

39
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"CORRELACION DE GRUPO, SUBGRUPO, SEROTIPO Y
ELECTROFEROTIPO DE ROTAVIRUS EN UN HOSPITAL
PEDIATRICO, MORELIA, MICH."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

JOSE ERNESTO RAMIREZ GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS: Q.B.P. HERLINDA GARCIA LOZANO
ASESOR DE TESIS: GERARDO CRUZ JIMENEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.



INSTITUTO NACIONAL
DE ESTUDIOS SUPERIORES
DE CUAUTITLÁN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:
"Correlación de Grupo, Subgrupo, Serotipo y Electroferotipo de Rotavirus en un Hospital
Pediátrico, Morelia, Mich."

que presenta el pasante: José Ernesto Ramírez González
con número de cuenta: 8738124-3 para obtener el TÍTULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 18 de Enero de 1996

PRESIDENTE	M.V.Z Gerardo Cruz Jiménez	
VOCAL	Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda	
SECRETARIO	Q.B.P. Judith Martínez Zamitiz	
PRIMER SUPLENTE	M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SEGUNDO SUPLENTE	M. en C. Stella Maris Regimensi Rivera	

"TODO HOMBRE DECIDE UNA VEZ EN
LA VIDA : SI SE LANZA EN BUSCA DEL
EXITO ARRIESGANDOLO TODO, O SE
QUEDA SENTADO A CONTEMPLAR EL
PASO DE LOS TRIUNFADORES"

DEDICATORIAS

A Dios:

Por tu infinito amor, por que en ti encuentro la respuesta a mis dudas y por dejarme caminar a tu lado.

A mis padres:

Ma. de los Angeles†, por ser siempre la fuerza que motiva cada uno de mis pasos, por haberme hecho sentir tu preferido, por tu amor constante. Te extraño. A ti mamá, con todo mi cariño y amor donde quiera que te encuentres.

José Eduardo, por tu fortaleza como hombre, padre y amigo, por el apoyo incondicional que siempre me has brindado, por el ejemplo que que nos das a mis hermanos y a mí. A ti papá, con admiración y respeto. Te quiero, mil gracias.

A mis hermanos:

Eduardo, Enrique, Edmundo y Patricia, por su cariño, apoyo y comprensión, esperando siempre ser una familia unida. A todos los quiero.

A Herlinda García:

Por tu amistad, por el apoyo en el desarrollo y dirección de este trabajo y por todas las oportunidades que me has brindado durante mi formación profesional. Gracias.

A Mónica Mayté:

Por permitirme coincidir en tu vida, por estar conmigo en las buenas y en las malas, porque enseñar y aprender de tí imprime una motivación especial en mi vida. A ti con amor y cariño.

AGRADECIMIENTOS

A la FES-Cuautitlán, a mis profesores y compañeros de la generación 17^{ava} de QFB.

A el profesor Granda Cruz por el apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

Al INDRE y a todo el equipo del Laboratorio de Rotavirus, Araceli, Andrés, Martín, Elvira y Vicky.

A mis compañeros y amigos: Victor, Fernando, Gerardo, Antonio, Ramón, Israel y Doniel, por las momentos inolvidables e inmejorables que posé con ustedes.

A Raúl, Gerardo, Fernando P., Fernando F., Víctor G., Jorge, Oscar, Rubén, Johana, Gabriela y Ariodno por su amistad incondicional.
Gracias AMIGOS

A todos, mil gracias

José Ernesto

GLOSARIO

abs	Absorbancia
AcMo	Anticuerpos Monoclonales
AgNO ₃	Nitrato de plata
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido Desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleótidos trifosfatados
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático
H ₂ SO ₄	Acido sulfúrico
IgA	Inmunoglobulina A
IME	Inmunomicroscopía Electrónica
K	Potasio
kd	kilodaltones
ME	Microscopía Electrónica
min	minutos
Na	Sodio
nm	nanómetro
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	picogramos
RV	Rotavirus
RVH	Rotavirus Humanos
RNA	Acido Ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa Reversa
sol.	solución
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetrametilenendiamina
UV	Ultravioleta
V	volts
µg	microgramos
µl	microlitros

4.3.1.2. Preparación del Gel de Poliacrilamida al 10%	32
4.3.1.3. Electroforesis	33
4.3.1.4. Tinción de Geles de Poliacrilamida	33
4.3.2. PAGE (Corrimiento Vertical para determinar electroferotipo).	34
4.3.3. ELISA	34
4.3.3.1. Preparación de la Muestra	35
4.3.3.2. Procedimiento	35
4.3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	35
4.3.4.1. Extracción de RNA viral a partir de materia fecal	36
4.3.4.2. Primera Amplificación RNA-cDNA	36
4.3.4.3. Segunda Amplificación	37
4.3.4.4. Observación de los Productos Amplificados en geles de agarosa al 2%	37
5.-Resultados.....	39
6.-Discusión	55
7.-Conclusiones	59
8.-Bibliografía.....	61

RESUMEN

En este estudio se analizan un total de 346 muestras fecales para el diagnóstico y tipificación de Rotavirus del Grupo A (Enero 1994-Enero 1995) de una población infantil menor de tres años, admitida por diarrea aguda y deshidratación severa en un Hospital Pediátrico de Morelia, Mich. Los resultados obtenidos en el Laboratorio, revelan que 148 (42.7%) de las muestras clínicas son positivas a Rotavirus por Rotaforesis. Mediante el análisis de perfiles electroforéticos se determinó que 129 (87.1%) de las muestras positivas a Rotavirus presentaron un patrón electroforético "largo" y solo 19 (12.8%) patrón electroforético "corto". Además de observar una gran diversidad de electroferotipos. La tipificación por RT-PCR revela que el serotipo más frecuente fué el serotipo 1 (45.9%), seguido del serotipo 2 (19.6%), serotipo 3 (17.6%) y serotipo 4 (12.8%) respectivamente; 6 (4.0%) muestras no pudieron ser tipificadas. La infección por Rotavirus se observó con una mayor frecuencia en el intervalo de edad de 7-12 meses (62.8%), presentando diarrea líquida (64%) vómito (80%) y fiebre leve (70%).

1.- INTRODUCCION

La gastroenteritis viral aguda es una enfermedad muy común que se presenta en forma endémica o epidémica y afecta a sujetos de todos los grupos de edad. Después de la vía respiratoria, la ruta fecal-oral es la segunda en importancia en la transmisión de agentes y es por ésta por donde se transmiten las enteritis virales. (Soler, 1994)

La gastroenteritis no-bacteriana es un síndrome que afecta a gran parte de la población mundial. En países desarrollados es la mayor causa de morbilidad en niños pequeños, mientras que en los países en vías de desarrollo es la mayor causa tanto de morbilidad como de mortalidad en infantes. (Kapikian, 1988)

La diarrea humana se conoce desde los tiempos pre-Hipocráticos, algunos descubrimientos realizados en el siglo pasado en el campo de la bacteriología y parasitología en relación con los agentes productores de gastroenteritis revelaron la etiología de una parte de estos síndromes. Posteriormente, apareció además de estos descubrimientos, una parte significativa de gastroenteritis infantil epidémica a la cuál no se le asumía ningún agente etiológico ni bacteriano ni parasitario.

Debido a que ninguno de los agentes estudiados anteriormente era el productor de la diarrea aguda, se creía que muchas de estas infecciones gastrointestinales podrían deberse a agentes virales. (Kapikian, 1988; Kapikian, 1990)

Durante los años 50's, diferentes investigadores indujeron enfermedades gastrointestinales en diferentes voluntarios mediante la administración de filtrados fecales libres de bacterias. En los años 60's, Adams y Kraft (Adams, 1963) reportaron la observación por Microscopía Electrónica (ME) de un virus en la diarrea epizootica de ratones infantiles y poco después, Malherbe y col. aislaron en cultivos celulares a un virus de 70 nm al cuál llamaron SA-11 por las iniciales de simian agent. (Malherbe, 1967)

En 1972, Kapikian y col. fueron los primeros en informar la observación en ME de un virus de 27 nm asociado con gastroenteritis viral humana, al cuál llamaron agente Norwalk. (Kapikian, 1972) Poco después, en 1973, Bishop describe el primer Rotavirus humano asociado a diarrea aguda en infantes. (Bishop, 1973)

Gran parte de los laboratorios de todo el mundo demostraron rápidamente la presencia de Rotavirus en materia fecal de niños e infantes con enfermedad diarreica y se reportó a este virus como el principal agente etiológico viral de diarrea en niños. Las enteritis virales tienen patofisiología y presentación clínica común, en general el síndrome es autolimitado, su inicio es abrupto y se manifiesta con diarrea, náusea, vómito, fiebre baja, dolores abdominales y de cabeza, anorexia, mialgia y malestar general. (Kapikian, 1988)

Los virus que producen la diarrea aguda, inducen lesiones a nivel del intestino delgado, replicándose en las células epiteliales de las

velosidades. En las diarreas de las enteritis virales se presentan evacuaciones líquidas y abundantes. (Kapikian, 1988)

De los agentes virales conocidos, Rotavirus es el agente etiológico productor de gastroenteritis más importante en los casos de diarrea aguda infantil. (Soler, 1994; Kapikian, 1988)

1.1. Generalidades de los Rotavirus

Los Rotavirus humanos (RVH) se han detectado aproximadamente del 30 al 60% en muestras de niños pequeños con gastroenteritis aguda. Han sido asociados con enfermedad diarreica en ratones, borregos, conejos, monos, antílopes, chimpances, gorilas, pollos; todos ellos en sus primeras etapas de vida.

Los Rotavirus, se consideran dentro de la familia Reoviridae; (Shaw, 1993; Kapikian, 1988; Kapikian, 1990; Puerto-Solis, 1993; Estes, 1989) tienen semejanza morfológicamente con los Orbivirus y con los Reovirus, pero difieren antigénicamente por inmunomicroscopía electrónica y fijación de complemento. (Dennis L, 1990; Soler, 1994)

En células infectadas, los Rotavirus presentan diferente morfología entre sí, se ha definido la existencia de 3 tipos de partículas: 1) partículas completas, compuesta de una doble cápside y de aproximadamente 70 nm de diámetro como se observa en la figura 1; 2) partículas de cápside sencilla que miden aproximadamente 55 nm de diámetro y 3) partículas que poseen únicamente el core

(nucleocápside), y que presentan un diámetro de aproximadamente 37 nm. El término "Rotavirus", proviene del latín ROTA que significa rueda y fue sugerido porque la superficie definida de la cápside externa da la apariencia de una rueda de carreta. (Kapikian, 1988)

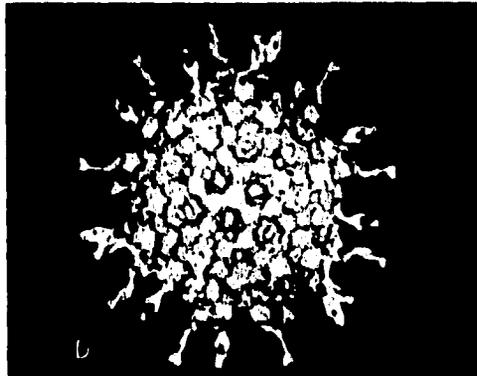


Fig.1.- Partícula viral completa de Rotavirus
(Shaw, 1994)

1.2. Características Genómicas de los Rotavirus

El genoma de los Rotavirus está compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) que permite diferenciarlos de los Reovirus y Orbivirus, los cuales poseen solamente 10 segmentos de RNA. (Kapikian, 1988; Dennis L., 1990) Cada uno de estos segmentos codifica cuando menos para una proteína, figura 2. Este agente está cubierto por una doble cápside protéica, la interna formada por VP6 y la externa por VP7 y VP4 como se observa en la figura 2. Las tres diferentes especies morfológicas del Rotavirus pueden poseer o no el material genómico, denominándose partículas vacías cuando no está

presente el RNA en el interior. Este RNA de doble cadena no es infeccioso por sí mismo ya que para transcribirse a RNA mensajero y poder traducirse a las proteínas virales, que son las que presentan propiedades antigénicas, necesita de una RNA polimerasa que se encuentra en las partículas virales completas. (Kapikian,1988)

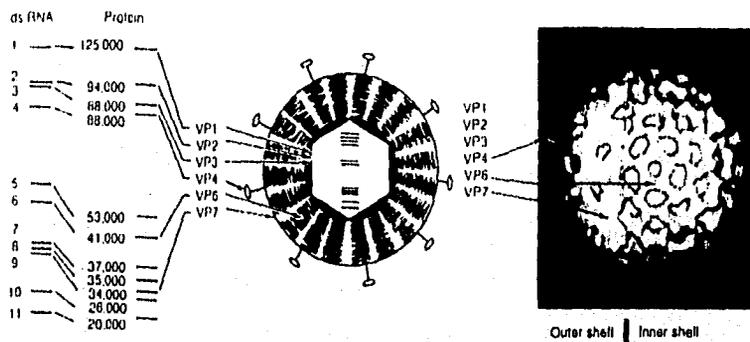


Fig 2 . Representación de los 11 segmentos de RNA; proteínas de la doble cápside. (Kapikian, 1990)

Los patrones de migración de los segmentos de RNA de Rotavirus, determinados en geles de poliacrilamida, son de importancia no solo en la caracterización biofísica de éstos agentes sino también como ensayos epidemiológicos. El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada eléctricamente cuando esta se somete a un campo eléctrico; (Quezada, 1985) en este caso la partícula de interés es el RNA.

