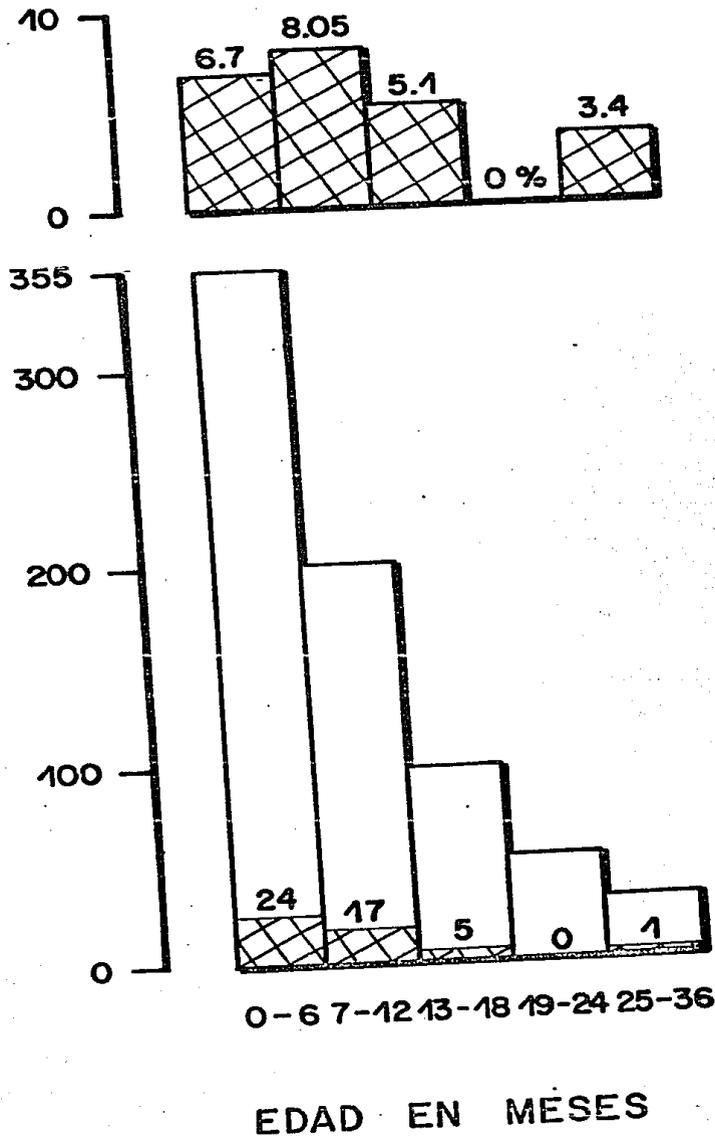


Fig. 8. Se muestra la distribución por grupos de edad de los niños que resultaron positivos para rotavirus durante el periodo de <sup>abril de</sup> 84 a marzo de 85.

Las columnas representan el número total de muestras tomadas en cada grupo de edad.

El área sombreada representa solamente a las muestras que resultaron positivas para rotavirus.

En la parte superior de la figura se muestra la frecuencia de infección por rotavirus en cada grupo de edad.

## V. DISCUSION

### 1. Cuantificación de RNA doble cadena viral excretado.

Para estimar la replicación viral se cuantificó el RNA doble cadena excretado, ya que es un método sencillo que da un buen reflejo del número de partículas virales producidas en la infección.

La diferencia observada en el nivel de replicación del virus (visto por la excreción de RNA) entre niños pacientes y controles, pudiera ser la explicación de la presencia o ausencia de diarrea. En niños controles a pesar de haber algunas células epiteliales infectadas, podrían quedar todavía suficientes células epiteliales para llevar a cabo las funciones de absorción normales, lo cual evitaría la diarrea.

El resultado obtenido no fue corregido respecto al volumen total de excreción de heces de niños controles y pacientes debido a la ausencia de este dato. Sin embargo, un argumento a favor de nuestras conclusiones es que aún considerando que los niños que padecen la diarrea presentan mayor número de evacuaciones que los niños que no la padecen y por lo tanto las partículas virales podrían encontrarse más diluídas, se observa mayor excreción de RNA en los niños pacientes que en los controles, y por lo mismo podría concluirse que hay mayor replicación viral en los pacientes.

La menor replicación de virus en los niños controles puede deberse a diferentes factores dependientes del la cepa viral presente o del huesped:

a) virales: i.- diferente capacidad para replicarse en las células

intestinales ii.- número de partículas infecciosas ingeridas. b) del huésped: i.- inmunidad pasiva parcial (probablemente conferida por la leche materna), ii.- niveles de tripsina y de inhibidores de tripsina en el intestino.

c) una mezcla de los dos anteriores.

