



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

48
2ej:

**ESTANDARIZACION DE LA TECNICA
DE REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR) PARA LA
TIPIFICACION DE ROTAVIRUS**

T E S I S

Que para obtener el Título de :

**QUIMICO FARMACEUTICO
BIOLOGO**

P R E S E N T A :

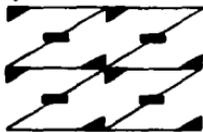
ARACELI RODRIGUEZ CASTILLO

**DIRECTOR DE TESIS:
QBP HERLINDA GARCIA LOZANO**

ASESOR: DR. HIRAM OLIVERA DIAZ

MEXICO, D.F.

1997



**LO MIMAND
ESE
DE NUESTRA REFLEXION**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"**

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

RODRIGUEZ CASTILLO ARACELI

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA TIPIFICACION DE ROTAVIRUS.

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.F.I. LEONOR AGUILAR SANTELISES	
VOCAL	Q.B.P. HERLINDA GARCIA LOZANO	
SECRETARIO	DR. HIRAM OLIVERA DIAZ	
SUPLENTE	Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCIA	
SUPLENTE	Q.F.B. ENRIQUE BOUCHOT GAMAS	

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F. a. 29 de MAYO de 1997.

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
JEFE DE LA CARRERA

*El que no sabe y cree que sabe, es un necio:
Húyele.*

*El que no sabe y sabe que no sabe, es humilde:
Enséñale.*

*El que sabe y no sabe que sabe, esta dormido:
Despiértale.*

*Y el que sabe y sabe que sabe, es un sabio:
Síguelo.*

DEDICATORIAS

A Dios:

Por encausarme por la senda de la superación y por estar siempre a mi lado.

A mi Familia:

A Rosa Castillo B. Mamá, con profundo amor te dedico este trabajo por tu comprensión apoyo y cariño que me has brindado en todo momento. Además de ser un ejemplo para mí, son un testimonio más de tu amor.

A Jesús Rodríguez G. Papá, con respeto y cariño para ti, por el gran apoyo y confianza que me has dado a tu manera . Por creer siempre en mí, mil gracias.

A mi esposo David Flores. Por el profundo amor que nos hemos tenido siempre y por haber encontrado apoyo, comprensión y ternura durante todo este tiempo que se ha iluminado con la brillante luz de tu forma de ser, tan tuya, tan para mí.

A mis hermanos Rocío, Claudio y Joel. Por su cariño incondicional y por los momentos que hemos compartido siempre juntos.

A mis amigos:

A Herlinda García Lozano. Con afecto por su constante guía y apoyo para la realización de este trabajo y por darme la oportunidad de seguir adelante.

A Ernesto Ramírez G. Con afectuosa estima por el inmenso apoyo, confianza y valiosa amistad que siempre me has demostrado. Te estoy profundamente agradecida por el tiempo que me has dedicado en la elaboración de este trabajo.

Sin su apoyo no lo hubiera logrado.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" y a todos mis maestros a quienes debo mi formación profesional

Al Laboratorio de Rotavirus del INDRE: Ernesto, Andrés, Martín, Elvira, Benita, Juanito, y Herlinda, por su apreciable ayuda en la elaboración de este trabajo.

Al Laboratorio de Biología Molecular del INDRE, a cargo del Dr. Hiram Olivera Díaz, por las facilidades otorgadas para el desarrollo de este proyecto.

Al Departamento de Informática del INDRE, a cargo del QBP Fernando González D., por el apoyo para la impresión de esta tesis.

A mis compañeros y amigos, aquellos que han estado a mi lado compartiendo momentos inolvidables, ustedes saben quienes son.

A todos, mil gracias.

**Araceli Rodríguez Castillo.
Septiembre de 1997**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN
EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA
TIPIFICACIÓN DE ROTAVIRUS**

RESUMEN

La dificultad que presentan los rotavirus humanos para su aislamiento y propagación en cultivo celular a partir de muestras clínicas, y la escasa disponibilidad de anticuerpos monoclonales, ha permitido el desarrollo de técnicas moleculares alternativas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la tipificación de estos agentes virales.

En este trabajo se optimizaron las condiciones de reacción de amplificación para la determinación de grupo y serotipo a partir de materia fecal. La extracción de material genético consistió en la extracción con fenol-cloroformo-ISTG y posterior purificación con fibra de celulosa (CF-11), permitiendo aumentar la sensibilidad en la RT-PCR.

En la primera reacción (RT-PCR) se amplificó el gen 9 (o gen 8) que codifica para la glicoproteína VP7 utilizando oligonucleótidos específicos para grupo, obteniendo un producto de amplificación de 1062 pb característico de los rotavirus del grupo A. En la segunda amplificación se emplearon los productos de cDNA de la primera amplificación y oligonucleótidos específicos de serotipo específico (1-4).

Esta metodología se aplicó para la tipificación de 100 muestras procedentes de un brote por rotavirus en el estado de Tamaulipas, donde se determinó los serotipos G1(45%), G2(35%) y G3(15%).

Cabe señalar que para la estandarización de la RT-PCR fue determinante la elección de la técnica de extracción y purificación con CF-11 a partir de materia fecal para la eliminación de inhibidores de la retrotranscripción, además de la concentración de RNA molde, magnesio y DMSO.

En nuestra experiencia, la RT-PCR nos permitió determinar de manera rápida y específica la circulación de los serotipos responsables del brote por rotavirus en Tamaulipas. Por lo tanto, sugerimos la aplicación de técnicas moleculares como la RT-PCR para la tipificación de cepas de rotavirus en niños con gastroenteritis aguda.

ÍNDICE

GLOSARIO	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Panorama general de la gastroenteritis	3
1.2. Generalidades de los rotavirus	5
1.2.1. Morfología y estructura del virión	5
1.2.2. Estructura genómica	6
1.2.3. Propiedades físicas y químicas	7
1.2.4. Estructura y función de las proteínas	7
Proteínas de nucleocápside y cápside interna	
Proteínas de cápside externa	
Proteínas no estructurales	
1.2.5. Clasificación de los rotavirus	10
Grupos	
Subgrupos	
Serotipos	
Electroferotipos	
1.2.6. Rearreglos genéticos	14
1.3. Reacción en cadena de la polimerasa	15
1.3.1. Definición	16
1.3.2. Fundamento de la técnica	16
1.3.3. Transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	18
1.3.4. Componentes de la reacción de PCR	20
RNA molde	
Oligonucleótidos	
Taq-polimerasa	
Transcriptasa reversa	
Desoxinucleótidos	
Iones Mg ²⁺	
Solución reguladora	
Cosolventes	
Aceite mineral	

1.3.5. Condiciones de reacción	27
Temperatura de desnaturalización del DNA	
Temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos	
Temperatura de extensión de los oligonucleótidos	
1.3.6. Métodos de extracción y purificación del RNA viral	29
1.3.6.1 Métodos de extracción	30
Isotiocianato de guanidina	
Proteínasa K - fenol - cloroformo	
1.3.6.2. Métodos de purificación de RNA viral	31
Hidroxiapatita	
Fibra de celulosa (CF-11)	
1.3.7. Perspectivas y limitaciones de la técnica de RT-PCR	31
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	33
3. OBJETIVOS.	34
4. HIPÓTESIS.	35
5. MATERIAL Y METODOS.	36
5.1. Material	36
5.1.1. Material biológico	36
5.1.2. Material de laboratorio	36
5.1.3. Equipo	36
5.1.4. Reactivos	37
5.1.5. Oligonucleótidos	38
5.2. Métodos	38
5.2.1 Rotaforesis	38
5.2.2 Preparación de geles de poliacrilamida al 10 %	40
5.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (RT - PCR)	40

5.2.3.1 Extracción de RNA viral a partir de materia fecal	40
Extracción fenol - cloroformo - ISTG	
Purificación de RNA con CF - 11	
5.2.3.2 Cuantificación de RNA viral	41
5.2.3.3 Primera amplificación: RNA a cDNA	42
Determinación de grupo A	
5.2.3.4 Segunda amplificación de cDNA	42
Determinación de serotipo de rotavirus del grupo A	
5.2.3.5 Determinación de grupo C	43
5.2.3.6 Observación de los productos amplificados en geles de agarosa	43
5.2.3.7 Análisis de productos amplificados	44
6. RESULTADOS	45
7. DISCUSIÓN	59
8. CONCLUSIONES.	63
9. BIBLIOGRAFÍA	65

GLOSARIO

Abs	Absorbancia
AgNO ₃	Nitrato de plata
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CF-11	Fibra de celulosa
dATP	2'-desoxi-adenosin-5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxi-citosin-5'-trifosfato
DEPC	Dietyl pirocarbonato
dGTP	2'-desoxi-guanosin-5'-trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfatos
dsRNA	Acido Ribonucléico de doble cadena
dTTP	Timidin-5'-trifosfato
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático
G+C	Enlace guanidina-citocina
HDCG	Hidrocloruro de guanidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
hrs	Horas
IME	Inmunomicroscopía electrónica
ISTG	Isotiocianato de guanidina
KCl	Cloruro de potasio
kD	Kilodaltones
M	Molar
mM	Milimolar
ME	Microscopía electrónica
min	Minutos
Mg ⁺²	Ión magnesio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitros
Na Cl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos
nmol	Nanomoles
NS	No estructural
OMS	Organización Mundial de la Salud

PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	Picogramos
pmol	Picomoles
RNA	Acido Ribonucléico
RNAsin	Inhibidor de RNAsas
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa Reversa
RT-PCR	Transcriptasa Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-AMV	Virus de la mieloblastosis aviar
RT-HIV-1	Transcriptasa reversa del virus de la inmunodeficiencia humana
RT-Mo-MLV	Virus de la leucemia murina Moloney
RVHA	Rotavirus Humanos del grupo A
RVHB	Rotavirus Humanos del grupo B
RVHC	Rotavirus Humanos del grupo C
SDS	Dodesil sulfato de sodio
sol.	Solución
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetrametilenendiamina
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VP	Proteína viral
µg	microgramos
µl	microlitros
°C	Grados cetígrados

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PANORAMA GENERAL DE LA GASTROENTERITIS

Las enfermedades infecciosas continúan siendo la principal causa de muerte a nivel mundial. Entre ellas, las de tracto intestinal son un grave problema, en el grupo de niños menores de cinco años de edad. ¹

Actualmente la gastroenteritis representa un serio problema de Salud Pública en México así como en países de América Latina y el Caribe, y su transmisión se encuentra estrechamente relacionada con el nivel de saneamiento y desarrollo socioeconómico. En 1988, de acuerdo con estudios realizados por la OMS, en los países en vías de desarrollo se registraron un total de 1,300 millones de episodios diarreicos en niños menores de cinco años de edad y como consecuencia de ello murieron cuatro millones.