1.3. Proteínas Virales

Como ya se mencionó, este agente viral está cubierto por una doble cápside protéica. Las proteínas virales pueden ser de dos tipos: a) estructurales, que forman parte del virus y b) no estructurales, aquellas que se localizan en células infectadas con Rotavirus. El virión maduro contiene seis proteínas estructurales denominadas VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7. (Shaw, 1993) Se han determinado todas las proteínas codificadas por cada segmento de RNA genómico viral.

La cápside externa está constituida por dos proteínas estructurales: a) VP7, codificada por los segmentos 7, 8 ó 9 dependiendo de la cepa viral. (Hussein, 1993; Padilla, 1993) Es una proteína glicosilada que se encuentra en el exterior de la partícula viral, induce anticuerpos neutralizantes que definen serotipo de las cepas virales. Además, esta proteína es responsable de la unión del virus a la célula hospedera (Kapikian, 1988; Estes, 1989) y b) VP4, codificada por el segmento 4, (Hussein, 1993; Padilla, 1993) se conoce como la hemaglutinina y es cortada en el intestino por la acción de la tripsina en VP5 y VP8, lo cual aumenta la infectividad del virus. VP4 es una proteína determinante de virulencia y crecimiento en cultivo celular, y parece estar implicada en la unión a la célula blanco y penetración a la misma (Shaw, 1993; Estes, 1989). Se ha definido su papel como proteína inductora de anticuerpos neutralizantes en los últimos años. Cuando las partículas pierden las proteínas VP4 y VP7 se convierten en partículas de cápside sencilla y contienen solamente VP1, VP2, VP3 y VP6. La proteína VP6 es codificada por el segmento 6 del genoma

viral y es la más abundante en la cápside interna. Es altamente antigénica e inmunogénica. Tiene un papel muy importante en la estructura de la partícula viral, ya que mantiene la conformación y organización del centro. Es la proteína que más frecuentemente se utiliza para el diagnóstico de los Rotavirus. (Estes MK , 1989)

Las proteínas VP3 (98kd), VP2 (102kd) y la VP1 (125kd) se encuentran formando la nucleocápside. La proteína VP1 es codificada por el segmento 1 del genoma viral en todas las cepas estudiadas hasta la fecha. Presenta cierto grado de homología con algunas enzimas como las RNA polimerasas virales lo que sugiere que VP1 puede ser la RNA polimerasa. (Estes MK, 1989) VP2 es la mayor de estas proteínas y tiene como función la de reclutar al RNA de doble cadena para el ensamble viral, por lo que juega un papel importante en la morfogénesis del virus. (Labble M, 1991) VP3 es codificada por el segmento 3 y es la proteína estructural de menor peso molecular.

Las proteínas no estructurales son cinco, denominadas NS53, NS35, NS34, NS28 y NS26.

Algunos investigadores han determinado la NS53 en células infectadas, pero no en las partículas virales, debido a que la síntesis de este polipéptido en las células infectadas con Rotavirus demuestra que es corto el tiempo en que esta proteína es detectable después de la infección. Es un producto del segmento 5 del genoma viral. (Labble M, 1991)

La NS35 es codificada por uno de los segmentos 7 , 8 ó 9 del genoma, dependiendo de la cepa que se trate. Experimentos inmunocitológicos utilizando anticuerpos monoclonales específicos, han localizado esta proteína en el viroplasma de las células infectadas. (Bass,1990)

La proteína NS34 es una proteína ácida, ha sido detectada mediante técnicas de Western blot con ácidos nucleicos previamente marcados. Su presencia se ha determinado en lisados celulares infectados. (Mattion,1992) Esta proteína junto con NS53 y NS35 presenta actividad de unión al RNA y son componentes intermediarios en la replicación del virus (Hua, 1994)

La NS28 es una proteína no estructural con un peso molecular aproximadamente de 20 kd y esta glicosilada. Esta proteína se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico. (Mass, 1990)

La NS26 es una proteína con un peso molecular de 26 kd. Inicialmente fué catalogada como una proteína estructural, ya que en una electroforesis migraba con las proteínas estructurales de bajo peso. (Estes MK, 1989)

1.4. Clasificación de los Rotavirus

Los Rotavirus se clasifican en Grupos, Subgrupos, Serotipos y Electroferotipos.

Grupos: Los virus que comparten el determinante antigénico presente en la estructura de la proteína VP6 se les denomina Rotavirus del grupo A. Aquellos que no presentan este determinante antigénico se les denomina Rotavirus no-A, actualmente se clasifican en 6 grupos: B, C, D, E, F y G. (Kapikian, 1990)

Los Rotavirus del grupo A se les conoce como los Rotavirus humanos (RVH) y son la principal causa de diarrea (Hussein, 1993) en todo el mundo ya que los serotipos pertenecientes a este grupo se presentan con mayor frecuencia en el hombre (Ward, 1991; Padilla, 1990). Los RVH se pueden diferenciar con anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína VP6 en dos subgrupos llamados I y II.

Subgrupos: la asignación de los subgrupos está asociado con la proteína de la cápside interna VP6. Hasta el momento han sido identificado dos subgrupos, I y II, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos a esta proteína. (Ward, 1991)

Serotipos: Como ya se mencionó, las proteínas de la cápside interna VP7 y VP4 inducen anticuerpos neutralizantes que definen el serotipo de las cepas virales. (Soler, 1994; Flores, 1990) La neutralización específica de VP7 se refiere a los serotipos G (se le asignó la letra G en

relación a la Glicoproteína) y la de VP4 se refiere a los serotipos P (por ser una proteína sensible a las proteasas). A la fecha se conocen 14 serotipos G y 12 serotipos P entre los Rotavirus mamíferos y de las aves. (Yoshiyu, 1993; López, 1993) Se han identificado 9 Serotipos G y 7 Serotipos P en humanos; los serotipos que comúnmente están asociados con la enfermedad diarreica son los G1-G4. (Gouvea, 1995)

Inicialmente se utilizaba la especificidad producida por VP7 para definir los serotipos, pero en los últimos años se ha estudiado la gran importancia que presenta la proteína VP4 en cuanto a la clasificación de los serotipos. (Shaw, 1993; Coulson, 1993; DoCormo, 1994; Padilla, 1993; Yong, 1994; Gentsch, 1992) Dentro de los serotipos G se definen 9 que infectan a humanos: serotipos 1-4, 8, 9, 12-14. Estos serotipos se relacionan directamente con los subgrupos I y II quedando de la siguiente manera: los serotipo 1, 3, 4 y 9 pertenecen al subgrupo II y los serotipos 2 y 8 al subgrupo I. De los últimos tres serotipos, 12-14, poco se conoce en cuanto a su epidemiología ya que han sido de reciente identificación. (Gentsch, 1992 ; Padilla, 1990)

Electroferotipos: Los patrones electroforéticos presentados en los geles de poliacrilamida muestran que existen dos tipos de electroferotipos: patrones "largos" y patrones "cortos", figura 3. Lo anterior se debe principalmente a la diferencia de los pesos moleculares de los segmentos 10 y 11 del RNA; en los patrones cortos, estos segmentos poseen un peso molecular más grande que los segmentos de los patrones "largos" y presenta una menor migración. Recientemente se ha reportado la presencia de patrones "super cortos"

con una migración menor a los "cortos" y patrones "super largos" con una migración mayor a los "largos". Existe una relación entre subgrupo y electroferotipo, los Rotavirus que presentan patrón electroforético "corto" están relacionados con los Rotavirus del subgrupo I, y los que presentan patrón electroforético "largo" con los del subgrupo II. Tabla 1. Reportes en la literatura mencionan que lo anterior no siempre se presenta ya que se han encontrado cepas virales de serotipo 2 correspondientes al subgrupo I que presentan patrón electroforético "largo". (Ward, 1991; Taniguchi, 1992; Noel, 1991; Bingnan, 1991)

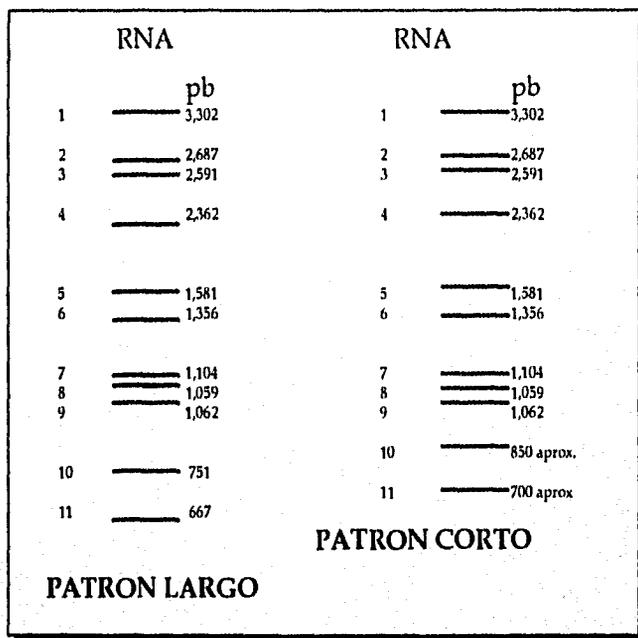


Figura 3. Patrones Electroforéticos de Rotavirus 11 segmentos de RNA viral (Estes, 1989; Kapikian, 1990)

De los otros 6 grupos de Rotavirus identificados, el grupo B corresponde a los pararrotavirus humanos y ha sido asociado con epidemias de diarrea aguda en adultos en China, el grupo C se ha reportado esporádicamente como causante de diarrea en niños, y los 4 restantes no han sido encontrados en humanos. (Soler, 1994; Puerto-Solis, 1993)

GRUPO	SUBGRUPO	SEROTIPO	ELECTRO-FEROTIPO
A	I	2	Corto
		8	
	II	1	Largo
		3	
		4	
	9		

Tabla 1. Clasificación de los Rotavirus Humanos (Soler, 1994)

1.5. Patogenia y Sintomatología

Rotavirus es transmitido por la vía fecal-oral. Estudios en voluntarios demostraron claramente que la administración oral de muestra fecal positiva a Rotavirus provoca una enfermedad diarreica. La rápida aparición de anticuerpos en los primeros años de vida en todas las poblaciones estudiadas permite sugerir que Rotavirus

también puede transmitirse por vía respiratoria, sin embargo, no existen evidencias experimentales que fundamentan lo anterior. (Kapikian, 1988)

Mediante estudios clínicos, se ha estimado que la enfermedad diarreica provocada por Rotavirus presenta un período de incubación menor a las 48 hrs. (Kapikian, 1988)

Estudios limitados en biopsias de intestino delgado de niños hospitalizados con infección por Rotavirus han mostrado acortamiento en las vellosidades intestinales, desprendimiento prematuro e infiltración de células mononucleares en lámina propia, distensión de las cisternas del retículo endoplásmico, agrandamiento de las mitocondrias. Estas alteraciones se producen en zonas que quedan intercaladas con áreas de mucosa normal. Las células desprendidas son reemplazadas por otras inmaduras provenientes de las criptas que en lugar de tener funciones de absorción como los enterocitos maduros de las vellosidades, son de tipo secretor lo que sumado a una disminución del área total de absorción a causa del acortamiento de las vellosidades, ocasiona una diarrea profusa (Kapikian, 1988; Kapikian, 1990; Estes, 1989)

Todas las enteritis virales tienen en común tres síntomas: náusea, vómito y diarrea. Esta última se caracteriza por evacuaciones líquidas y abundantes, que contienen cantidades crecientes de electrolitos principalmente Na^+ y K^+ . (Kapikian, 1988)

La sintomatología esta directamente relacionada con la edad del paciente, los niños menores de 3 meses y los adultos se infectan pero frecuentemente esas infecciones son asintomáticas o muy leves. Los síntomas más graves se presentan en niños de 6 a 24 meses, haciéndose más leve conforme el niño presenta mayor edad.