2. Hibridación de los RNA mensajeros radioactivos con el RNA de doble cadena del genoma viral.

Tomando en cuenta las funciones que se han asignado a los genes codificados por los segmentos 4 y 9 debemos esperar el mayor número de variaciones en ellos al comparar virus aislados de niños pacientes y de niños controles.

El gene 9 codifica para la proteína VP7, uno de los antígenos de neutralización del virus, y probablemente esta proteína sea la responsable de la unión del virus a los receptores de la célula huésped (Matsuno y col. 1983).

A su vez, el gene 4 que codifica para la proteína VP3, restringe el crecimiento celular in vitro (Greenberg y col. 1982) e in vivo y determina además el rango de huésped.

Por lo tanto, los genes 4 y 9 de los virus analizados podrían estar poco conservados entre los virus aislados de infecciones sintomáticas en relación a los aislados en infecciones asintomáticas.

Aunque los resultados de hibridación mostraron que no hay diferencias genéticas lo suficientemente grandes entre virus aislados de niños controles y pacientes para ser detectadas por hibridación, todavía queda la posibilidad de que diferencias puntuales pudieran ser

responsables de la mayor o menor patogenicidad del virus.

3. Diferencia en la frecuencia de infección observada dependiendo del grupo de edad al que pertenece el niño.

Nuestros resultados coinciden con resultados previos de otros autores en que sí hay una diferencia en la frecuencia con que se presenta la infección por rotavirus dependiendo de la edad del niño. Probablemente los niños mayores de 18 meses hayan adquirido anticuerpos en infecciones previas, quedando protegidos a una nueva infección.

La probabilidad de que niños menores de esta edad no hayan sido infectados previamente y desarrollado anticuerpos es mayor.

4. Frecuencia de infección por rotavirus con electroferotipo "largo" y "corto".

Quando se analizaron por electroforesis los virus aislados de niños pacientes y controles en el periodo de mayo de 84 a enero de 85 se observó que solo 1 de 11 virus provenientes de niños controles tenía patrón "corto", mientras que 12 de 31 virus aislados de niños pacientes tenían este patrón.

Esto sugiere que:

i) los virus con patrón "corto" son más patógenos que los de patrón "largo", o bien ii) que la población de niños susceptibles a infección

Por rotavirus estaba menos protegida contra virus de patrón "corto" (serotipo 2, subgrupo I) que contra los de patrón "largo" (serotipo 1, 3, o 4, subgrupo II).

Durante 1977 Espejo y col. encontraron que la frecuencia de infección de virus con patrón "corto" en pacientes fue de 11% del total de niños con rotavirus. En 1978, la frecuencia aumentó a 90%. Durante 1984-85 la frecuencia de infección por virus con patrón "corto" obtenida fue de 31% del total de niños infectados con rotavirus.

La explicación al cambio de frecuencia de un año a otro con que se presenta cada patrón pudiera ser que hay años en los que la población es susceptible a la infección por un tipo de virus, y en los años subsecuentes la población que ya adquirió anticuerpos no se infecta con ese mismo tipo. La población vuelve a ser susceptible a la infección cuando aparecen nuevos individuos en ella.

Esto es muy claro para el patrón "corto", ya que solo corresponde a un serotipo. Para el patrón "largo" se necesitarían estudios de serotipificación para poder distinguir la frecuencia individual de cada serotipo.

## BIBLIOGRAFIA

- Arias C.F., S. Lopez and R.T. Espejo. 1982. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J. Virol.* 41:42-50.
- Beidler, J.L., P.R. Hilliard, and R.L. Rill. 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.* 126:374-380.
- Bishop, R.F., G.P. Davidson, I.H. Holmes, and B.J. Ruck. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet* ii : 1281 - 1283.
- Bishop R.F., D.J.S. Cameron, A.A. Veenstra, and G.L. Barnes. 1979. Diarrhea and rotavirus infection associated with differing regimens of postnatal care of newborn babies. *J. Clin. Microbiol.* 9:225-229.
- Black, R. E., H.B. Greenberg, A. Z. Kapikian, K. H. Brown and S. Becker. 1982. Acquisition of serum antibody to Norwalk virus and rotavirus and relation to diarrhea in a longitudinal study of young children in rural Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 145:483-489.
- Both G.W., A.R. Bellamy, J.E. Street and J.E. Siegman. 1982. A general strategy for cloning double stranded RNA: nucleotide sequence of the simian 11 rotavirus gene 8. *Nucleic Acid Res.* 10:7075-7088.
- Cohen J. 1977. Ribonucleic acid polymerase activity associated with

purified calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* 36: 395.