Las muertes por diarrea representan una gran variedad en cuanto a su distribución geográfica en México, debido a las diferentes condiciones sanitarias y sociales de cada lugar. Es indudable que la lucha contra las infecciones diarreicas y su prevención son fundamentales para mejorar la salud en la población infantil. Sin duda, el avance médico más importante en la reducción de la mortalidad por diarreas ha sido el desarrollo de la terapia de rehidratación oral. Tratar eficazmente la diarrea y disminuir la tasa de letalidad en los menores de cinco años es una prioridad a corto plazo en los países en desarrollo, mientras que a largo plazo es mucho más importante prevenir la enfermedad. ¹

En México, las enfermedades diarreicas representan la primera causa de morbilidad, principalmente en el grupo menor de cinco años; de éstos, los menores de un año, son los que tienen mayor riesgo de que la enfermedad evolucione hacia la muerte. De acuerdo a los resultados obtenidos de la Encuesta Nacional de Salud y las tres encuestas sobre diarreas realizadas entre 1985-1991 a nivel nacional: Encuesta de Morbilidad, Mortalidad y Tratamiento de Diarreas (EMMT, Encuesta sobre Prácticas y Prevalencia de la Terapia de Rehidratación Oral (EPPTRO) y Encuesta sobre el Manejo Efectivo de Casos de Diarrea (EMECADI), se estima que ocurren de 30 a 42 millones de episodios diarreicos al año en menores de 5 años y entre 60 a 70 millones de episodios diarreicos en mayores de este grupo de edad. El análisis de nueve indicadores de las diarreas y atención médica muestran que el promedio de eventos diarreicos por año es de tres a cuatro por persona. ¹

En 1988 la EPPTRO, reportó que a nivel nacional, 9.5% de las diarreas estudiadas presentaron sangre en heces, 9.2% diarrea persistente y 81.3% correspondieron a diarrea aguda líquida.

En 1993, las enfermedades gastrointestinales se registraron en el décimo lugar como causa de muerte en México con un total de 13,207 defunciones (tasa de 14.9 por 100,000 habitantes), de éstas 6,748 correspondieron a menores de cinco años de edad. En el caso de niños menores de un año de edad ocuparon el cuarto lugar. Las defunciones ocasionadas anualmente por enfermedades intestinales, principalmente en el grupo de menores de cinco años de edad, estuvieron en un 70% directamente relacionadas con la deshidratación, del total de muertes por diarrea, el 63% ocurrieron en este grupo de edad. Anualmente en el país muere 1 de cada 1,000 menores de cinco años, y una de cada seis defunciones en este grupo de edad es debida a diarrea aguda.⁷

Los rotavirus son responsables del 35 al 60% de los episodios de diarrea severa en infantes y niños menores de tres años de edad en todo el mundo, siendo el agente más importante de la gastroenteritis aguda en este grupo de edad. Este virus infecta más del 90% de los niños alrededor de los tres años tanto en países desarrollados como en desarrollo sin importar el nivel de saneamiento y desarrollo económico. Sin embargo, el resultado y consecuencias de la infección por este agente en ciudades desarrolladas es muy diferente a lo que acontece en las ciudades en desarrollo. En Estados Unidos se estima que más de un millón de infantes y niños pequeños menores de 5 años han padecido un episodio de diarrea aguda causada por rotavirus, provocando más de 20,000 hospitalizaciones y 150 defunciones al año. Empero, en países en desarrollo se estima que además de presentar una alta morbilidad -18 millones de casos de diarrea - presentan una importante mortalidad -870,000 defunciones por año - en ese mismo grupo de edad.²⁻⁶

A pesar de que la diarrea aguda provocada por este agente puede tratarse eficazmente con rehidratación oral, su prevención casi siempre resulta difícil y las vacunas constituyen la vía de protección promisoría. Por lo tanto, prevenir la gastroenteritis aguda por rotavirus mediante el desarrollo de una vacuna efectiva, se ha convertido en una de las metas y actividades de control de la enfermedad, llegando a ser un tema de prioridad mundial. Actualmente se investigan diversas vacunas candidatas contra rotavirus. La amplia variabilidad de los resultados obtenidos en torno a su eficacia, podría deberse a las diferentes condiciones epidemiológicas que prevalecen en distintas regiones geográficas¹⁻³.

La meta de la vacuna no es la prevención a la infección por rotavirus ni a la enfermedad relativamente severa, más que nada esta enfocada al control de la diarrea aguda, lo cual conduce a la deshidratación y muerte. La información epidemiológica es particularmente escasa en países en desarrollo, que es precisamente donde estas vacunas podrían aportar los mayores beneficios.

1.2. GENERALIDADES DE LOS ROTAVIRUS

1.2.1. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA DEL VIRION

El término "Rotavirus" proviene del latín **ROTA**, que significa rueda. Debido a la apariencia de rueda de carro de estas partículas virales en microscopía electrónica.⁸⁻⁹

Las partículas virales completas miden 70 nm de diámetro y tienen una cápside doble compuesta de polipéptidos de simetría icosaédrica. Estudios de microscopía electrónica de rotavirus, han descrito la presencia de tres tipos de partículas: A). partículas completas de doble cápside; B). partículas de una cápside, de 55 nm de diámetro aproximadamente, cuyo aspecto es rugoso, dichas partículas no son infecciosas y C). partículas compuestas únicamente por el core o nucleocápside miden aproximadamente 37 nm de diámetro.^{7,10} .Figura 1.1

Los rotavirus no tienen envoltura lipídica y sólo poseen actividad infectante. aquellas partículas de doble cápside y con RNA en su interior.

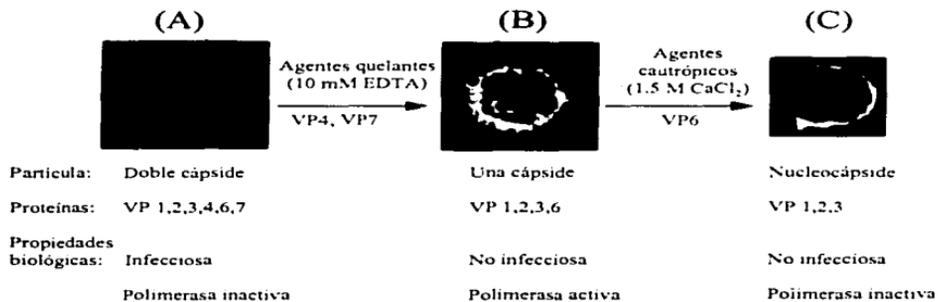


FIG. 1.1. PARTÍCULAS DE ROTAVIRUS OBSERVADAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA. (A) PARTÍCULAS COMPLETAS O DE DOBLE CÁPSIDE, (B) PARTÍCULAS QUE HAN PERDIDO LA CÁPSIDE MÁS EXTERNA Y SON PARTÍCULAS DE UNA CÁPSIDE Y (C) PARTÍCULAS QUE SÓLO PRESENTAN LA NUCLEOCÁPSIDE O CORE.

1.2.2. ESTRUCTURA GENÓMICA

En el interior de la partícula viral se encuentra el genoma, el cual está compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA). Este RNA no es infeccioso por sí mismo, dado que para transcribirse a RNAm y traducirse a las proteínas virales, necesita de una RNA polimerasa dependiente de RNA, que se encuentra en las partículas virales completas.