1.6. Métodos de Diagnóstico para Rotavirus

Las manifestaciones clínicas por sí mismas no son suficientes para llegar a un diagnóstico etiológico de gastroenteritis por Rotavirus, ya que éstas son semejantes a las presentadas por las infecciones bacterianas. Por lo tanto se requiere de técnicas de diagnóstico adecuadas (Puerto-Solis, 1993). Existen diversos métodos que pueden emplearse para realizar el diagnóstico de Rotavirus, actualmente se utilizan las siguientes:

1.6.1. Microscopía Electrónica (ME)

Cuando se dispone de un microscopio electrónico su empleo para el diagnóstico de Rotavirus resulta un método rápido y eficiente. En general es de gran utilidad en casos en que no se tenga un alto número de muestras, y nos permite diagnosticar brotes en tiempos muy cortos. La eficiencia de la ME se basa en que se encuentran de 10^7 a 10^9 partículas virales por ml de heces, lo que implica gran facilidad para la observación microscópica. Además, la morfología de estos virus es muy característica (fig.4), finalmente, tiene la ventaja de que se pueden detectar otros virus simultáneamente. (Kapikian, 1990)

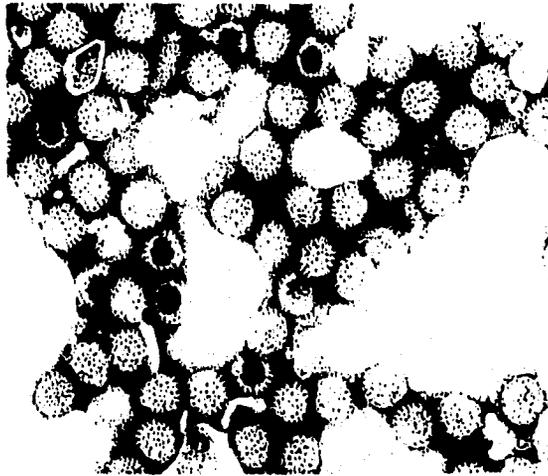


Figura 4. Microscopía Electrónica de Rotavirus
(Kapikian, 1988)

1.6.2. La Inmunomicroscopía Electrónica (IME)

Es una variante del método anterior pero con el uso de anticuerpos que inducen la aglutinación de partículas virales. Se utiliza cuando se desea tipificar a los Rotavirus pero es indispensable disponer de los anticuerpos monoclonales específicos correspondientes para que puedan diferenciarse grupos, subgrupos y serotipos. (Soler, 1994)

1.6.3. Electorforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE)

Se trata de otro método que permite el diagnóstico de Rotavirus en muestras de heces. Consiste en colocar una muestra de extracción de RNA viral en un bloque de gel de poliacrilamida y después de someterla al paso de corriente, detectar la migración de los 11 segmentos de RNA viral que se encuentran en las partículas virales. (Herring, 1982) El patrón de migración es específico, por lo tanto existen variaciones ligeras entre cada muestra analizada. En México, se ha desarrollado un ensayo por el Dr. Romilio Espejo y col., que permite realizar esta técnica en laboratorios con un mínimo de equipo especial. Esta técnica se ha llamado ROTAFORESIS. (Espejo , 1978)

1.6.4. Ensayos Inmunoenzimáticos (ELISA)

Se basa en la detección de antígeno viral específico empleando inmunoensayos, se reporta buena sensibilidad y especificidad. (Alvarez, 1982) Comercialmente se encuentran disponibles los ELISA para el Rotavirus del grupo A utilizando anticuerpos monoclonales específicos a VP6. De acceso experimental pueden conseguirse ELISA que permiten identificar los subgrupos (I o II) y serotipos, estos emplean anticuerpos monoclonales y se usan casi exclusivamente en estudios epidemiológicos o de control de poblaciones vacunadas. (Dako, 1982)

1.6.5. Aglutinación en Látex

Es una prueba cualitativa para la detección directa de antígeno de Rotavirus en muestras fecales humanas, esto permite la detección de los cuatro serotipos (1-4) en un tiempo de 10 minutos . En este procedimiento se aplica el principio de aglutinación en látex, estas partículas son mezcladas con una suspensión fecal diluída; cuando la suspensión fecal contiene antígeno de Rotavirus ocurre una reacción de aglutinación macroscópicamente visible. (Ruiz, 1995)

1.6.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta metodología conocida como PCR por sus siglas en Inglés (*polymerase chain reaction*), permite la rápida amplificación de material genético, DNA, (Gouvea, 1993; James, 1991; Nakagomi, 1991) para su posterior análisis y se ha convertido en una herramienta indispensable tanto en la investigación básica como en el diagnóstico. (Olivera, 1995)

La técnica de PCR ha tenido un impacto muy grande en el diagnóstico y tipificación debido a que tiene gran sensibilidad (puede detectar hasta 2 pg de RNA viral), además de que permite tener resultados en una cuantas horas. (Gouvea, 1992)

La tipificación de Rotavirus se realiza mediante una RT-PCR (transcripción reversa de RNA a cDNA) a partir de materia fecal realizando una extracción de RNA viral (Gouvea, 1993; Chomazynski 1987) y utilizando oligonucleótidos específicos para grupo (A,B y C) y

para serotipo (1-4, 8 y 9) del segmento 9 (6 segmento 8) que codifica para VP7. (Gouvea, 1990)

1.7. Epidemiología

Rotavirus se ha destacado por ser el agente etiológico viral más frecuente en la gastroenteritis aguda en neonatos y niños menores de 2 años en todas las zonas del mundo en donde esta enfermedad ha sido estudiada epidemiológicamente, (Kapikian, 1988) aún en áreas donde el cólera es común, estos virus provocan enfermedades diarreicas con mayor frecuencia que el cólera. (Cimuns, 1995)

Aunque la diarrea por Rotavirus se presenta con gran frecuencia en países desarrollados, la enfermedad tiene una mortalidad baja en éstas localidades. (Kapikian, 1990) Se estima que hay 140 millones de casos de gastroenteritis con casi 1 millón de muertes cada año. En los Estados Unidos hay 1 millón de casos, 7 mil hospitalizaciones y de 75 a 125 muertes anualmente. (Ho, 1988; Le Baron, 1990)

En países en vías de desarrollo la magnitud de la infección por Rotavirus es de gran importancia debido a que en éstos se reportan tasas de morbilidad y mortalidad altas. En Brasil, se realizó una vigilancia epidemiológica durante 5 años en diferentes entidades del país, encontrando a Rotavirus en un 16% del total de la muestras analizadas; en Venezuela, se reportó una distribución de los diferentes serotipos durante 11 años, siendo el serotipo 2 el más frecuente, seguido de los serotipos 1,4 y 3. (White, 1991); en Bangladesh, se

analizó la caracterización de Rotavirus del grupo A a lo largo de 1 año, reportando 454 (10%) casos positivos a Rotavirus (Ward, 1991); y en México, se llevó a cabo un estudio monitoreando a 200 niños desde su nacimiento hasta los 2 años de edad, encontrando un 49 % de infección por este agente. (Velázquez, 1993) Los estudios anteriores demuestran el papel importante que juegan los Rotavirus en países en vías de desarrollo.

Los Rotavirus infectan generalmente en época invernal, presentándose así picos de diarrea aguda infantil en los meses fríos de cada localidad. (LeBaron, 1990; Pereira, 1994; Cook, 1990)

La estacionalidad es una característica importante en la diarrea por Rotavirus. "Gastroenteritis Invernal" y "vómito invernal" fueron los nombres de las enfermedades diarreicas antes de que los Rotavirus fueran identificados.

De un total de 34 estudios estacionales sobre la etiología de Rotavirus en diferentes partes del mundo, muestran que en países de clima templado se presenta un pico de incidencia en el invierno, mientras que en países tropicales, no se define una época estacional donde se encuentre la infección por éste virus, sino que es detectado durante todo el año. (Cook, 1990)

Asimismo, en un estudio reciente de hospitalizaciones por diarrea en los Estado Unidos, sugieren que la epidemia anual por

Rotavirus puede seguir una secuencia regional del oeste hacia el este.
(LeBaron, 1990)

La frecuencia de infección con manifestaciones clínicas es baja en los niños de 1 a 6 meses de edad, después, aumenta considerablemente su frecuencia de 6 meses a 3 años y disminuye de nuevo en los niños reinfectedos, sin embargo la infección pocas veces llega a producir la enfermedad. Tabla 2

Edad en meses	No. de casos	RV positivos	% positividad
0-3	32	6	18.8
4-6	26	6	23.1
7-9	21	9	42.9
10-12	11	6	54.5
13-24	17	8	47.1
>24	4	0	0

Tabla 2. Frecuencia de Rotavirus en niños con Gastroenteritis. Datos obtenidos de un estudio realizado en Bangladesh (Tabassum, 1994).

La tipificación es una herramienta útil para estudiar las características epidemiológicas de los Rotavirus en grandes poblaciones y estimar la necesidad de una vacuna que sea capaz de proteger contra todas las cepas. (Woods, 1992)

Cuatro serotipos de mayor incidencia (1-4) y dos de menor (8 y 9) que infectan humanos, han sido identificados utilizando anticuerpos específicos contra la glicoproteína VP7 .

En la Tabla 3, se muestra la distribución de los serotipos más comunes (1-4) en 4 diferentes continentes; en Europa se realizó un estudio epidemiológico de los serotipos de Rotavirus Humanos en Londres durante un período de 6 años (1984-1990); en Africa se tipificaron cepas de niños de Bangui; en América la diversidad de serotipos en niños mexicanos (Cd. México y Mérida) con gastroenteritis; y en Asia la tipificación de Rotavirus Humanos en una área de Tokio.

		SEROTIPOS				
Continente	Localidad	1	2	3	4	N/T
Europa	Londres	60%	11%	24%	3%	
Africa	Bangui	71%	15%	13%		
América	México	29%	11%	10%	10%	3%
Asia	Tokio	65%	5%	26%		3%

Tabla 3. Distribución de los cuatros serotipos más comunes en los cuatro continentes (Noel, 1991; Georges, 1988; Padilla, 1990; Ushijima, 1994)

Estudios realizados en el CDC (Center for Disease Control) de ocho países de los cuatro continentes, muestran la distribución de los

serotipos de Rotavirus Humanos, donde se encontró que el 48% fué serotipo 1, 8% serotipo 2, 15% serotipo 3, 7% serotipo 4. (Woods, 1992)

Como podemos observar, el serotipo de Rotavirus que infecta más frecuentemente a nivel mundial es el serotipo 1, aunque existe la hipótesis de que el serotipo puede variar en cada región y año con año.