Cohen J., J. Laporte, A. Charpilienne, and R. Scherrer. 1979. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60:177-186.

Davidson, G.P., R.F. Bishop, R.R.W. Townley, I.H. Holmes, and B.J. Ruck. 1975. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* 1: 252 - 246.

Echeverria, P., N.R. Blacklow, G. Cukor, S. Vibulbandhitkit, S. Changchawalit, and P. Boonthai. 1983. Rotavirus as a cause of severe gastroenteritis in adults. *J. Clin. Microbiol.* 18:663-667.

Engleberg, N.C., E.N. Holburt, T.J. Barret, G.W. Gary, Jr., M.H. Trujillo, R.A. Feldman, and J.M. Hughes. 1982. Epidemiology of diarrhea due to rotavirus on an indian reservation: risks factors in the home enviroment. *J. Infect. Dis.* 145:825-839.

Espejo R.T., E. Calderon, and N.Gonzalez. 1977. Distinct reo-virus like agents asociated with acute infantile gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 6:502-506.

Espejo R. T., E. Calderon, N. Gonzalez, A. Salomon, A. Martuscelli and P. Romero. 1978. Rotavirus gastroenteritis in hospitalized infants and young children in Mexico City. *Rev. lat.- amer. Microbiol.* 20:239-246.

Espejo, R. T., E. Calderon, N. Gonzalez, A. Salomon, A. Martuscelli,

and P. Romero. 1979. Presence of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico City. *J. Infect. Dis.* 139:474-477.

Espejo R.T., O. Muñoz, F. Serafin, and P. Romero. 1980. Shift in the prevalent human rotavirus tested by ribonucleic acid segment differences. *Infect. and Immunity* 27:351-354.

Espejo R.T., Lopez S., and Arias, C. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37:156-160.

Greenberg H.B., R.G. Wyatt, A.Z. Kapikian, A.R. Kalica, J. Flores, and R. Jones. 1982. Rescue and serotypic characterization of noncultivable human rotavirus by gene reassortment. *Infect. Immun.* 37: 104 - 109.

Greenberg, H. B., V. McAuliffe, J. Valdesuno, R. Wyatt, J. Flores, A. Kalica, Y. Hoshino, and N. Singh. 1983. Serological analysis of a subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun.* 39:91-99.

Gurwith, M., W. Wenman, D. Gurwith, J. Brunton, S. Feltham, and H.B. Greenberg. 1983. Diarrhea among infants and young children in Canada: a longitudinal study in three northern communities. *J. Infect. Dis.* 147:685-692.

Kalica, A.R., H.B. Greenberg, R.G. Wyatt, J. Flores, M.M. Sereno, A.Z. Kapikian, and R.M. Chanock. 1981. Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses the code for neutralization and subgroup

antigens. *Virology* 112:385-390.

Kapikian, A.Z., W.L. Cline, H.B. Greenberg, R.G. Wyatt, A.R. Kalica, C.E. Banks, H.D. James Jr., J. Flores, and R.M. Chanock. 1981. Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay (IAHA): evidence of distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infect Immun.* 33:415-425.

Kapikian A.Z., R.G. Wyatt, M.M. Levine, R.H. Yolken, D.H. Vankirk, R. Dolin, H.B. Greenberg, and R.M. Chanock. 1983. Oral administration of Rotaviruses to volunteers: induction of illness and correlates of resistance. *J. Infect. Dis.* 147: 95-106.

Konno T.H., N. Suzuki, N. Katsushima, S. Kitaoka, M. Sakamoto, N. Yazaki, and N. Ishida. 1983. Influence of temperature and relative humidity on human rotavirus infection in Japan. *J. Infect. Dis.* 147:125-128.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.

Matsuno S., and S. Inoye .1983. Purification of an outer capsid glycoprotein of neonates calf diarrhea virus and preparation of its antisera. *Infect. Immun.* 39: 155-158.

Mc Lean, B.S., and I.H. Holmes. 1981. Effects of antibodies, trypsin and trypsin inhibitors on susceptibility of neonates to rotavirus infection. *J. Clin. Microbiol.* 13:22-29.

Rodger S.M., and I.H. Holmes. 1979. Comparison of the genomes of simian, bovine, and human rotaviruses by gel electroforesis and detection of genomic variation among bovine isolates. J. Virol. 30:839-846.

Rodger S.M., R.F. Bishop, C. Birch, B. Mc Lean, and I.H. Holmes. 1981. Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. J. Clin. Microbiol., 13 : 272-278.

Totterdell, B.M., I.L. Chrystie, and J.E. Banatvala. 1976. Rotavirus infections in a maternity unit. Arch. Dis. Child., 51: 924-928.