El genoma de rotavirus puede ser separado por corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida (PAGE), observándose los 11 segmentos de RNA de distinto peso molecular característico de rotavirus distribuidos en cuatro bloques 4-2-3-2. La secuenciación de cada gen ha permitido conocer el tamaño de los segmentos de RNA, mostrando entre 663 pb (segmento 11) y 3302 pb (segmento 1)¹¹⁻¹³

Cada uno de los segmentos de RNA codifica por lo menos para cada una de las proteínas virales de los rotavirus. Fig. 1.2

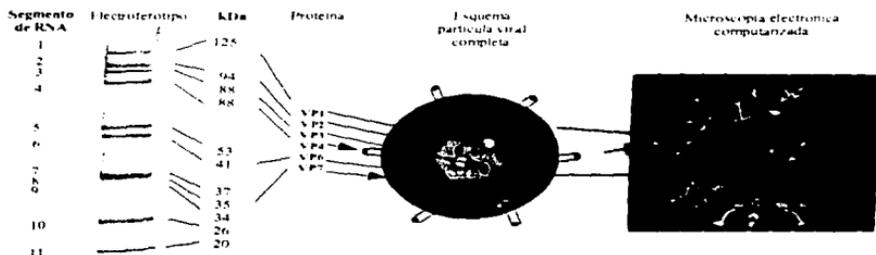


FIG. 1.2. ESTRUCTURA PROTEICA Y GENÓMICA DE ROTAVIRUS

El análisis de electroferotipos por PAGE es relativamente fácil y rápido. Es una metodología ampliamente usada en la detección a través de su genoma en estudios de epidemiología molecular y monitoreo de brotes y transmisión de rotavirus. Sin embargo, debido a que los rotavirus presentan diferentes rearrreglantes; esta metodología no puede emplearse como único criterio en la clasificación de estas cepas.⁸

1.2.3. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

La infectividad de rotavirus depende de la presencia de la cápside externa. El tratamiento con agentes quelantes de calcio (por ejemplo EDTA o EGTA) la destruyen resultando la pérdida de la infectividad. El calcio se ha detectado sólo en partículas de doble cápside, lo cual sugiere la posible unión de calcio a los sitios de unión de VP7. La cápside interna puede ser destruida con agentes cautrópicos tales como tiocianato de sodio o altas concentraciones de CaCl_2 . Las cápsides externa e interna pueden ser separadas por ultracentrifugación por gradientes de cloruro de cesio o sacarosa.⁸

Las partículas de rotavirus son generalmente resistentes a fluorocarbonos, mientras que con éter, cloroformo o desoxicolato permiten la extracción del genoma viral eliminando así las envolturas proteicas del virus. El tratamiento con cloroformo reduce poco la infectividad y destruye la actividad hemaglutinante.

La infectividad de rotavirus es estable en un intervalo de pH de 3 a 9; sin embargo, pH menor de 3 disminuye la infectividad, propiedad que es importante para el desarrollo de una vacuna oral efectiva. La infectividad y la actividad hemaglutinante se pierde por continuas congelaciones y descongelaciones. La infectividad puede ser inactivada por desinfectantes tales como fenoles, formalina, cloro y beta-propiolactonas. El etanol al 95% es quizá el desinfectante más efectivo, pues destruye la cápside externa. Cabe mencionar que los rotavirus son resistentes a las temperaturas altas, a los solventes de lípidos y detergentes no iónicos.¹⁰

En resumen, las cepas de rotavirus humanos pierden la cápside externa más fácil que las cepas de animales, dificultando su propagación en cultivo celular en comparación con las cepas de animales; además cuando esta presente la hemaglutinina en las cepas humanas es más difícil de ser detectada que en la de los animales.⁸

1.2.4. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE PROTEÍNAS

PROTEÍNAS DE NUCLEOCÁPSIDE

VP1. Es una proteína estructural codificada por el segmento 1 del genoma viral, forma parte de un 10 % de la estructura de la nucleocápside. Tiene un peso molecular de 125 kDa; algunos estudios han demostrado que forma parte de un complejo enzimático, presentando cierto grado de homología con las RNA polimerasas virales; lo que hace suponer que VP1 es una RNA polimerasa.¹⁰

VP2. Es una proteína estructural codificada por el segmento 2, es la más abundante de la nucleocápside (aproximadamente el 90%) y es la tercera más abundante de todas las proteínas estructurales de rotavirus. VP2 es altamente inmunogénica, los anticuerpos anti-VP2 en el suero son un buen indicador del inicio de la infección. Tiene un peso molecular de 102 kDa, y aunque todavía se desconocen algunas de sus propiedades tiene la función de reclutar el RNA de doble cadena para el ensamblaje viral, por lo que juega un papel importante en la morfogénesis viral.^{8,14}

VP3. Es una proteína estructural codificada por el segmento 3 y es la más escasa de la nucleocápside (5%); tiene un peso molecular de 83 kDa. La homología con otras RNA polimerasas de otros virus sugieren que ésta proteína este involucrada en la replicación del RNA viral.

PROTEÍNA DE CÁPSIDE INTERNA

VP6. Es una proteína codificada por el segmento 6, y es la más abundante de la partícula viral, ésta proteína tiene forma tridimensional, su peso molecular es de 45 kDa. Algunos agentes cautrópicos remueven la proteína VP6 dejando sólo la nucleocápside. Tiene un papel importante en la estructura de la partícula viral, ya que mantiene la propiedad de conformación y organización del centro. Posee una propiedad altamente inmunogénica y antigénica; es la proteína más frecuentemente utilizada para el diagnóstico de rotavirus por métodos inmunoenzimáticos que establecen la presencia de determinantes antigénicos correspondientes a cepas de rotavirus de Grupo A, B, C, D, E, F y G. VP6 juega un papel importante en la inducción de la inmunidad en el huésped. En esta proteína residen los antígenos de grupo y subgrupo de rotavirus.⁵

PROTEÍNAS DE CÁPSIDE EXTERNA

VP4. Es codificada por el segmento 4, tiene la característica de ser una proteína no glicosilada de cápside externa. VP4 es susceptible a cortes con enzimas proteolíticas como la tripsina, fraccionándose en VP5 60 kDa y VP8 28 kDa. El resultado de este corte es un aumento en la infectividad viral y la inducción en la producción de anticuerpos neutralizantes. El sitio de unión de VP4 a eritrocitos (hemaglutinación), permanece aún desconocido, sin embargo se sabe que involucra varias regiones de la proteína porque anticuerpos monoclonales contra VP5 y VP8 pueden inhibir la hemaglutinación. Esta proteína induce la segregación de anticuerpos independientemente de la VP7.^{10,15} VP4 es la proteína que se encuentra en menor cantidad en la cápside externa en comparación con VP7 y se caracteriza por formar espículas de proteína que pueden rotar hasta 180° interaccionando con VP6 de la cápside interna. De esta manera VP4 determina la virulencia y el crecimiento en cultivo celular, así como la unión de ésta proteína a los enterocitos y la

penetración durante la replicación; VP4 también juega un papel importante en la maduración de progenie de rotaviriones. ¹⁶⁻¹⁸

VP7. Esta proteína es la segunda más abundante de las proteínas estructurales de rotavirus y es codificada por el segmento 7, 8 o 9 dependiendo de la cepa. Esta proteína glicosilada de cápside externa es altamente inmunogénica e induce la formación de anticuerpos neutralizantes. Algunos estudios han demostrado que VP7 es la proteína de unión a la célula blanco. ⁸ A la fecha se han reportado más de 14 serotipos de rotavirus por ensayos inmunoenzimáticos, 9 de los cuales infectan a humanos (G1-G4, G6, G8-G10 y G12). ¹⁷ Tiene un peso molecular de 34 kDa y se ha demostrado la interacción biológica y antigénica entre VP4 y VP7. ^{17,19-20}

PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

El ciclo de replicación de los rotavirus se lleva a cabo en el citoplasma de la célula que infectan. El proceso que va de la síntesis de mRNAs virales a la formación de la nucleocápside, involucra la participación de proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP6) y cinco proteínas no estructurales (NS53, NS35, NS34, NS28 y NS26). Mientras que la función de las proteínas estructurales es relativamente claro, poco se conoce sobre el papel de las proteínas no estructurales.

Estudios recientes sugieren que estas proteínas podrían involucrarse en la replicación y encapsidación del genoma de rotavirus. La interacción entre proteínas estructurales y no estructurales es muy limitada y no se ha encontrado ninguna interacción entre las no estructurales. (González RA. Interacción in vivo y localización intracelular de las proteínas no estructurales NSP1 y NSP3, de los rotavirus. Presentado en: Primera Reunión Nacional de Virología, Enero 24; 1997, Oaxtepec).

NS53. Es una proteína codificada por el segmento 5 del genoma viral; se ha encontrado en células infectadas pero no en la partícula viral, es detectada en un tiempo muy corto después de la infección. Los niveles de NS53 sintetizada son bajos en comparación con las otras proteínas no estructurales. Esta proteína es la única del grupo A que varía en cuanto a tamaño dependiendo de la cepa, (cepa Wa contiene 486 aminoácidos y la SA-11 tiene 495 aminoácidos), es una proteína poco conservada y se ha reportado como la única que no es necesaria en la replicación del virus, tiene un peso de 58 kDa, sin embargo, la porción carboxilo es esencial in vivo, quizá porque sirve como determinante de la virulencia. ¹⁰⁻²¹

NS35. Proteína codificada por el segmento 7, 8 ó 9 del genoma, dependiendo de la cepa. Se caracteriza por ser básica y no glicosilada; se ha detectado en lisados celulares infectados y pruebas inmunocitológicas utilizando anticuerpos monoclonales específicos, se

ha localizado esta proteína en el viroplasma de células infectadas. También está involucrada en la unión del RNA y actividad replicasa; su peso es de 36 kDa. Un estudio demostró que ésta proteína (al igual que VP7) es la que se une a la célula; ahora existe la duda si es en realidad una proteína no estructural. ^{5 20}

NS34. Esta proteína es codificada por el segmento 7 del genoma de la cepa SA-11 y posee un peso de 36 kDa, se ha detectado en ácidos nucleicos previamente marcados (RNA o DNA) en Westernblots. Se encuentra en el lisado de células infectadas y tiene una actividad replicasa asociada con la NS53, in vitro. Algunos estudios tratan de precisar el papel que tiene ésta proteína en la replicación viral. ^{21 22}

NS28. Proteína glicosilada codificada por el segmento 10 del genoma de SA-11 con un peso de 20 kDa, sintetizada en la fase temprana de la replicación, se localiza en la membrana del retículo endoplásmico con un fragmento que sobresale al citoplasma, en la cual se fijan las partículas subvirales y posteriormente continua aquí la morfogénesis de las partículas virales. ^{5 19}