1.8. Inmunidad y Tratamiento

La infección por RVH induce una respuesta inmune homotípica y heterotípica que se asocia a protección cruzada. Se ha demostrado que las infecciones neonatales por Rotavirus no confieren inmunidad contra reinfecciones con otras cepas de Rotavirus, pero si protegen contra el desarrollo de sintomatología clínica severa. Existe información acerca de que la protección contra la diarrea está mediada principalmente por anticuerpos neutralizantes presentes en el lumen del intestino y que los anticuerpos séricos tienen poca influencia. (Kapikian, 1990)

Estudios realizados en Guatemala muestran que un niño puede sufrir más de una infección por Rotavirus desde el nacimiento hasta los tres años de edad y que estas infecciones secuenciales son producidas por Rotavirus de distinto subgrupo o de distinto serotipo. (Mata, 1983)

Existe consenso de que la efectividad de una vacuna contra Rotavirus dependerá en gran parte de la capacidad de la misma para estimular anticuerpos intestinales de tipo IgA así como otras formas de

inmunidad local. Por esta razón, la mayoría de las vacunas en prueba consisten de virus atenuados. Se han desarrollado 5 candidatos de vacunas que están siendo probadas. Los resultados hasta ahora obtenidos son: con Rotavirus bovino (RIT 4237) y (WC3), preparadas de cepas virales de bovino adaptadas a cultivo y que no han producido resultados alentadores en pruebas clínicas. (Santosham M.,1991 ;Ward, 1990) Otras dos vacunas, obtenidas por ingeniería genética combinando Rotavirus humano-bovino (WC179-9) y humano-Rhesus, en las cuáles se incorporó la proteína de superficie de Rotavirus humano en el virus animal correspondiente, se están probando en Perú y en los Estados Unidos. (Clark HF,1990 ; Wright , 1991) La M37 es una vacuna con virus atenuados pertenecientes al serotipo 1 y que muestran reacción cruzada con otros serotipos de Rotavirus humano. (Midthun K. ,1991) Esta vacuna es buena candidata para ser utilizada porque el serotipo 1 es el más prevalente a nivel mundial.

TRATAMIENTO. No hay tratamientos específicos para las gastroenteritis virales, la identificación de los agentes involucrados, que puede realizarse rápidamente, evita el tratamiento antimicrobiano con antibióticos.

La forma de tratar las diarreas agudas por Rotavirus es reemplazando líquido y electrolitos por vía oral y en caso de intolerancia oral la vía de administración debe de ser intravenosa. Se debe continuar con la alimentación en forma normal y no indicar el ayuno.

Se ha utilizado un inhibidor de proteasas como un tratamiento profiláctico de la diarrea aguda causada por Rotavirus, el BABIM, que es un compuesto que bloquea los sitios de corte donde actúa la tripsina en la proteína VP4 de la capa externa del virus. (Puerto-Solis, 1993)

2.- OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la correlación de grupo, subgrupo, electroferotipo y serotipo de Rotavirus de una población infantil menor de tres años admitidos por diarrea aguda y deshidratación en un Hospital Pediátrico de la Cd. de Morelia, Mich.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Diagnóstico de Rotavirus por la técnica de Rotaforesis a partir de muestra fecal.

Determinación de los Rotavirus Humanos del grupo A (RVH) y correlacionar los diferentes tipos de electroferotipos (patrón "corto" y patrón "largo"); subgrupos y serotipos.

Tipificación de las cepas virales mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos de serotipo (1,2,3,4).

3.- JUSTIFICACION

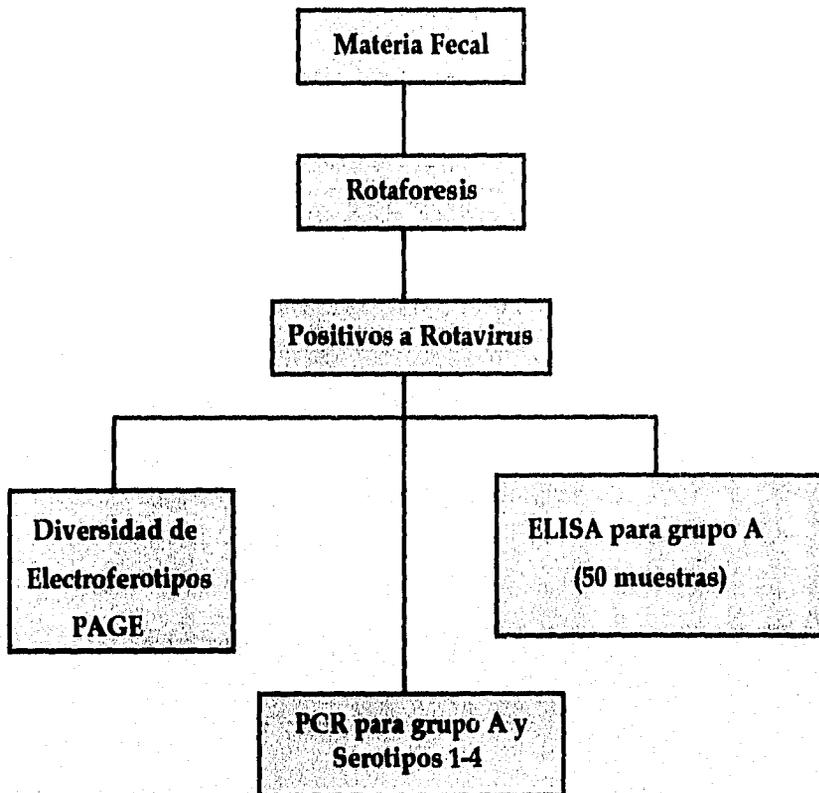
En la última década, se han considerado a los Rotavirus los principales agentes virales productores de diarrea aguda con deshidratación severa en niños menores de tres años de edad en todo el mundo. Estos virus son una causa importante de morbilidad infantil en ciudades desarrolladas y de mortalidad en los países en vías de desarrollo.

Los estudios epidemiológicos para determinar la frecuencia de la gastroenteritis aguda por Rotavirus muestran la elevada asociación que tienen estos virus con hospitalizaciones y muertes pediátricas. No obstante la información sobre la infección por Rotavirus en nuestro país se encuentra limitada.

El conocimiento acerca de estos virus ha aumentado considerablemente en las áreas de Biología Molecular, Bioquímica, en los aspectos clínicos y epidemiológicos, así como también en la prevención. Estos avances han permitido destacar la importancia que los Rotavirus tienen en la salud pública.

4.- MATERIAL Y METODOS

4.1. Diagrama de flujo



4.2. Material

4.2.1. Material Biológico

346 muestras de materia fecal provenientes del Hospital Infantil de Morelia, Mich. "Eva Sámano de López Mateos".

Control positivo (extracto de RNA viral de muestra clínica positiva a Rotavirus)

4.2.3 Equipo

Centrífuga Clínica

Vortex GENIE-2 VWR

Cámara Horizontal para electroforesis

Lector de ELISA Dynatech L. MR 5000/7000

Termociclador Perkin-Elmer

Transiluminador UV Ultra-Lum UVB-20

Microcentrifuga HERMLE Z-252

Cámara de electroforesis MINI PROTEAN-II BIORAD

Fuente Poder 200/2.00 BIORAD .

4.2.2. Material de Laboratorio

Pipetas Pasteur

Tubos de ensaye 12 x 75

Guantes desechables

Pipetas de 1, 2, 5, 10 mL

Vidrios (7.5 x 6.5 cm.)
Separadores de tefón
Peines de teflón
Pinzas
Pipeta multicanales COSTAR de 20 a 200 ul
Tubos Eppendorf 1.5 mL
Micropipetas Gislon de 10-100 ul
Puntas COSTAR de 200 ul
Cristalería común de Laboratorio

4.2.4 Reactivos

Sol. A 5X (Solución de lisis)
Sol. B (Fenol)
Sol. C 10X (Xilene cianol)
Sol. D 10X (Glicina)
Sol. E 10X (Etanol,Formaldehído)
Sol. F 100X (Nitrato de plata)
Sol. G 125X (Formaldehído)
Solución Salina Fisiológica
Acido acético
Cloroformo
Agarosa 1%
Sol de Monómeros (Acrilamida ,Bis-acrilamida)
Tris pH 8.8
Persulfato de amonio 2%
Tetrametilenendiamina (TEMED)

Etanol
Alcohol isopropílico
Isotiocianato de guanidina
Oligonucleótidos específicos de grupo (Beg 9 y End 9) y serotipo
Taq. polimerasa
Transcriptasa Reversa
dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
RNA sin
Buffer para PCR 10X
Dimetil-sulfóxido (DMSO)
1 Kit de diagnóstico IDEA ROTAVIRUS DAKO para ELISA

4.3. Métodos

4.3.1. Rotaforesis .

Rotaforesis es un kit de diagnóstico desarrollado por el Dr. Espejo y col. (1982) en el cuál se lleva a cabo la detección directa de RNA viral a partir de materia fecal, mediante un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida y posterior tinción de plata.

4.3.1.1 Extracción de RNA viral a partir de materia fecal.

Para realizar la extracción del RNA viral se colocaron 0.2 gr de la muestra en 300µl de Solución Salina Fisiológica (de consistencia sólida) y mezcló con vortex. Se centrifugó a 5 000 rpm durante 15 minutos se

separó el sobrenadante. (si las muestras fueron diarréicas se ocuparon directamente).

Se colocaron 300 μ l de la muestra (sobrenadante) y se añadieron 300 μ l de la sol. "A", 300 μ l de sol. "B" y 300 μ l de cloroformo, se mezcló en un agitador vortex. Posteriormente se centrifugó a 7500 rpm durante 15 minutos. Finalmente se tomó el sobrenadante (parte superior, sin traerse la fase inferior) y se pasó a otro tubo. Se almacenó a 4°C. hasta su uso.

4.3.1.2. Preparación del Gel de Poliacrilamida al 10%.

Los geles de poliacrilamida se prepararon poco antes de ser utilizados. Se lavaron los dos vidrios con etanol y secaron, se colocaron los separadores de teflón y el peine entre los vidrios; para sellar las orillas de los vidrios se utilizó agarosa y se colocó 1 pinza por cada lado de los vidrios.

En un vaso precipitado de 50 ml se colocaron 1.32 ml de Bis-Acrilamida, 2 ml de sol. de Tris pH 8.8, 4.56 ml de agua destilada esteril, 480 μ l de Persulfato de Amonio al 2 %. y 10 μ l de TEMED.

Se mezcló suavemente y posteriormente se procedió a llenar el espacio que hay entre los vidrios esperando a que se gelificara. Una vez que se polimerizó la solución, se retiró el peine de entre los vidrios, con un papel absorbente se secaron los pozos hasta que quedaron

perfectamente secos. De esta manera quedó listo el gel para poder colocar la muestra dentro de los pozos.

4.3.1.3. Electroforesis

Antes de realizar la electroforesis se fundió la sol. "C" en baño de agua hirviendo o en un horno de microondas. En un tubo limpio, se colocaron 80 μ l del sobrenadante obtenido en la extracción de RNA y una gota de la sol. "C".

Se colocaron las muestras en los pozos del gel (sin derramar muestra en los pozos adyacentes). Una vez solidificadas las muestras, se depositó el gel en la cámara de electroforesis, de tal manera que los pozos quedaran hacia el polo negativo la cámara. (Marcando la ubicación del primer carril). Posteriormente se colocaron 250 ml de sol. "D" a la cámara; el gel quedó totalmente cubierto con la sol. "D", finalmente se conectaron los electrodos a la fuente de poder, se corrió a 40 V hasta que entró la muestra y continuó la electroforesis a 60 V por 2 horas aprox. hasta que todo el colorante (Sol. "C") salió del gel.

4.3.1.4. Tinción de geles de poliacrilamida

Después de realizarse la electroforesis, se retiró el gel de los vidrios, se hizo un corte pequeño en la parte inferior del primer carril y se colocó el gel en la sol. "E" durante 30 minutos, posteriormente se retiró la sol. "E" y se adicionó la sol. "F" durante 30 minutos. Se retiró la solución anterior y se hicieron dos lavados rápidamente con agua

destilada estéril. Finalmente se adicionó la sol. "G" y se agitó levemente hasta que se observaron las bandas en el carril de la muestra control positivo (primer pozo). Se retiró la solución anterior y se paró la reacción con una sol. de ácido Acético Glacial al 1 %.

4.3.2. PAGE (corrimiento vertical para determinar electroferotipos)

Esta técnica presenta el mismo fundamento que la Rotaforesis. Las condiciones en la metodología fueron las mismas, solo que en esta técnica se utilizó una cámara de electroforesis vertical (BIORAD).

4.3.3. ELISA

Se utilizó un ensayo inmunoenzimático de tipo sandwich (IDEA™ Rotavirus DAKO) para la detección de Rotavirus del grupo A en materia fecal de humanos.

El kit de diagnóstico IDEA™ Rotavirus utiliza anticuerpos policlonales en una fase sólida para detectar el antígeno específico de grupo presente en los Rotavirus del grupo A. Los pozos de las microplacas están impregnados del anticuerpo policlonal específico para rotavirus, la suspensión de materia fecal o la muestra control se agregan a la microplaca y se incuban simultáneamente con el anticuerpo policlonal específico a rotavirus conjugado con peroxidasa. El antígeno de rotavirus presente en la muestra es atrapado entre los anticuerpos de la fase sólida y los conjugados con la enzima. Después

de un tiempo de incubación a T° ambiente, se lavan las microplacas. Se agrega un cromógeno el cuál reacciona con el conjugado y se desarrolla una coloración que nos indica la presencia del rotavirus.

4.3.3.1. Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra se agregó 1 ml del diluyente y se preparó una suspensión al 10 % de la materia fecal, se mezcló y se dejó reposar 10 minutos antes de la prueba.

4.3.3.2. Procedimiento

Se agregaron 2 gotas del control o de la muestra en los pozos de las microplacas y se adicionaron 2 gotas del conjugado, posteriormente se incubaron 1 hr a T° ambiente y luego se lavó 5 veces con agua destilada estéril, después se agregó 1 gota de sustrato parte A y 1 gota de sustrato parte B y se incubó 10 minutos a T° ambiente. Para detener la reacción se adicionó 1 gota de H₂SO₄. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA.

4.3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Esta metodología se realizó en el Instituto Nacional de Nutrición. La cuál consiste en la amplificación de secuencias específicas de Grupo A y serotipo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en presencia de Transcriptasa Reversa (RT-PCR).

4.3.4.1. Extracción de RNA viral a partir de materia fecal

Para la extracción de RNA viral para PCR se colocaron 300 µl de materia fecal en un tubo Eppendorf, se adicionaron 200 µl de solución de lisis (sol.A). Se centrifugó, se pasó el sobrenadante a otro tubo, se adicionó isotiocianato de guanidina, fenol y cloroformo, posteriormente se precipitó con alcohol isopropílico a -20°C, se decantó y almacenó a -20°C hasta su uso.

4.3.4.2. Primera Amplificación RNA-cDNA (Determinación de Grupo A)

Para la primera amplificación se preparó una mezcla de reacción con buffer 10 X, dNTPs, RNA sin, agua, transcriptasa reversa y Taq polimerasa; conservando en hielo hasta su uso. Se colocaron en un tubo los oligonucleótidos Beg-9 y End-9 junto con 3 µl de DMSO y 5 µl de RNA extraído y se incubó la muestra a 95 °C/5 minutos. Posteriormente se enfrió en etanol al 70% a -20°C/5 minutos rápidamente, luego se adicionaron al tubo 42 µl de la mezcla de reacción, dos gotas aceite mineral y se colocaron los tubos en el termociclador con el siguiente programa :

20 min a 50°C

35 ciclos de: 1 min a 94° C 2 min a 42° C 1 min a 72° C;

7 min a 72°C y se pasó a 4°C.

4.3.4.3. Segunda Amplificación cDNA-DNA (Determinación de Serotipo)

En la segunda amplificación se preparó una mezcla de reacción con buffer 10 X, dNTPs, agua y Taq polimerasa; conservando en hielo hasta su uso. Se colocaron los oligonucleótidos: aBT1, aCT2, aET3, aDT4, aAT8 y aFT9 junto con RVG9 y 5 µl de producto de la primera amplificación (cDNA). Posteriormente se adicionaron al tubo 48 µl de la mezcla de reacción, 2 gotas de aceite mineral y se colocaron los tubos en el termociclador con el siguiente programa:

35 ciclos de: 1 min a 94° C 2 min a 42° C 1 min a 72° C:
7 min a 72°C y se pasó a 4°C

4.3.4.4. Observación de los Productos Amplificados en geles de Agarosa al 2%

Para verificar la presencia de los productos amplificados se preparó un gel de agarosa al 2 % que contenía 0.5 µg por ml de Bromuro de etidio. Se colocaron 10 µl del producto amplificado al gel y se corrió una electroforesis a 120 V durante 1 hr. Finalmente se observó el gel en un transiluminador y se tomó fotografía del mismo para la observación de los diferentes productos amplificados correspondientes a cada uno de los oligonucleótidos serotipo específico, tabla 4.1 y figura 4.1

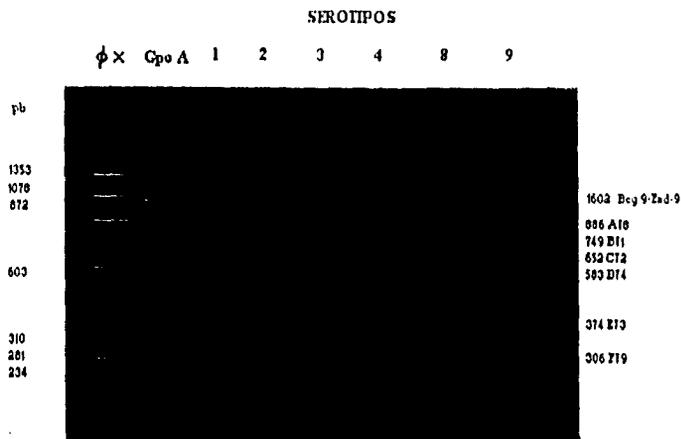


Figura 4.1 Productos de PCR amplificados (Guovea, 1990)

SEROTIPO	PARES DE BASES
1	749
2	652
3	374
4	583
8	885
9	306

Tabla 4.1 Tipificación de Rotavirus Humano del Grupo A por PCR (Gouvea, 1990)

5.-RESULTADOS

De un total de 346 muestras clínicas obtenidas del Hospital Infantil "Eva Sámano de López Mateos" procesadas a lo largo de un año Enero 1994-Enero1995, fué posible determinar la presencia de Rotavirus por la técnica de Rotaforesis, la cuál detecta RNA viral en materia fecal (figura 5.1). 148 (42.7%) fueron positivas a Rotavirus por esta técnica y 198 (57.2%) negativas. Tabla 5. 1 y gráfica 5.1

El análisis de electroferotipos mediante la técnica de PAGE, demostró que de las 148 muestras positivas a Rotavirus, se encontraron 129 (87.1%) electroferotipos "largos" (figura 5.2) y solamente 19 (12.8%) fueron elctroferotipos "cortos" (figura 5.3). Tabla 5.2 y gráfica 5.2. Por otra parte fué posible determinar en este estudio la presencia de electroferotipos "super cortos" y "super largos". (figura 5.3) Así mismo observamos una gran diversidad de electroferotipos durante el período de estudio mostrando diferencia en la migración de los segmentos de RNA viral en los bloques 1-4.

La determinación de Grupo A de RVH se realizó mediante la técnica de ELISA (AcMo-VP6),(figura 5.4). De las 148 positivas a Rotavirus, se escogieron 54 muestras aleatoriamente, 51 (94.4%) fueron positivas a Grupo A y 3 (5.6%) no pudieron ser determinadas. Tabla 5.3 y gráfica 5.3

La Tipificación de Grupo A y Serotipos se realizó por la técnica de PCR a las 148 muestras positivas a Rotavirus (figura 5), donde 68 (45.9%) fueron serotipo 1, 29 (19.6%) serotipo 2, 26 (17.6%) serotipo 3 y 19 (12.8%) serotipo 4; 6 (4.0%) muestras no pudieron ser tipificadas. Tabla 5.4 y gráfica 5.4

Para determinar el período estacional se realizó el análisis de los casos positivos a Rotavirus durante todo el año, observándose una mayor incidencia en los meses invernales (Noviembre-Febrero) y disminuyendo en la época de verano. Tabla 5.5 y gráfica 5.5

El grupo de edad más afectado en la infección por Rotavirus fué de 7-12 meses de edad (62.8%) seguido del grupo de 1-6 (22.2%) y finalmente el de 13-18 (12.1%). Tabla 5.6 y gráfica 5.6

Los resultados obtenidos en este estudio pertenecen al programa de Encuestas Centinela de Diarreas de la Secretaría de Salubridad, realizado en el Laboratorio de Rotavirus del INDRE. De estas encuestas fué posible destacar las manifestaciones clínicas más frecuentes en la infección por este agente viral.

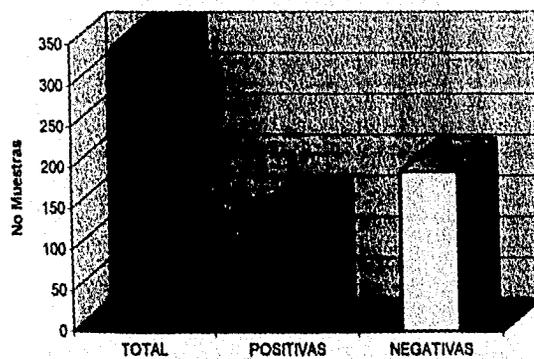
La manifestación clínica que presentó una mayor asociación a esta infección fué la diarrea líquida (64%), con moco (32%) y sangre (2%). Grafica 5.7

Por otra parte la presencia de vómito (80%) se registró como la segunda manifestación clínica más frecuente, seguida de la temperatura mayor a 38.8° C (70%). Gráfica 5.8 y 5.9

Cabe mencionar que en este estudio fué posible registrar el número de evacuaciones por día, siendo más frecuente entre 5 y 20. Es de interés señalar, que en algunos casos positivos a Rotavirus fué posible determinar la asociación con otros agentes enteropatógenos: *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*.

LUGAR	TOTAL DE MUESTRAS	POSITIVAS	NEGATIVAS
HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA	346	148	195
%	100 %	43.14 %	56.8 %

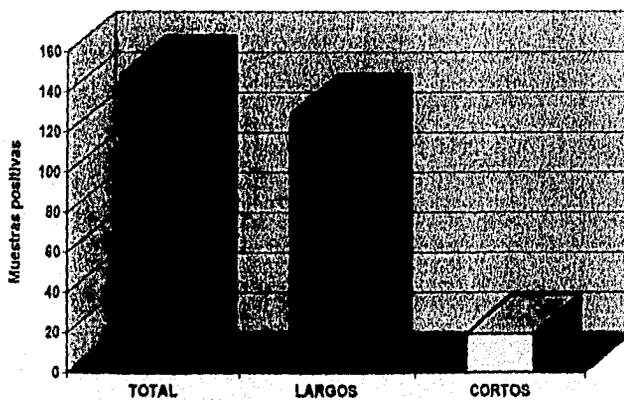
Tabla 5.1. Muestras clínicas analizadas para el diagnóstico de Rotavirus por Rotaforesis (Enero 1994 - Enero 1995)



Gráfica 5.1. Determinación de la infección por Rotavirus por Rotaforesis (Enero 1994 - Enero 1995)

TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS	PATRON LARGO	PATRON CORTO
148	129	19
100 %	87.1 %	12.8 %

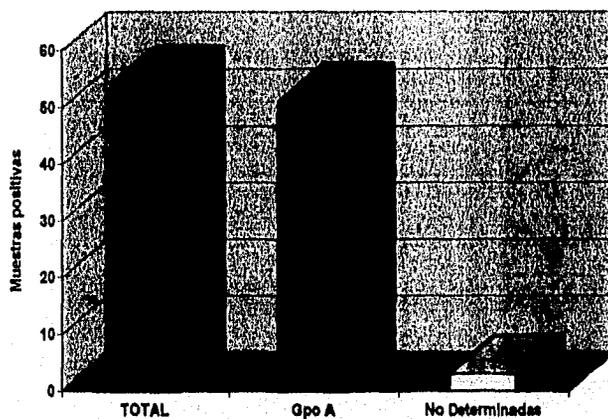
Tabla 5.2. Análisis de patrón electroforético "largo" y patrón electroforético "corto" por PAGE al 10 % a partir de las positivas a Rotavirus