NS26. Al principio se catalogó como una proteína estructural de bajo peso, pero el título de anticuerpos que induce es tan bajo que hace suponer no sea estructural. Estudios realizados con ésta proteína sugieren que se encuentra en el citoplasma y además de involucrarse en la replicación del RNA, el gen 11 que codifica para la proteína con un peso de 22 kDa y sufre un alto contenido de rearrreglos genéticos. ¹⁰

1.2.5. CLASIFICACIÓN DE LOS ROTAVIRUS

La familia **Reoviridae** se caracteriza por tener genoma de RNA de doble cadena segmentado, pero las diferencias de estructura, antigenicidad, estabilidad y huéspedes son las bases para dividir los diferentes géneros de esta familia. El género más importante de la familia **Reoviridae** es rotavirus cuya agrupación heterogénea se clasifica en grupos, subgrupos y serotipos de acuerdo a sus determinantes antigénicas. ^{9 23}

GRUPOS: Existen actualmente siete grupos de rotavirus (A, B, C, D, E, F, y G) en base sus determinantes antigénicos en la proteína VP6. Los grupos A, B; y C se han reportado comúnmente en humanos y animales, mientras que los grupos D-F han sido encontrado únicamente en animales. ^{5,24-25} Los rotavirus son capaces de sufrir rearrreglos genéticos entre cepas del mismo grupo, pero estos rearrreglos no se han observado entre los diferentes grupos ⁸

Los Rotavirus del Grupo A (RVHA).- Constituyen el principal grupo de estudio productor de la gastroenteritis aguda en niños menores de 3 años. La severidad de la

gastroenteritis por RVHA es la causa de deshidratación y diarrea grave en lactantes y niños provocando un elevado índice de hospitalizaciones y muertes pediátricas; se estima 18 millones de casos que dejan 870,000 muertes anuales en todo el mundo de ahí la necesidad de incrementar los esfuerzos para el desarrollo de una vacuna. ^{5, 24, 25, 27, 31}

Diversos estudios demuestran un mayor incremento de gastroenteritis por RVHA en la época invernal (Oct-Mar) en México y en el Sureste de los Estados Unidos. Cada año, la infección por rotavirus se agudiza y aparece en el Este de Estados Unidos desplazándose poco a poco hacia el Oeste y la frontera de México, el pico máximo de las infecciones por rotavirus se mantiene durante todo el invierno. ³²

Las manifestaciones clínicas de la gastroenteritis provocada por RVHA no son suficientemente claras para diferenciarlas de las infecciones bacterianas, por lo tanto, se requieren métodos de diagnóstico específicos que permitan identificar a estos agentes virales como patógenos de la gastroenteritis aguda. ^{7-8, 23, 33}

El Grupo B de Rotavirus (RVHB).- Conocidos también como rotavirus de la diarrea en adultos, pararrotavirus, rotavirus del grupo no A o rotavirus atípicos. Los RVHB fueron reportados al principio como agentes etiológicos exclusivos de la gastroenteritis en bovinos. Posteriormente fueron reportados como agentes etiológicos de la diarrea en diferentes especies de animales. En 1982, se asoció por primera vez con la gastroenteritis en humanos en la República Popular de China, a partir de entonces se ha descrito como un patógeno importante en la gastroenteritis en adultos. ³⁴

Los RVHB son antigénica y genéticamente diferentes a los RVHA pues carecen del antígeno común de grupo A pero morfológicamente son idénticos. El perfil electroforético de los RVGB está constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA), a diferencia de los RVHA, estos no presentan el triplete del RNA de los segmentos 7, 8 y 9, el cual se observa en todos los RVHA, pero también pueden dificultar su interpretación comparándolo con otros grupos de rotavirus, por lo tanto se requiere de pruebas confirmatorias como técnicas de hibridación y PCR para su identificación. ³⁴

En el campo veterinario, las infecciones por RVHB, se han reportado en terneros, gatos, cerdos, ovejas, corderos y ratas. ³⁵

Epidemiológicamente produce grandes brotes en la República Popular de China considerándose un problema de salud pública y se ha reportado en recién nacidos y adultos de Baltimore. Los métodos de diagnóstico para estos agentes son: ELISA, IME, PAGE, técnicas de hibridación y RT-PCR.

Rotavirus del grupo C (RVHC).- También conocidos como pararrotavirus o rotavirus atípicos. En 1982 fue reportado como el agente etiológico de la gastroenteritis en cerdos, posteriormente se demostró la presencia de RVHC como patógenos de diarreas en humanos.³⁷ La incidencia de diarreas provocadas por éste grupo aún no es muy clara debido a la falta de sensibilidad en los métodos de diagnóstico, así como la escasa disponibilidad de pruebas de diagnóstico que permitan su detección. Al grupo de edad que afecta principalmente es de 4 a 20 años, en contraste con los RVHA que infectan a niños menores de 3 años.^{25,36} Algunos estudios revelan la presencia de anticuerpos contra el grupo C de 3 a 45% de la población humana en ciertas regiones geográficas. Además de la presencia de anticuerpos y de la incidencia de infecciones por RVHC se ha reportado que personas mayores de 4 años de edad pueden ser portadores asintomáticos.

Estos agentes son morfológicamente idénticos a los RVHA, pero antigénica y genéticamente diferentes a otros grupos. Presentan también 11 fragmentos de RNA y un perfil electroforético característico de migración (4,3,2,2) donde los segmentos 5, 6 y 7 forman un triplete en el segundo bloque, en comparación con RVHA que presenta sólo los segmentos 5 y 6 en el mismo bloque y un triplete característico en los segmentos 7,8, y 9 del tercer bloque.³⁸ Los métodos de diagnóstico para los RVHC son: ELISA, IME, PAGE, RT-PCR, aglutinación en látex, hibridación de ácidos nucleicos e inmunofluorescencia.³⁹

Los RVHC se han reportado en cerdos, vacas y gatos; y se han logrado cultivar en líneas celulares CaCO₂, células de riñón porcino PPK y MA-104. Su propagación ha sido posible en cerdos destetados.

Los casos de infección por RVHC se han reportado en diferentes partes del mundo como Japón, Australia, Canadá, Nueva Zelanda, México, Estados Unidos, Brasil, Reino Unido, Nepal y Tailandia.^{25, 36, 40}

SUBGRUPOS: Esta clasificación de rotavirus esta dada en base a la proteína VP6 para todos los RVHA. Esta proteína consiste en estructuras cuya superficie esta formada por trimeros altamente inmunogénicos. VP6 es la proteína más abundante, juega un papel importante, porque en esta residen los antígenos de subgrupo que permiten la clasificación de rotavirus mediante varios métodos serológicos. Los rotavirus del grupo A se pueden diferenciar con anticuerpos monoclonales en dos subgrupos llamados I y II.^{12,41-42} Cabe mencionar que el subgrupo I comprende los serotipos 2 y 8, mientras que los serotipos 1,3,4 y 9 pertenecen al subgrupo II.¹⁷ Estudios epidemiológicos han demostrado, que cepas del subgrupo I son más virulentas y se han detectado con mayor frecuencia que los del subgrupo I. En la detección de antígenos de grupo y subgrupo, se han empleado técnicas serológicas tales como fijación de complemento, ELISA, inmunofluorescencia, inmunomicroscopía electrónica y radioinmunoensayo.

SEROTIPOS: Otra clasificación para los RVHA esta dada en base dos tipos de determinantes antigénicos de las proteínas que forman parte de la cápsida externa la VP4 y la VP7; las dos proteínas segregan independientemente anticuerpos neutralizantes.^{43,44}

La neutralización específica de VP7 se refiere a los serotipos G (se les asignó la letra G por ser ésta una glicoproteína) y la de VP4 se refiere a los serotipos P (por ser una proteína sensible a proteasas). La determinación de serotipos G ha sido posible mediante la utilización de técnicas tales como ensayos inmunoenzimáticos con anticuerpos monoclonales,^{23,45} pruebas de hibridación con oligonucleótidos específicos de serotipo⁴⁶ y reacción en cadena de la polimerasa.²³

En base a VP7, se han identificado 14 serotipos.⁴⁷ De los cuales nueve infectan a humanos G1 a G4, G6, G8 a G10 y G12. Los serotipos G1 a G4 son epidemiológicamente los más importantes a nivel mundial. El serotipo G4 se ha aislado de cerdos y humanos y el serotipo G3 se presenta en varias especies de animales, además de humanos.^{7,27,44}

La distribución de los serotipos G8 y G9 aún se desconoce.²³ Recientemente el serotipo G1 asociado a infecciones de humanos, se reportó en cerdos y borregos. Se ha reportado que algunos rotavirus detectados en gatos son antigénicamente relacionados a serotipos G1, G2 y G3. Estudios de epidemiología molecular demuestran una gran diversidad genética de los rotavirus, incrementando la complejidad en el desarrollo de una vacuna efectiva contra rotavirus. Serotipos G5, G6, G7 y G10 también se han determinado en niños, aún cuando sólo se había reportado en gatos.¹⁶

La genotipificación de VP4 con anticuerpos monoclonales aún es más difícil, ya que presenta reacción cruzada con los antígenos de VP4, por lo que se han desarrollado técnicas de biología molecular, tales como PCR, que permiten tipificar y genotipificar un mayor número de muestras que con los métodos inmunoenzimáticos.

En base a VP4, existen al menos 11 genotipos P. Recientemente una cepa de rotavirus de serotipo G8 fue reportada como un nuevo tipo genómico P, pero no se ha confirmado serológicamente.^{13,48}

Genotipo VP4	Serotipo VP7	Cepa
1	1,3,4 y 9	Wa, W161, Ku, YO, VA70
2	2	DS1, S2
3	1, 2, 3 y 4	1076, M37, ST3
4	1 y 3?	KB, AU1
5	8	69M

Cuadro 1. Clasificación de serotipos P y G de rotavirus humanos

ELECTROFEROTIPOS: El RNA puede ser separado en 11 segmentos por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida, en base a sus diferentes pesos moleculares.⁵ Este perfil electroforético se presenta en cuatro grupos de segmentos: el primer grupo contienen los cuatro segmentos de RNA de mayor peso molecular, en el segundo grupo se encuentran dos segmentos de RNA de mediano peso molecular, en el tercer grupo se presentan tres segmentos muy juntos de menor peso y en el último grupo tienen dos segmentos de menor peso molecular.^{7, 42 49}

Se han definido dos tipos principales de electroferotipos: los "patrones cortos" relacionados al subgrupo I (serotipos 2 y 8) y los "patrones largos" relacionados al subgrupo II (serotipos 1, 3, 4 y 9). Sin embargo se han reportado cepas de rotavirus pertenecientes al subgrupo I y con electroferotipo largo⁴². Esta diferencia esta dada en el peso molecular de los segmentos 10 y 11 del RNA, cuando el peso molecular de estos segmentos es mayor el electroferotipo es corto, ya que migra menos que el largo. Actualmente se han reportado cepas de rotavirus que migran mucho menos que lo usual y se les denomina "patrones supercortos", así como también cepas de "patrones superlargos" porque migran más que los patrones largos.^{17, 26 50}

1.2.6. REARREGLOS GENÉTICOS DE ROTAVIRUS

La infección por rotavirus de uno o más serotipos (P y G) entre hospederos de una misma o diferente especie, puede provocar mutaciones puntuales o rearreglos genéticos resultando nuevos serotipos y posiblemente cepas más virulentas y resistentes que las cepas progenitoras, induciendo la adaptación a nuevos hospederos y ambientes cuando se transmiten a grandes poblaciones y por lo tanto, dificultando aún más la producción de una vacuna efectiva contra este agente viral. Estas evidencias en la heterogeneidad de las cepas de rotavirus se ha demostrado en la propagación en cultivo celular del prototipo SA-11. Otras evidencias son la aparición de nuevos serotipos aislados de niños con o sin diarrea.^{10 27}

Los rotavirus que sufren rearrreglos genéticos, normalmente presentan una disminución de concentración de RNA cuando se observa en geles de poliacrilamida y en ocasiones la migración de las bandas de dsRNA es más rápida. Los rearrreglos genómicos de RVHA han sido aislados frecuentemente de brotes de rotavirus en países endémicos como India, Brasil, Venezuela, México y otros países en desarrollo, así como pacientes inmunodeficientes, asintomáticos y animales (cabras, cerdos y conejos).⁸

El resultado en la heterogeneidad de rearrreglos genéticos son: (a) la existencia de una enorme diversidad de cepas de rotavirus, (b) la coexistencia de varias cepas diferentes circulantes en una comunidad en un determinado tiempo, (c) la aparición de nuevas cepas y la desaparición de otras en una comunidad, (d) cambio en la prevalencia de serotipos en cada periodo de tiempo, (e) la persistencia de cepas con características específicas en una población en particular y (f) en ocasiones la presencia de múltiples cepas en un mismo hospedero. Estas características determinan la epidemiología de RVHA.²⁷

Algunos estudios realizados en guarderías y hospitales de todo el mundo, han revelado la circulación frecuente de un serotipo P y la persistencia de este durante un largo tiempo causando infecciones asintomáticas en recién nacidos. Este polimorfismo genético se observa comúnmente en las ciudades grandes en comparación con las pequeñas donde se aíslan unos cuantos casos.⁵¹

La enorme diversidad y complejidad de las cepas de rotavirus es esencial para poder explicar los frecuentes fracasos en el desarrollo de una vacuna efectiva contra los rotavirus.^{13,27}

1.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es un método de amplificación de una secuencia específica de DNA. Esta técnica ideada y desarrollada por Mullis y colaboradores en Cetus Corporation, es un excelente método que otorga una alta sensibilidad y especificidad en la determinación y caracterización de ácidos nucleicos. La PCR es una metodología altamente desarrollada en el análisis de DNA y RNA (bacterias, hongos, parásitos y virus) porque ha simplificado el trabajo de metodologías ya existentes y ha permitido el rápido desarrollo de nuevas técnicas en el diagnóstico de enfermedades en el área de la salud.

Esta metodología se utiliza para la detección de enfermedades o infecciones producidas por bacterias, hongos, parásitos y agentes virales; los cuales han sido

difícilmente determinados por otros métodos de diagnóstico.^{52 53} La PCR es una de las metodologías más versátiles en el diagnóstico de infecciones provocadas por diversos agentes. Actualmente tiene gran aplicación en el diagnóstico de cáncer y enfermedades genéticas, así como en el área de criminalística y paternidad. Por otra parte, una de las mayores ventajas de dicha metodología, es que permite la detección de agentes patógenos que son difícil o imposible de cultivar como en el caso de rotavirus.⁵⁵

Las DNA polimerasas permiten la síntesis de una cadena complementaria de DNA en dirección 5' → 3' empleando una simple cadena molde pero empezando de una región de doble cadena; o sea por extensión de un iniciador. La PCR emplea el mismo fundamento pero emplea dos iniciadores, cada uno es complementario a una región específica de la cadena molde expuesta de DNA, la cual es previamente desnaturalizada por calentamiento.⁵²

Debido a que los rotavirus presentan grandes dificultades para ser cultivados "in vitro" a partir de muestras clínicas, las infecciones por rotavirus son generalmente identificadas por métodos inmunoenzimáticos que determinan de manera directa al antígeno rotaviral en muestras diarreicas. Sin embargo, aproximadamente del 20 al 30% de las cepas de rotavirus no son tipificadas, como consecuencias de que las partículas virales están incompletas o bien existan variaciones de epítopes. De ahí que se desarrollen métodos de biología molecular, como PCR que permiten tipificar un mayor número de cepas de rotavirus a partir de muestras clínicas, debido a que se utiliza el genoma viral y requiere cantidades muy pequeñas de RNA (hasta 100 pg) para su amplificación, además de ser una técnica altamente sensible, específica y rápida.

1.3.1 DEFINICIÓN

La PCR se define como un método de Biología Molecular que permite la amplificación "in vitro" de secuencias específicas de ácidos nucleicos que produce el proceso de replicación del DNA "in vivo". El resultado es la producción exponencial en el número de copias amplificadas (2^n), a partir de una cadena de DNA molde.⁵⁶

1.3.2 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La PCR emplea dos oligonucleótidos específicos que hibridan las cadenas de DNA expuestas y posteriormente son amplificadas por la enzima **Taq polimerasa**. La reacción de amplificación se lleva a cabo mediante ciclos sucesivos que comprenden tres temperaturas:

1). **Temperatura de desnaturalización.**- El DNA molde de doble cadena se separa en cadenas sencillas a 94°C.

2). **Temperatura de alineamiento.**- Los oligonucleótidos se alinean a la región específica de las cadenas de DNA, flanqueando el genoma molde.

3). **Temperatura de extensión.**- Los oligonucleótidos son extendidos a través de la enzima Taq polimerasa a 72°C.

El resultado de la reacción es la acumulación exponencial de productos amplificados de DNA específicos. Obteniéndose, aproximadamente en 30 ciclos hasta 1000 millones de copias de DNA amplificado. ^{12, 56} Figura 1.3

Posteriormente los productos amplificados se verifican en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y se comparan con un marcador de peso molecular.

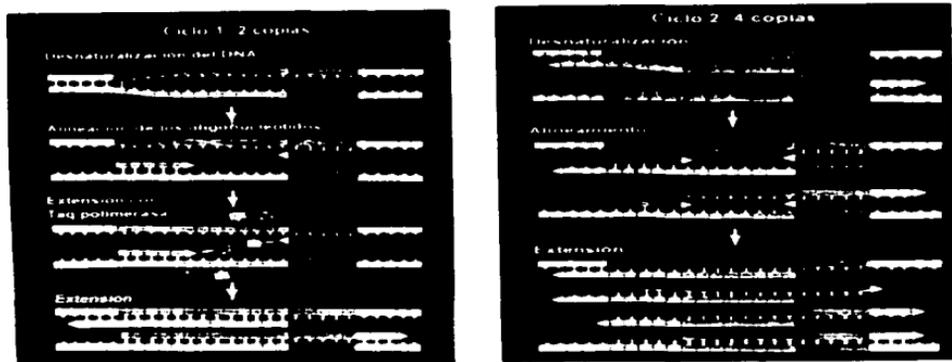


Figura 1.3 Esquema de la amplificación del DNA por PCR
(Perkin Elmer con permiso)

1.3.3. RT - PCR

La transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), se desarrolló debido a que el RNA no puede servir de molde para la PCR, por lo tanto se requiere retrotranscribir el RNA a cDNA mediante la enzima transcriptasa reversa.⁵⁶⁻⁵⁷ Fig. 1.4

La RT-PCR es un proceso altamente utilizado para detectar la expresión de genes y para el diagnóstico de agentes infecciosos o enfermedades genéticas. Sin embargo, el RNA es más inestable que el DNA, la presencia de ribonucleasas pueden degradar o fragmentar al RNA propiciando no se lleve acabo la retrotranscripción y por lo tanto, la amplificación de este ácido nucléico. Estas enzimas pueden encontrarse en el propio agente etiológico o estar presentes en piel y generalmente no requieren de cofactores para su función .