Gráfica 5.2. Análisis de electroferotipos durante el período estudiado (Enero 1994 - Enero 1995)

MUESTRAS ANALIZADAS TOTALES	POSITIVO GRUPO A	NO DETERMINADAS
54	51	3
100 %	94.4 %	5.6 %

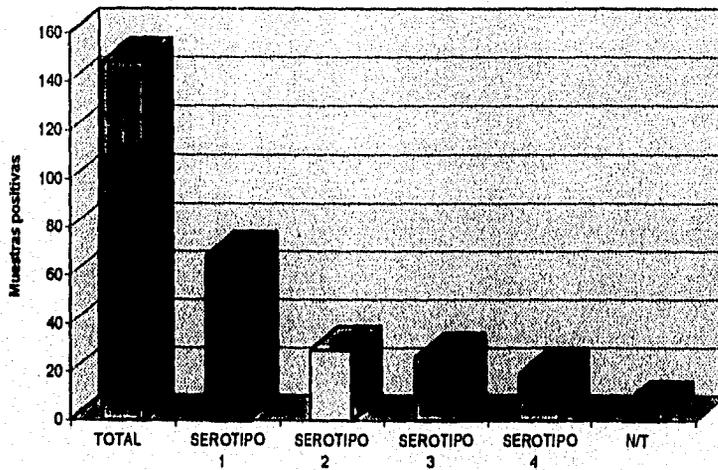
Tabla 5.3. Determinación de RVH del Grupo A por ELISA (AcMo - VP6)



Gráfica 5.3. Análisis de muestras positivas a Rotavirus para Grupo A por ELISA (AcMo - VP6)

Serotipo	1	2	3	4	no tipificadas	Total
Total de muestras	68	29	26	19	6	148
%	45.9	19.5	17.6	12.8	4.0	100

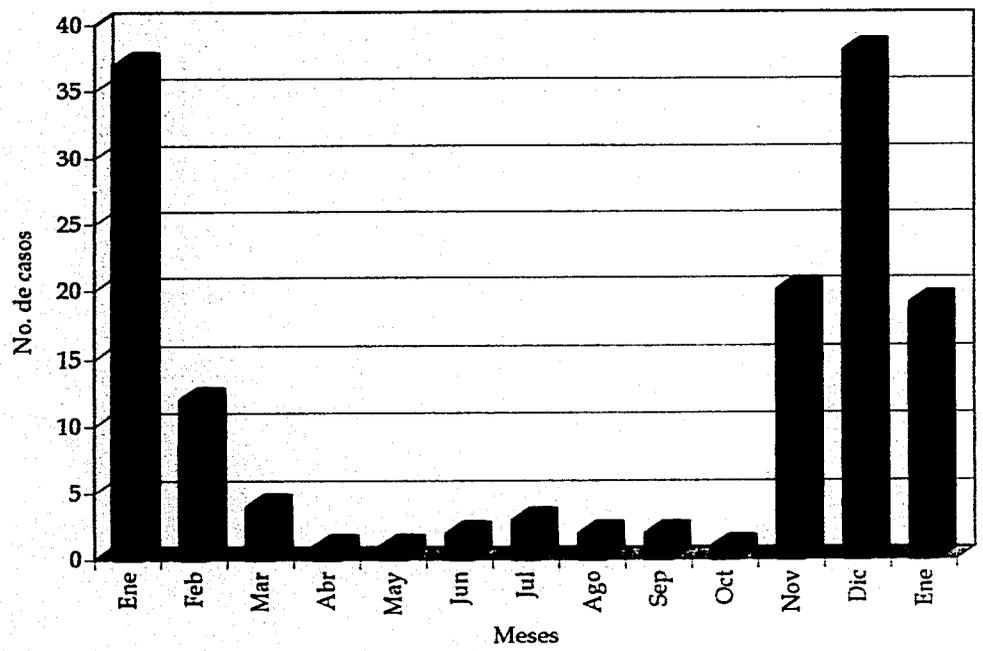
Tabla 5.4. Tipificación de Rotavirus por PCR de los casos positivos a Rotavirus



Gráfica 5.4. Análisis de los diferentes serotipos por PCR comprendidos en el período de estudio

MES	AÑO	CASOS POSITIVOS
ENERO	1994	37
FEBRERO	1994	12
MARZO	1994	4
ABRIL	1994	1
MAYO	1994	1
JUNIO	1994	2
JULIO	1994	3
AGOSTO	1994	2
SEPTIEMBRE	1994	2
OCTUBRE	1994	1
NOVIEMBRE	1994	20
DICIEMBRE	1994	38
ENERO	1995	19

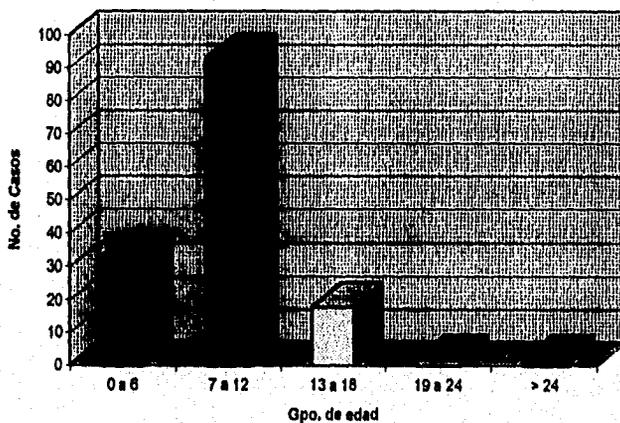
Tabla 5.5. Frecuencia mensual de la infección por Rotavirus de Enero de 1994 a Enero de 1995



Gráfica 5.5. Estacionalidad de la infección por Rotavirus de Enero de 1994 a Enero de 1995

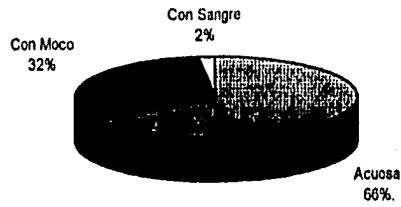
Grupo de edad (Meses)	Casos positivos	%
0-6	33	22.2
7-12	93	62.8
13-18	18	12.1
19-24	2	1.3
>24	2	1.3
Total	148	100

Tabla 5.6. Análisis de los diferentes grupos de edad de los casos positivos a Rotavirus.

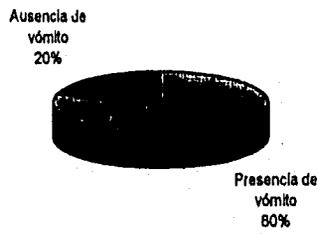


Gráfica 5.6. Grupos de edad más afectados en la infección por Rotavirus

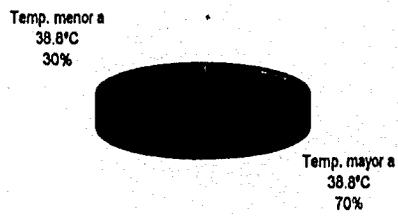
Gráfica 5.7 Diarrea aguda



Gráfica 5.8 Vómito



Gráfica 5.9 Temperatura



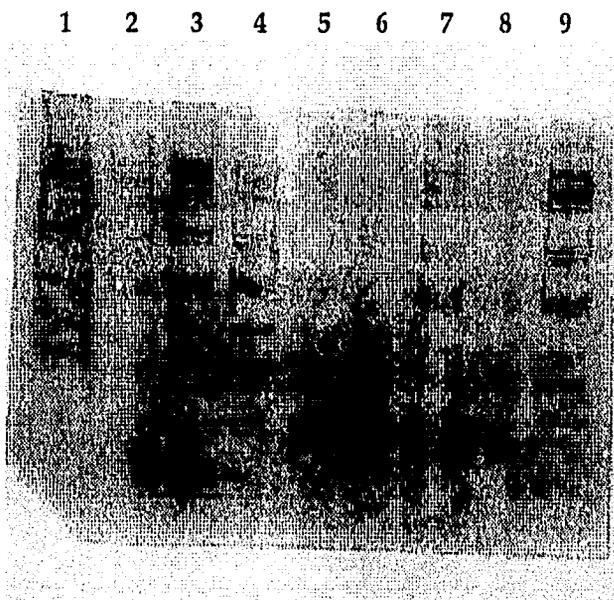


Figura 5.1. Gel de poliacrilamida al 10 % teñido con AgNO_3 . Carril 1-4, 7-9 muestras positivas a Rotavirus. Carril 5 y 6 muestras negativas a Rotavirus .

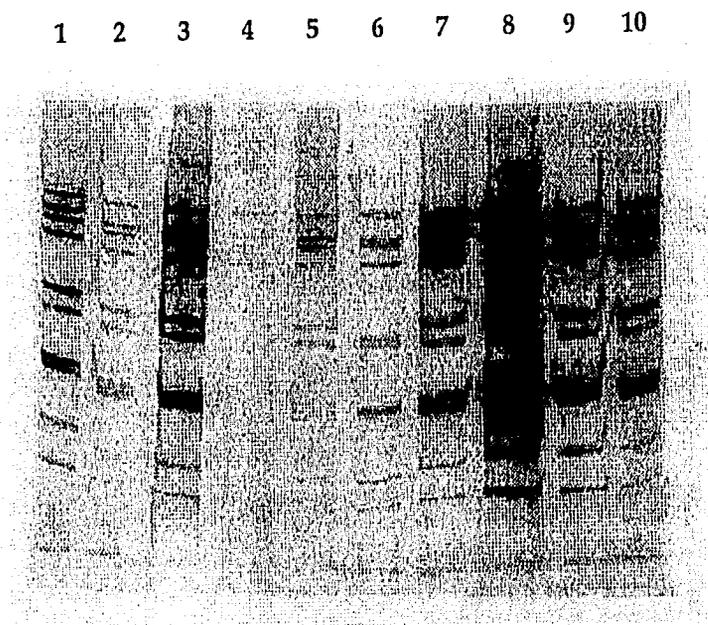


Figura 5.2. Gel de poliacrilamida al 10 % teñido con AgNO_3 . Determinación de patrones electroforéticos. Carriles 1-10 patrones electroforéticos "largos"

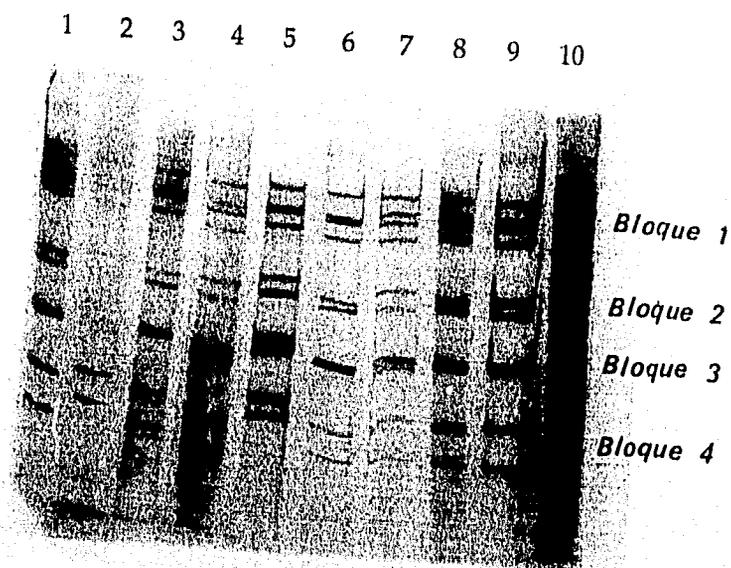


Figura 5.3. Gel de poliacrilamida al 10 % teñido con AgNO_3 . Diversidad de Electroferotipos. Existe gran diversidad en la migración de los segmentos de RNA en los cuatro bloques, principalmente en el bloque 3. Carriles 1,3 y 6-10 patrones "largos"; carril 2 patrón "corto"; carril 4 patrón "super largo"; carril 5 patrón "super corto"

	1	2	3	4	5	6	7
A	2.136	OVER	2.224	2.008	0.824	1.258	2.008
B	2.179	OVER	OVER	0.849	1.532	0.452	2.245
C	2.303	OVER	OVER	2.320	OVER	1.611	2.195
D	1.105	OVER	2.417	1.597	2.024	2.067	1.876
E	1.479	OVER	OVER	1.292	OVER	OVER	1.579
F	2.403	1.737	2.403	1.538	0.928	OVER	1.727
G	1.451	2.028	OVER	0.347	0.578	1.690	1.285
H	1.696	2.092	1.730	1.860	OVER	1.944	1.779

Lectura de corte:

$$\frac{\text{abs muestra} - \text{abs control negativo}}{\text{abs control negativo}}$$



igual o menor a 1
negativo a Rotavirus

Figura 5.4. Determinación de Grupo A de Rotavirus por ELISA. Pozo A6 control positivo; pozo B6 control negativo; pozos A5, B4 y G4 muestras negativas; todos los pozos restantes muestras positivas.