Para evitar la contaminación con RNAsas es necesario el empleo de guantes cuando se trabaja con ácidos nucléicos, material exclusivo y estéril para PCR, el uso de agua dietil pirocarbonato (DEPC), preferentemente mantener reactivos y RNAs siempre en hielo y trabajar rápidamente, para lograr buenos rendimientos de la reacción de PCR.⁵⁸

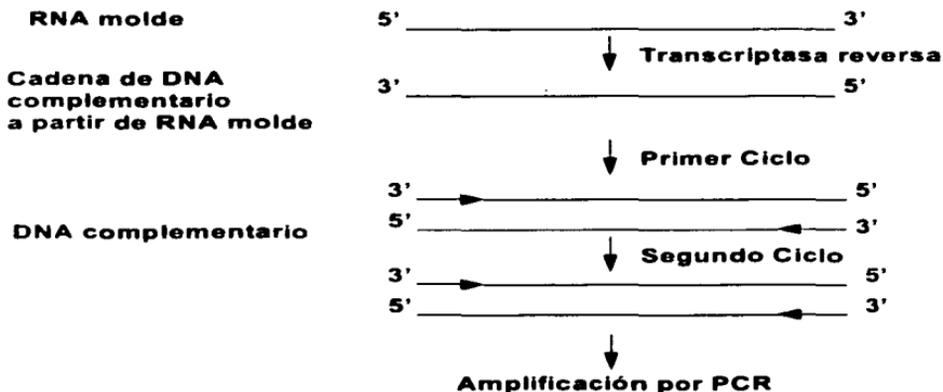


FIG. 1.4 ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA TRANSCRIPCIÓN REVERSA ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).

Desde 1990 se han realizado estudios de RT-PCR aplicado a rotavirus en diferentes partes del mundo, sin embargo en nuestro país pocos laboratorios de investigación realizan la tipificación de rotavirus por esta metodología. Generalmente se utilizan pruebas inmunoenzimáticas que permiten la serotipificación de cepas que son de interés, empero, debido a la escasa disponibilidad de anticuerpos monoclonales a todos los serotipos de Grupo A y a otros grupos de rotavirus, en el laboratorio fue necesaria la estandarización de la RT-PCR con el propósito de serotipificar aquellas cepas de interés epidemiológico. Algunos trabajos los cuales han permitido apoyarnos en la estandarización de RT-PCR para rotavirus son los siguientes:

Gouvea y cols; en 1990, estandarizaron por primera vez la tipificación de rotavirus por RT-PCR a partir de materia fecal, utilizando 10 cepas de referencia que incluían los serotipos 1, 2, 3, 4, 8 y 9; así como 34 cepas aisladas de materia fecal que previamente fueron tipificadas con anticuerpos monoclonales y en donde se encontró una gran correlación entre los métodos moleculares y serológicos. Sin embargo, se encontró un gran número de muestras que no pudieron ser amplificadas debido a la presencia de sustancias inhibitoras que no fue posible eliminar en la extracción de RNA. ²³

En el mismo año, Wilde y cols; sugieren un método de purificación de RNA viral que permite aumentar la sensibilidad de la RT-PCR al eliminar inhibidores presentes en materia fecal. El proceso de purificación utilizó fibra de celulosa 11 (CF-11), en donde el RNA se une a las partículas de ésta y las impurezas son removidas mediante lavados sucesivos. Esta metodología permitió realizar con éxito la retrotranscripción que comúnmente era inhibida así como la amplificación del DNA, sobre todo cuando la muestra era materia fecal. ⁵⁹

En 1991, Nakagomi compara la tipificación de rotavirus por RT-PCR y por ELISA, empleando cepas humanas y de animales (cerdos, cabras, perros, gatos y otros felinos), y encontró un mayor número de muestras tipificadas por RT-PCR que por ELISA. Las muestras que fue posible identificar con ambas metodologías coincidieron en un 100 %. ⁶⁰

Un estudio realizado en Baltimore por Eiden y cols. en 1991, emplea por primera vez la RT-PCR para la identificación del grupo B de rotavirus amplificando una secuencia específica de los genes 3 y 11 dependiendo de la cepa y utilizando como controles negativos cepas de RVHA y lisado de células no infectadas. ³⁵

En 1991, en Atlanta, Gouvea y cols; identifican por RT-PCR a partir de heces a los grupos B y C, empleando oligonucleótidos específicos de grupo B (Gen 8) y grupo C (Gen 6). Las cepas utilizadas provenían de humanos y cerdos; la confirmación de los

grupos se realizó mediante una segunda amplificación incrementando la sensibilidad de ésta metodología.³⁶

En 1992, Taniguchi, en Japón identifica diversos serotipos de rotavirus en cabras, borregos y humanos; y compara sus resultados de PCR con los obtenidos por ELISA.⁵⁰

En el mismo año, Genstch y cols., logran por primera vez genotipificar cepas de RVHA empleando secuencias específicas del gen 4 mediante RT-PCR permitiendo una caracterización más completa de los rotavirus.⁶¹

Ushijima, en 1994, realiza un estudio completo de tipificación de rotavirus a VP7 trabajando con diferentes muestras biológicas (fecales, suero, fluidos cerebrospinales y faringeos) en niños con gastroenteritis, encontrando a este agente viral en las diferentes muestras procesadas, pero no con la misma frecuencia con la que se encuentran en tracto intestinal.⁶²

Por lo tanto, estos trabajos nos han permitido estandarizar las condiciones necesarias para la tipificación de rotavirus a partir de materia fecal mediante la RT-PCR en el laboratorio.

1.3.4 COMPONENTES DE LA REACCIÓN

Los componentes en la mezcla de reacción esta constituida de DNA polimerasa, oligonucleótidos específicos, desoxinucleótidos (dNTPs), la cadena molde de DNA y iones magnesio. Generalmente el volumen total de reacción es de 50 a 100 ul.

RNA MOLDE.

Es necesario que el RNA molde se encuentre lo más puro posible. Cualquier alteración en la cadena de RNA blanco, tal como fragmentación o la presencia de sustancias inhibitoras bloquean la amplificación de PCR; y pueden dar como resultado la amplificación de segmentos inespecíficos o que quizás ni siquiera se lleve a cabo la amplificación. El genoma utilizado en la reacción de amplificación debe ser totalmente puro, y libre de sustancias inhibitoras (proteínas, lípidos o polisacáridos.) que afecten la actividad enzimática en la reacción de amplificación; esto depende del método de extracción y purificación utilizado.

Algunas impurezas tales como formalina, heme, heparina, ácido húmico, agentes quelantes de Mg⁻², detergentes, trazas de fenol, metales pesados, proteínas, lípidos y

polisacáridos pueden llegar a inhibir la reacción. En algunos casos, diluciones del RNA molde, llegan a mejorar la calidad de la amplificación porque los inhibidores también se diluyen y aunque la muestra también se diluye, teóricamente esta metodología requiere desde picogramos de RNA, por lo que es posible amplificar un gran número de muestras. La cantidad total de RNA que requiere la reacción de amplificación es de 0.05 a 1.0 μ g.⁵⁷⁻⁶³

OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos o iniciadores son cortas secuencias de DNA de 18 a 30 bases que son complementarias a la región 5' de la cadena molde de DNA que se amplifica. El alineamiento de oligonucleótidos se lleva a cabo específicamente en la región complementaria a dicha secuencia de la cadena molde para posteriormente ser amplificada. Para obtener una amplificación específica de la cadena molde es necesario sólo la presencia de DNA blanco y de los componentes de la reacción evitando la presencia de otros DNAs contaminantes de la reacción.

Actualmente existen múltiples programas de computadora (Epicentre, Software) que permite seleccionar y diseñar los oligonucleótidos a partir de la secuencia específica del gen que se desea amplificar, por otra parte, es necesaria la selección de oligonucleótidos con un contenido similar de G+C para emplear de esta manera una temperatura de alineamiento eficiente.

La concentración requerida de oligonucleótidos en la reacción es de 0.05 a 0.1 μ M, sin embargo otros autores recomiendan hasta 1.0 μ M. Una elevada concentración de oligonucleótidos provoca la formación de productos inespecíficos y puede llegar a generar dímeros o multímeros, que son fragmentos de DNA que se forman cuando alguno de los oligonucleótidos es amplificado sobre el otro por la enzima. De lo contrario, si la concentración de oligonucleótidos es baja, ocasiona un bajo rendimiento en el número de copias amplificadas.⁶³⁻⁶⁴

Para obtener óptimos resultados, los oligonucleótidos requieren ser purificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o purificación a través de geles. Los oligonucleótidos deben almacenarse a -20 °C, la duración de los oligonucleótidos es de 6 meses cuando se guarda en estado líquido y de 12 a 24 meses cuando está liofilizado.⁵²⁻⁶³

En el caso de rotavirus, los oligonucleótidos específicos de grupo y serotipo para el gen 9 (o gen 8), el cual codifica para la proteína VP7, fueron sintetizados a partir de las cadenas de RNA molde. Los oligonucleótidos Beg-9/End-9, los cuales son de 28 y 27 nucleótidos de longitud respectivamente se seleccionaron para amplificar el gen 9 (o gen 8), de cualquier cepa de rotavirus del grupo A. Los seis oligonucleótidos serotipo específico,

contienen de 19 a 25 nucleótidos y se sintetizaron empleando las regiones variables correspondientes a cada serotipo, todas estas secuencias caen dentro del segmento amplificado para el grupo A de rotavirus y en la figura 5 se observan el tamaño de los fragmentos amplificados.

DNA POLIMERASA.

La DNA polimerasa mas comúnmente empleada es la Taq-polimerasa obtenida de *Thermus aquaticus* expresada en *E.coli*; su peso molecular es de 94 kDa. Existe otra enzima recombinante purificada a partir de *E. coli* conocida como AmpliTaq. Estas enzimas son termoestables y termoactivas, esto es, pueden soportar repetidas exposiciones de temperaturas elevadas como la de desnaturalización de DNA (94 °C).