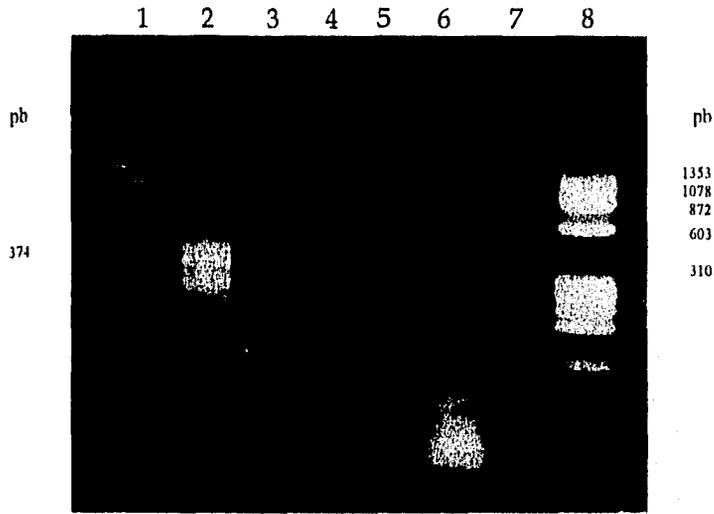


Figura 5.5. Gel de agarosa teñido con Bromuro de etidio. Tipificación de Rotavirus por la técnica de PCR. Carril 8 marcador de peso molecular (ϕ x174-HaeIII); carril 1 serotipo 3

6.- DISCUSION

Los resultados obtenidos para el diagnóstico de Rotavirus mediante la técnica de Rotaforésis, muestran el papel importante que juegan estos agentes virales productores de gastroenteritis aguda en nuestro país principalmente en época invernal. La incidencia con la que se presenta esta infección en otros países es del 30 y 60 %. En este estudio reportamos un 43.14% de la infección por este agente.

El análisis de los electroferotipos muestra claramente que el patrón electroforético que predominó en este estudio fué el "largo", 129 muestras (87%) del que podemos inferir la presencia de serotipos 1, 3, 4 y 8 que pertenecen al subgrupo II; solamente 29 muestras (13%) fueron patrones "cortos", donde podemos inferir serotipos 2 y 8 del subgrupo I. Es de importancia señalar que durante este estudio fué posible observar electroferotipos de patrón "super largo" (figura 5.3, carril 4) y patrón "super corto" (figura 5.3, carril 5). Estos electroferotipos pueden considerarse debido a la presencia de rearrreglos genéticos entre serotipos diferentes, ó bien entre cepas de origen animal y de origen humano, dando lugar posiblemente a nuevos serotipos. Estos electroferotipos han sido también reportados anteriormente.

Asimismo, se pudo observar la gran diversidad de electroferotipos que consiste en la migración de los segmentos de RNA en cada uno de los carriles, principalmente en el bloque 3, seguido del

bloque 1 (figura 5.3). De acuerdo a lo anterior, no es posible determinar los serotipos a partir de los electroferotipos ya que puede haber diferencias de electroferotipos entre un mismo serotipo. Por otra parte, esta diversidad, es de importancia epidemiológica para conocer los tipos de patrones electroforéticos que circulan en una región geográfica determinada, condiciones climatológicas así como rearrreglos genéticos en estos virus.

Los Rotavirus del Grupo A se consideran los de mayor importancia, debido a que infectan principalmente a humanos por lo que se les nombre Rotavirus Humanos (RVH). En el presente trabajo se realizó la determinación de los RVH mediante la utilización de la técnica de ELISA, donde se emplearon anticuerpos específicos dirigidos a la proteína interna VP6. De un total de 54 muestras analizadas, 51 (94.4%) resultaron positivas a Rotavirus que presenta el determinante antigénico de VP6 característico de Grupo A. Solamente 3 (5.6%) muestras no pudieron ser determinadas, lo que pudo deberse a que posiblemente las partículas virales perdieron sus cápsides protéicas (VP7, VP4 y VP6) en la mala conservación de las muestras, por lo tanto no hubo reacción antígeno-anticuerpo y posterior desarrollo de color que nos indicará la presencia de RVH. No hay que descartar la posibilidad de que estas tres muestras que no fueron determinadas por ELISA, pudieran pertenecer a otro Grupo diferente al A, como son el B o C.

El análisis de la tipificación por PCR a serotipo de cepas virales positivas a Rotavirus, mostró que el serotipo 1 fue el más frecuente (45.9%) mismo que se ha reportado en la literatura a nivel mundial. A este serotipo le siguieron en frecuencia los serotipos 2 (19.5%), 3 (17.6%) y 4 (12.8%) respectivamente. No es posible hacer una comparación de estos serotipos con otros estudios previos en esta localidad, ya que a la fecha no se había determinado la presencia de estos agentes virales en el Estado de Michoacán, sin embargo nuestros resultados muestran la circulación al mismo tiempo de los cuatro serotipos principales. Cabe mencionar que seis muestras no pudieron ser tipificadas, ésto pudo deberse a la presencia de otro serotipo del cual no se contó con el oligonucleótido específico para realizar la técnica de PCR. La circulación de estos cuatro serotipos puede favorecer de manera importante la prevalencia de la infección por Rotavirus asegurando la permanencia de este agente en la entidad.

Diversos estudios epidemiológicos, muestran que el período estacional en el cuál se observa una mayor incidencia de infección por Rotavirus es durante los meses fríos cuando se habla de una región con clima templado como el de la ciudad de Morelia, donde se encontró este mismo período estacional durante los meses de noviembre, diciembre, enero y febrero, observándose durante estos meses el pico de mayor incidencia en la infección por Rotavirus. Nuestros resultados concuerdan con la estacionalidad de estos agentes a nivel mundial, no obstante, se ha reportado que en regiones tropicales permanece constante durante todo el año. Cabe mencionar que durante el verano

la incidencia por infección bacteriana es mayor aún cuando la infección por Rotavirus no desaparece completamente.

Las características clínicas del paciente, muestran que el grupo de edad más afectado es de 7-12 meses coincidiendo así con lo que marca la literatura. Se determinó presencia de vómito (80%) y de temperatura mayor a 38.8°C (70%) indicándonos la severidad de la diarrea aguda, además de conocer un promedio de evacuaciones por día de 5 a 10, que nos muestra la deshidratación severa en la que se encuentran los niños al enfrentarse a la infección por Rotavirus.

Generalmente los niños que presentan gastroenteritis aguda por este agente son mayores a los 6 meses y menores a los tres años, esto es debido a que en las primeras semanas de vida el neonato es alimentado por leche materna adquiriendo protección a diferentes agentes enteropatógenos.

En la mayoría de las veces las heces fueron acuosas (65%), algunas veces con presencia de moco (32%) sin descartar la posibilidad de poder encontrar sangre en heces (2%).

El estudio microbiológico mostró algunos agentes bacterianos asociados con la presencia de Rotavirus aumentando así la severidad de la gastroenteritis. Sin embargo es poco común dicha asociación en la infección por este agente, pero cuando se presenta aumenta la severidad del cuadro agudo.



7.- CONCLUSIONES

La técnica de Rotaforesis es una metodología accesible, de bajo costo, con una buena especificidad y sensibilidad que nos permitió determinar la presencia de Rotavirus a partir de heces, así como el análisis de los electroferotipos, que proporciona datos importantes para estudios epidemiológicos. Consideramos que esta técnica es una herramienta útil para el diagnóstico de laboratorio y de gran importancia en el manejo de infantes con gastroenteritis aguda.

Por otra parte cabe señalar, que aún cuando existen en el mercado reactivos comerciales para la detección de RVH por ELISA, son de alto costo, limitando la aplicación de ellos en la rutina del diagnóstico, no así en proyectos de investigación.

Hoy en día, la técnica de PCR se ha convertido en una metodología de gran importancia en la tipificación de cepas virales, permitiendo cada vez más la utilización de ésta que la batería de anticuerpos monoclonales existentes, ya que con la técnica de PCR se trabaja a nivel de genoma viral mientras que la ELISA requiere la presencia de partículas virales completas a las que van dirigidas los anticuerpos requeridos.

El objetivo general de este trabajo fué determinar un panorama de la infección por Rotavirus del Grupo A en un Hospital Pediátrico de Morelia, Mich. correlacionando la clínica, serotipos y electroferotipos

de esta región geográfica, debido a que existe poca información epidemiológica sobre la gastroenteritis aguda por este agente en nuestro país. Consideramos que al finalizar este estudio podemos conocer dicho panorama sobre la infección por Rotavirus en la ciudad de Morelia, Mich. y aportar información relevante en los esfuerzos para la elaboración de una vacuna efectiva en el futuro.

Este panorama puede quedar, para la ciudad de Morelia, de la siguiente manera:

La infección por Rotavirus del Grupo A fue de un 43.14%, predominando la presencia de los patrones electroforéticos "largos" y del serotipo 1; el período estacional en el que presenta mayor incidencia de infección por este agente es en la época invernal; la diarrea provocada por Rotavirus es abrupta, presentándose vómito y fiebre leve a más de 38.8° C.

Por último, consideramos que en pacientes con gastroenteritis aguda es de gran importancia la búsqueda de Rotavirus, los cuáles son los principales agentes virales productores de diarrea aguda.

8.- BIBLIOGRAFIA

1.- ADAMS W.R., KRAFT L.M. 1963. Epizotic diarrhea of infant mice: identification of the ethiological agent. Science 141 : 359-360

2.- ALVAREZ MUÑOZ M.T., GUISCAFRE-GALLARDO J.P., MONDRAGON SANCHEZ C., MORALES CASTILLO M.E., RUIZ GOMEZ J., MARTINEZ PALOMO A. 1982. Comparación de las técnicas de electroforesis del RNA viral, ELISA y Fijación de Complemento con la Microscopía Electrónica para demostrar Rotavirus. Arch. Invest. Méd. (Méx) 13:145

3.- BINGNAN F., UNICOMB L.E., GUNANGLI T., ALI A., MALKER A., RAHIM Z., TZIPORI S. 1991. Cultivation of Novel Human Group A Rotaviruses with Long RNA Electropherotypes, subgruop II Specificities, and Serotype, and Serotype 2 VP7 Genes . J. Clin. Micro. 29: 2224-2227

4.- BISHOP R.F., DAVIDSON G.P., HOLMES I.H., RUCK B.J. 1973. Virus particle in epithelial cells of duodnal mucosa from children with viral gastroenteritis . Lancet ii : 1281-1283

5.- BASS D.M., MACKOW E.R., GREENBERG H.B. 1990. NS35 and not VP7 in the soluble rotavirus protein which binds to target cell. J. of Virology. 64 : 322-330

6.- CIMONS M. 1995. Hepatitis A Vaccine Licensed, Progress for Rotavirus, Parvovirus . ASM News . 61: 324-326

7.- COOK S.M., GIASS R.I., LeBARON C.W., HO M.S. 1990. Global Seasonality of Rotavirus Infections . WHO bulletin OMS 68:171-177

8.- COULSON BARBARA . 1993. Typing of Human Rotavirus VP4 by an enzyme Immunoassay Using Monoclonal Antibodies . J. of Clin. Microbiol. 31: 1-8

9.- CLARK H.F., BORIAN F.E., PLOTKIN S.A. 1991. Immune protection of infants against rotavirus gastroenteritis by serotype 1 reassortant of bovine rotavirus WC3 . J. Inf. Dis. 161: 1099-1104

10.- CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. 1987. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction . Analytical Biochemistry .162 : 156-159

11.- DAKO . 1992. An enzyme immunoassay for the detection of Rotavirus in human stools specimens. IDEIA TM Rotavirus

12.- DO CORMO M., TIMENETSKY S.T., SANTOS N., GOUVEA V. 1994. Survey of Rotavirus G and P Types Associated with Human Gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil , from 1986 to 1992 . J. Clin. Microbiol. 32 : 3622-3642

13.- ESPEJO R.,ROMERO P., CALDERON E., GONZALEZ N.
1978. Diagnóstico de Rotavirus por electroforesis del RNA viral. Bol.
Med. Hosp. Infant. Mex. 35: 323-331

14.- ESTES M.K., COHEN J. 1989. Rotavirus gene structure and
function. Microbiol. Review . 53 : 410-449

15.- FLORES J., SEARS J.A.,PEREZ SCHAEEL Y., WHITE L.,
GARCIA D., LANATA C., KAPKIAN A.Z. 1990. Identification of
Human Rotavirus Serotype by Hybridation to Polymerase Chain
Reaction-generated probes Derived from a Hyperdivergent Region of
the Gene Encoding Outer Capsid Protein VP7 . J, of Virol . 64: 4021-
4024

16.- GOUVEA V., GLASS R.I., WOODS P., TANIGUCHI K.,
CLARK H.F., FORRESTER B., FANG Z.Y. 1990. Polymerase Chain
Reaction Amplification of Rotavirus Nucleic Acid from Stool
Specimens. J. of Clin. Microbiol . 28 : 276-282

17.- GOUVEA V. 1993. Diagnostic Molecular Microbiology : PCR
Detection of Rotavirus . American Society of Microbiology p. 383-388

18.- GOUVEA V., BRANTLY M. 1995. Is Rotavirus a Population
of Reassortants?. Trends in Microbio. 3: 159-162

19.- GENTSCH J. R., GLASS R.I., WOODS P., GOUVEA V. GORZIGLIA M., FLORES J., DAS B.K., BHAN M.K. 1992. Identification of Group A Rotavirus Gene 4 Types by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 1365-1373

20.- GERORGES-COURBOT M.C., BERAUD A.M., BEARDS G.M., CAMPBELL A.D., GONZALEZ J.P., GEORGES A.J., FLEWETT T.H. 1988. Subgroups, serotypes and electroferotypes of Rotavirus isolated from Children in Bagui , Central African Republic . *J. of Clin. Microbiol.* 26: 668-671

21.- HERRING A.J., INGLIS N.F., OJEH C.K., SNODGRASS D.R., MENZIES J.D. 1982. Rapid Diagnosis of Rotavirus Infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels . *J. of Clin. Microbiol.* 16: 473-477

22.- HO M.S., GLASS R.I. PINSKY P.F., ANDERSON L.J. 1988. Rotavirus as a cause of a diarrheal morbidity and mortality in the United States. *J Infection Dis.*, 158 : 1112-1116

23.- HUA J., CHEN X., PATTON J.T. 1994. Deletion Mapping of the Rotavirus Metalloprotein NS53 (NSP1): the Conserved Cysteine-Rich Region Is Essential for Virus-Specific RNA Binding. *J. of Virol.* 68: 3990-4000

24.- HUSSEIN H.A. , PARWANI A.V., ROSEN B.I., LUCCELLI A., SAIF L.J. 1993. Detection of Rotavirus Serotypes G1,G2,G3 y G11 in Feces of Diarrheic Claves by Using polymerase Chain Reaction-Derived cDNA Probes . J. of Clin. Microbiol. 31 : 2491-2496

25.- KAPIKIAN A.Z., WYATT R.G., DOLIN R., THORNHILL T.S., KALICA A.R. CHANOCK R.M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis . J. Virology 10 : 1075-1081

26.- KAPIKIAN A. Z, CHANOCK R.M. 1988. Viral Gastroenteritis. In : Viral infections of Humans , Epidemiology and Control, 3rd ed. New York . p 282 -326

27.- KAPIKIAN A. Z., CHANOCK R. M. 1990. Rotaviruses : In B. N. Fields (edited) ,Virology, Raven Press, New York. p. 1353-1404

28.- KNUDSON D. L., MONATH T.P. 1990. Orviruses : In B. N. Fields (edited) ,Virology, Raven Press, New York. p. 1405-1431

29.- JAMES B. PETER. 1991. The Polimerase Chain Reaction : Amplifying Our Options . RID, (January-February) p 166-171

30.- LABBE M. , CHAPRILLENNE A., CRAWFORD S.E., ETSES M.K., COHEN J. 1991. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particules . J. of Virology , 65 : 2946-2952

31.- LE BARON W.C., LEW J., GLASS R.I., WEBER J.M., RUIZ-PALACIOS G.M. 1990. Annual Rotavirus Epidemic Patterns in North America . JAMA , August 22/29. 264 : 983-988

32.- LOPEZ S., PADILLA-NORIEGA L. ARIAS C. 1993. Correlación entre serotipo y electroferotipo de Rotavirus aislados en dos poblaciones de México . Bol. Med. Hosp. Inf. Mex. 50:735-740

33.- MASS D.R. , ATKINSON P.H. 1990. Rotavirus Proteín VP7, NS28 and VP4 from Oligomeric structures. J. of Virology . 64 : 2632-2641

34.- MALHERBE H.H., STRICKLAND-CHOLMELY M. 1967. Simian virus SA11 and the realted O agent. Arch Gesamete Virusforsh 22: 235-245

35.- MATTION N.M., COHEN J., APONTE C., ETSSES M.K. 1992. Characterization of a oligomerization dominan and RNA-Binding properties and rotavirus no esructural protein NS34. Virology . 190 : 68-83

36.- MIDTHUN K., HASLEY N.A., JEFT M., CLEMENTS M.L., STEINHOFF M. KING J.C., KARRON R., WILSON M., BURNS B., PERKIS V., SAMORODIN R., KAPIKIAN A.Z. 1991. Safety and Immunogenecity of Human rotavirus vaccine strain M37 in adults, children and infants . J. Inf. Dis. 164 : 792-796

37.- NAKAGOMI O., OYAMADA H., NAKAGOMI T. 1991.
Experience with serotyping rotavirus by reverse transcription and two-step polymerase chain reaction with generic and type-specific primers. *Molecular and Cellular Probes* 5: 285-289

38.- NOEL J.S., BEARDS G.M., CUBITT W.D. 1991.
Epidemiological Survey of Human Rotavirus Serotypes and Electropherotypes in Young Children Admitted to two Children's Hospitals in Northeast London from 1984 to 1990. *J. Clin. Microbiol.* vol. 29 no. 10 p. 2213-2219

39.- OLIVERA D.H. et al. 1995. Diagnóstico por Biología Molecular en : *Manual de técnicas de Laboratorio . INDRE. Vol. 3: BiMo49-BiMo57*

40.- PADILLA-NORIEGA L., WERNER R., MACKOW E.R., GORZIGLIA M., LARRALDE G. TANIGUCHI K., GREENBERG H.B. 1993. Serologic Analysis of Human Rotavirus Serotypes P1A and P2 by Using Monoclonal Antibodies . *J. Clin. Microbiol.* 31 : 622-628

41.- PADILLA-NORIEGA L., ARIAS C.F. LOPEZ S., PUERTO F., SNODGRASS D.R., TANIGUCHI K., GREENBERG H.B. 1990. Diversity of Rotavirus Serotypes in Mexican Infants with Gastroenteritis . *J. Clin. Microbiol.* *J. Clin. Microbiol.* 28 : 1114-1119

42.- PEREIRA H.G., LINHARES A.C., CANDEIAS J.A.N., GLASS R.I. 1994. Vigilancia de los virus de la gastroenteritis en los laboratorios nacionales del Brasil . Bol of Sanit. Panam. 116(1) :27-36

43.- PUERTO-SOLIS M., PUERTO F., POLANCO G.G., GONZALEZ M.R. 1993 . Aspectos generales de Rotavirus . 1993 . Rev. Biomed, 4 : 129-140

44.- QUEZADA PASCUAL FAUSTO. 1984. Electroforesis en geles de Poliacrilamida . Departamento de Inmunología. ENCB . IPN. p. 1-18

45.- RUIZ JIMENEZ Y., GUTIERREZ M. 1995 .Rotavirus. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Colima

46.- SANTOSHAM M., LETSON W., WOLF M., REID R., GAHAGANS., ADAMS R., CALLAHAN C., BRADLEY R., KAPIKIAN A.Z. 1991. A field study of the efficacy of two candidates rotavirus vaccines in a native American population . J. Inf. Dis. 163 : 483-487

47.- SHAW A.L., ROTHNAGEL R., CHEN D., RAMIG R.F., PRASAD V. 1993. Three-Dimensional Visualization of the Rotavirus Hemagglutinin Structure . Cell . 74 : 693-701

48.- SOLER CARMEN. 1990. Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales : Capítulo II . INDRE

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

49.- TABASSUM S., SHEARS P., HART C.A. 1994. Genomic Characterization of Rotavirus Strains Obtained From Hospitalized Children With Diarrhoea In Bangladesh. *J. Med. Virology*. 43: 50-56

50.- TANIGUCHI K. et al. 1992. Identification of Human and Bovine rotavirus serotypes by polymerase chain reaction. *Epidemiolog. Infect.* 109: 303-312

51.- USHIJIMA H., MUKOYAMA A., HASEGAWA A., NISHIMURA S., KONISHI K., BOSU K. 1994. Serotyping of Human Rotaviruses in Tokio Area (1990-1993) by Enzyme Immunoassay With Monoclonal Antibodies and by Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction Amplification. *J. Med. Virology*. 44: 162-165

52.- VELAZQUEZ F.R., CALVA J.J., GUERRERO L., MASS D., GLASS R.I., PICKERING L.K., RUIZ-PALACIOS G.M. 1993. Chort Study of rotavirus serotype patterns in symptomatic and asymptomatic infections in Mexican Children. *Pedriatic Inf. Dis. J.* 12: 54-61

53.- WARD R., CLEMENS J.D., SACK D.A., KNOWLTO D.R., MCNEAL M.M., HUDA N., AHMED F., RAO M., SCHIFF G.M. 1991. Culture Adaptation and Characterization of Group A Rotaviruses Causin Diarrheal Illness in Bangladesh from 1985 to 1986. 29 : 1915-1923

54.- WARD R. , KNOWILTON D., GREENBERG H.B., SCHIFF G.M., BERNSTEIN D.I. 1990. Serum neutralizing antibody to VP4 and

VP7 protein in infants following vaccination with WC3 bovine rotavirus. *J. of Virology*. 64 : 2687-2691

55.- WHITE L., GARCIA D., BOHER Y., BLANCO M., PEREZ M., ROMER H., FLORES J., PEREZ-SCHAEEL Y. 1991. Temporal Distribution of Rotavirus Serotypes 1,2,3, and 4 in Venezuelan Children With Gastroenteritis During 1979-1989. *J. Med. Virology* . 34 : 79-84

56.- WODDS P.A., GENSTC J., GOUVEA V., MATA L., SIMHON A. SANTOSHAM M., BAI Z.S., URASAWA S., GLASS R.I. 1992. Distribution of Serotypes of Human Rotavirus in Different Populations. *J. Clin. Microb.* 30: 781-781

57.- YOSUHIYUKI S., SANEKATA T., SATO M., TAJIMA K., MATSUDA Y. NAKAGOMI O. 1993. Relative Frequences of G (VP7) and P (VP4) Serotypes Determined by Polymerase Chain Reaction Assays among Japanese Bovine Isolated in Cell Culture. *J. Clin. Microbiol.* 31 : 3046-3049

58.- ZHOU Y.J., BURNS J.W., MORITA Y., TANAKA T., ESTES M.R. 1994. Localization of Rotavirus VP4 Neutralization Epitopes Involved in Antibody-Induced Conformational Changes of Virus Structure . *J. Virology* . 68 : 3955-3964