Para una reacción de PCR se requiere de 1 a 2.5 U por cada 100 ul de volumen de reacción (usualmente 25 a 100 ul) Si la concentración de enzima es alta se obtienen productos inespecíficos, y si la concentración es baja entonces se obtiene una insuficiente cantidad de producto amplificado.^{52 53}

La actividad óptima de la enzima Taq-polimerasa es alrededor de 72°C y tiene la ventaja de mantener su actividad, aún cuando se expone a cortos tiempos de temperatura de desnaturalización del DNA (90 a 95 °C). El tiempo de vida media de esta enzima es de 45 min. a 95 °C. Tiempos prolongados a temperatura de 96°C, causan inactivación de la enzima. Hoy en día se sabe que esta enzima tiene una cinética de 35 a 150 nucleótidos por segundo a 72 °C, o sea de 2 a 4 Kb por minuto.

El intervalo de error de la enzima es la sustitución de 1 nucleótido por cada 150, 000 nucleótidos incorporados a la cadena de DNA.⁵⁶

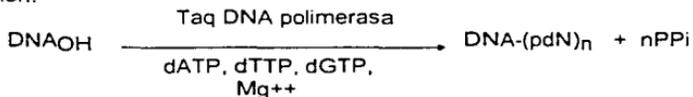
En la actualidad se cuenta con un fragmento de Taq-polimerasa (producido por una recombinante de *E. coli*), del cual fue suprimida la región N-terminal, a este fragmento se le conoce como Stoffel y tiene la propiedad de ser dos veces más termoestable, muestra una actividad óptima sobre un amplio rango de concentración de magnesio (2 a 10 mM) y carece de actividad exonucleasa en dirección 5' → 3' en comparación con la Taq-polimerasa completa. Así, cuando se usa el fragmento Stoffel puede aumentarse la temperatura de desnaturalización principalmente cuando la secuencia es rica en G+C o contiene complejas estructuras secundarias.

Es importante mencionar que el éxito de los resultados depende de varios factores, uno de los más importantes, es optimizar la concentración de iones magnesio por

cada reacción de amplificación para tener una máxima actividad de la enzima Taq-polimerasa.⁶³

El DNA molde y el oligonucleótido alineado a éste, con un extremo libre 3' hidroxil sirve de sustrato a dicha enzima.⁵⁸

Reacción:

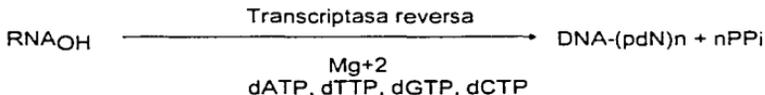


Otras enzimas termoestables de diferente origen son: *T. thermophilus* empleada ampliamente en la detección de expresión de genes de es potencialmente más resistente a sustancias inhibitoras de Taq-polimerasa. La *Thermococcus litoralis* (Vent), tiene una actividad nucleasa de 3' → 5' y se emplea generalmente para amplificaciones de corrección, es altamente termoestable y se utiliza mucho en secuenciación de DNA. Una enzima DNA polimerasa termoestable de origen *Pyrococcus furiosus* (Pfu), tiene actividad exonucleasa 5' → 3' y 3' → 5', tiene una excelente termoestabilidad 95 °C y posee 12 veces mas baja la frecuencia de una incorporación errónea que la Taq-polimerasa.⁵⁶

TRANSCRIPTASA REVERSA

La enzima transcriptasa reversa es una DNA polimerasa útil en la catalización de síntesis de DNA a partir de RNA. Existen tres formas comercialmente disponibles: una es purificada a partir del virus de la mieloblastosis aviar (VMA), la otra es aislada del virus de la leucemia murina moloney (VLM-Mo) y la tercera es obtenida del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1). Estas enzimas carecen de actividad exonucleasa 3' → 5'. El rango de polimerización de la enzima es de 5 bases por segundo y su función es la retrotranscripción del RNA a cDNA, antes de la amplificación.^{56-57,58}

Reacción:



A).- ENZIMA DEL VIRUS DE LA MIELOBLASTOSIS AVIAR (RT-VMA)

- Enzima que consiste en dos cadenas polipeptídicas que presentan una eficiente actividad polimerasa y una alta actividad RNAsa H, o sea que degrada al RNA cuando este se encuentra apareado con DNA (híbrido).
- Su tamaño es de 94 kDa (α -subunidad), y 62 kDa (β -subunidad).
- Posee una vida media mayor de una hora a 42° C en presencia de Mg²⁺ o Mn²⁺ y de detergentes no iónicos, así como de compuestos de sulfidriilo para dar mayor estabilidad a la enzima cuando trabaja *in vitro*.
- Se ha asociado con una actividad endonucleasa para DNA.
- La actividad de la enzima puede ser inhibida por contaminación con otros RNAs (por ejemplo RNAr o RNAt).
- La actividad óptima de la enzima es a 42°C (temperatura corporal de los pollos) y a pH de 8.3.
- La enzima es más eficiente para RNA ricos en estructuras secundarias que otras transcriptasas reversas.

B). ENZIMA DEL VIRUS DE LA LEUCEMIA MURINA MOLONEY (RT-VLM-Mo)

- Su estructura consiste en una sola cadena polipeptídica de actividad polimerasa y una débil actividad RNAsa H; siendo así una ventaja cuando se intenta sintetizar cDNA a partir de un RNAm muy grande. El híbrido formado entre el oligonucleótido y la cadena molde de RNAm son el sustrato de la RNAsa H. Así al inicio de la síntesis de DNA existe una competencia entre la degradación de la cadena molde de RNAm y la iniciación de síntesis de DNA.

- El peso molecular de la estructura es de 80 kDa.
- La vida media de la enzima VLM-Mo es aproximadamente de 15 minutos dentro de las condiciones de reacción, (requiere 4 a 10 veces más de enzima que la de VMA para llevar a cabo la síntesis).
- Es capaz de sintetizar un alto porcentaje de productos de amplificación.

- La inhibición por presencia de otros RNAs, es menor a la de la enzima VMA.
- La actividad máxima de la enzima VLM-Mo es de 38 a 40°C a pH de 7.6.

C) ENZIMA TRANSCRIPTASA REVERSA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (RT-HIV-1)

Esta enzima se presenta en las partículas virales de dos formas, la proteína de 51 kDa y 61 kDa, ambas unidas presentan una actividad enzimática de RNasa H con un peso molecular entre 120 y 130 kDa. Esta enzima se utiliza en estudios de biología molecular y celular como referencia en la detección de la replicación del virus.

Actualmente existe una enzima más eficiente para llevar a cabo la retrotranscripción de RNA a cDNA, conocida como la Supertranscriptasa reversa RT, cuyo origen es derivada del VLM-Mo y carece de actividad RNasa H, por lo que se obtienen rendimientos mayores del 50% en la síntesis de cDNA en comparación con otras transcriptasas. Posee una termoestabilidad mayor a las anteriormente mencionadas.⁵⁶

DESOXINUCLEÓTIDOS

Los dNTPs son precursores necesarios en la síntesis de DNA. La enzima Taq-polimerasa se encarga de incorporar las bases necesarias cuando se lleva cabo la extensión de los oligonucleótidos. La concentración óptima para la reacción de PCR es de 20 a 200 μ M de cada desoxinucleótido si se desea lograr una alta especificidad y fidelidad. Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) deben emplearse en condiciones equivalentes para minimizar errores por una mala incorporación de alguno de ellos. Aunque la reacción de PCR requiere de un exceso de dNTPs, una concentración mayor de 50mM del total de dNTPs en PCR inhibe la actividad de Taq-polimerasa. De lo contrario, si la concentración de dNTPs es baja, se lograría un rendimiento bajo de producto amplificado.⁶⁴

Teóricamente 20 μ M de cada dNTP en una mezcla de reacción de 100 μ l es suficiente para sintetizar 2 μ g de una secuencia de 400 pares de bases.^{58,63}

IONES MAGNESIO

La presencia de cofactores como iones magnesio son necesarios en la actividad enzimática. La concentración de iones magnesio llega a afectar el alineamiento de los oligonucleótidos, disminuyendo la eficiencia de la reacción de amplificación. La concentración promedio para la reacción es de 0.5 a 2.5; para aumentar la sensibilidad y

rendimiento de producto amplificado se varían las concentraciones de $MgCl_2$ en un rango de 1.5 a 4 mM.⁶³

La presencia de EDTA u otros agentes quelantes en la reacción puede interferir con los iones magnesio. La concentración óptima de cada oligonucleótido debe ser determinada antes de hacer PCR trabajando con diferentes concentraciones de magnesio para aumentar el rendimiento en el producto de amplificación.^{58 63}

SOLUCIÓN REGULADORA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se han publicado varias formulaciones de soluciones reguladoras, sin embargo son similares a las que describe Saiki y colaboradores en 1988. Esta se compone de Tris 10 mM pH 8.4, 50 mM de KCl, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.01% de gelatina y 0.01% de Tween 20.⁶⁴ Los detergentes son esenciales para la máxima actividad de la enzima; es posible variar la concentración de sales (por ejemplo reducir o eliminar el KCl), y se sabe que a una concentración alta de magnesio, los oligonucleótidos son más eficientes en la reacción. Además parece existir una interacción estequiométrica entre los dNTPs y el magnesio. Así, elevadas concentraciones de dNTPs atrapan los iones magnesio y por lo tanto reducen la concentración de magnesio disponible en la actividad enzimática.⁵²⁻⁵³

La gelatina o albúmina de suero bovino, (100 ug/ml) y detergentes no iónicos como el Tween 20 se emplean para la estabilidad de la Taq DNA-polimerasa cuando se diluye la enzima por abajo de 1 U/100 ul.⁶³

COSOLVENTES

Algunas ocasiones la cadena de DNA molde en la amplificación de PCR, no es desnaturalizada completamente por la presencia de un alto contenido de G+C y por lo tanto, los oligonucleótidos no pueden alinearse a la región de la cadena molde cuando se forman estructuras secundarias. Los cosolventes utilizados en PCR tales como DMSO del 1 al 10% o glicerol del 5 a 20%, pueden incrementar la eficiencia de DNA amplificado por PCR. La presencia de cosolventes en la reacción de PCR ayuda en la amplificación de fragmentos muy grandes de DNA (aproximadamente 2.5 Kb).^{58 63}

ACEITE MINERAL.

Una capa de 80 a 100 ul de aceite mineral sobre la mezcla de reacción previene la evaporización y alcanza con mayor rapidez la temperatura de desnaturalización.

La capa de aceite mantiene una alta estabilidad en la reacción al evitar la vaporización, así que la concentración de sales en la mezcla de reacción se mantiene constante; la utilización de una capa de aceite mineral llega a incrementar el rendimiento en el producto de amplificación hasta 5 veces más.

Alternativamente, una cera (Ampliwx) se emplea para mantener temperaturas precisas dentro de la mezcla de reacción, por lo tanto aumenta la especificidad de ésta metodología. En algunos termocicladores como el Perkin-Elmer 9600, tiene una cubierta caliente en la superficie que evita la condensación de los tubos, por lo que la capa de aceite o cera puede omitirse.⁶³

1.3.5 CONDICIONES DE REACCIÓN.

La PCR involucra repetidos ciclos que constan de una temperatura alta para separar las cadenas de DNA, una temperatura baja para la hibridación del oligonucleótido a la cadena molde de DNA y una temperatura intermedia para la extensión del oligonucleótido. Fig. 1.5.

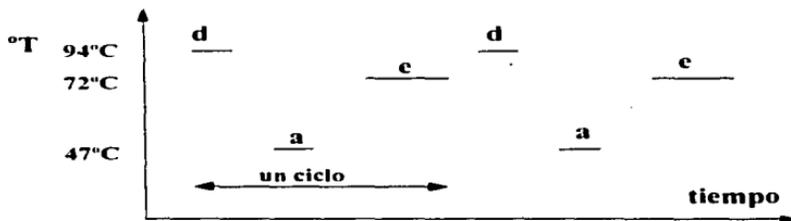


Fig. 1.5 Representación gráfica del ciclo de PCR, que ilustra los tiempos de transición desnaturalización (d), alineamiento (a) y extensión (e).

Temperaturas inadecuadas durante el proceso de la amplificación de PCR, alteran la especificidad o eficiencia de la reacción. Temperaturas menores a la óptima en el alineamiento del oligonucleótido dan origen a productos inespecíficos. Por otro lado temperaturas mayores impide que estos se asocien a la cadena molde de DNA produciendo una amplificación nula.⁵³

TEMPERATURA

Las temperaturas requeridas para PCR son críticas, así que es importante el uso de termocicladores, los cuales permiten automatizar ciclos consecutivos de temperaturas de acuerdo a un programa que debe estandarizarse correctamente. El uso de algunos termocicladores emplean una serie de baños de agua caliente, sin embargo otros usan bloques metálicos de calentamiento. Comúnmente de 24 a 96 reacciones pueden efectuarse simultáneamente; es necesario que un termociclador proporcione calentamiento y enfriamiento uniformes en todas las reacciones. Un termociclador debe ser exacto y reproducible, debe permitir cambiar de una a otra temperatura dentro de un corto tiempo y debe ser fácil de programar.⁵⁷

TEMPERATURA PARA LA DESNATURALIZACIÓN DEL DNA

La desnaturalización de la secuencia molde de DNA es realizada de 94 a 95°C por lo menos durante 3 minutos antes del primer ciclo de PCR para garantizar una separación completa de las cadenas de DNA, continuando en cada ciclo a esta misma temperatura durante 30 a 60 segundos. La selección de la temperatura y tiempo de extensión depende del tamaño y contenido de bases G+C en la cadena molde de DNA. Así, una temperatura baja puede ocasionar una incompleta desnaturalización y por ende un fracaso en el número de copias amplificadas; mientras que una temperatura de desnaturalización superior a la antes mencionada puede ocasionar una pérdida en la actividad de la enzima Taq-polimerasa.^{52,63}

TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

La temperatura de alineamiento depende de la composición de bases, extensión y concentración de los oligonucleótidos en la amplificación. La temperatura ideal de alineamiento es generalmente de 7 a 5°C por abajo de la T_m real de los oligonucleótidos, está generalmente es de 55 a 72°C.⁶³

Una estricta temperatura de alineamiento, especialmente durante los primeros ciclos, ayuda a incrementar la especificidad de la reacción. Si la temperatura de alineamiento es menor a la óptima, se observará frecuentemente la formación de fragmentos inespecíficos en la amplificación del DNA.⁵²

TEMPERATURA DE EXTENSIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Esta temperatura depende de la extensión de la secuencia que se desea amplificar, así como de la temperatura usada para la reacción de amplificación.

Comúnmente los oligonucleótidos se extienden a 72°C, por ser la temperatura óptima de la enzima Taq-polimerasa.

El uso de la temperatura de extensión, con una alta concentración de dNTPs, favorece la extensión de los iniciadores por la adición de nucleótidos a la cadena molde, siendo posible desarrollar una amplificación con sólo dos temperaturas cuando la secuencia que se amplifica es corta (hasta 300 pares de bases). Cuando se emplea el PCR con sólo dos temperaturas es un procedimiento más rápido.⁵²⁻⁵³

En general, se requieren 20 segundos de extensión para amplificar fragmentos cortos como de 500 pb y 40 segundos para fragmentos hasta de 1.2Kb, sin embargo, el tiempo puede variar, la Taq-polimerasa puede adicionar hasta 60 bases por segundo a 72°C. La combinación de un periodo grande de extensión con agentes tales como gelatina o albúmina de suero bovino en la solución reguladora de la reacción son importantes para una amplia actividad y estabilidad de la enzima Taq-polimerasa.⁶⁴

NÚMERO DE CICLOS EN LA REACCIÓN DE PCR

El número de ciclos empleados en PCR, depende del tamaño de fragmento amplificado y del número de copias que se obtiene en la reacción. Empero el exceso de ciclos incrementa la cantidad y complejidad de productos inespecíficos. De lo contrario, pocos ciclos disminuyen el rendimiento de los productos de amplificación. Al principio, la cantidad de DNA molde y la sensibilidad del método son factores críticos en la determinación del número de ciclos en la reacción. Teóricamente en 20 ciclos se producen 1 millón de copias a partir de un fragmento de DNA molde (2^{20}); comúnmente se emplean de 30 a 40 ciclos por la baja eficiencia de la reacción en algunos casos.

En una reacción óptima, menos de 10 copias de DNA molde pueden ser amplificadas en menos de 40 ciclos y el producto de amplificación es fácilmente detectado en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.⁵⁷⁻⁶⁴

1.3.6. METODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA VIRAL.

Existen diferentes metodologías de extracción de RNA comercialmente disponibles, empero, muchos de estos métodos de extracción impiden la amplificación del RNA de rotavirus por la inhibición de la actividad de las enzimas, sobre todo cuando se trabaja a partir de materia fecal por la gran cantidad de sustancias inhibitorias presentes después de la extracción del genoma viral - tales como proteínas, lípidos, polisacáridos y sustancias empleadas en la misma extracción, aún obteniendo purezas altas (mayores del 85%), quedan muchas veces un gran número de muestras sin tipificar por la presencia de

inhibidores en la reacción de amplificación. Además de muestras fecales en otros fluidos biológicos existen sustancias degradativas del RNA o inhibidoras de la actividad enzimática que difícilmente puede ser removidas del RNA con los métodos tradicionales de extracción, en tanto, el RNA es menos estable en solución que el DNA.⁵⁹

1.3.6.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

PROTEINASA K

Es una endopeptidasa activa utilizada para la digestión general de proteínas, activada en un rango de pH óptimo de 7.5 a 10.5; también puede ser estimulada por agentes desnaturalizantes como dodesil sulfato de sodio (SDS) y urea. Es efectiva sobre proteínas activas y puede utilizarse, por lo tanto, para la rápida inactivación de endonucleasas tales como RNAsas y DNAsas, permitiendo su utilización especialmente en el aislamiento de RNA y DNA nativo.

Esta metodología consiste en una digestión previa de las proteínas de la muestra con proteinasa K en una concentración de 100 ug/ml a 37°C durante 60 minutos, en una solución que contiene SDS, NaCl, EDTA y tris-HCl. Posteriormente el RNA es extraído con fenol-cloroformo y precipitación en etanol a -20 °C toda la noche. Algunos autores han omitido el uso de proteinasa K y han utilizado sólo la extracción fenol-cloroformo en un paso.⁵⁹

ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA

Debido a la presencia de enzimas (RNAsas) que degradan el RNA, se han utilizado métodos de extracción que emplean agentes cautrópicos, como isotiocianato de guanidina (ISTG) o hidrocloreuro de guanidina (HDCG), pero el ISTG se ha empleado con mayor frecuencia para la purificación de DNA y RNA por su alto potencial en la inactivación de DNAsas y RNAsas, mientras que el HDCG a sido menos efectivo respecto a la inhibición de RNAsas.⁶⁵⁻⁶⁶

Algunas extracciones de RNA combinan isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo; otros emplean el isotiocianato de guanidina y fenol caliente.⁶⁷ Ambas metodologías proporcionan un alto rendimiento de RNA integro, además de ser fácil y rápida.

La solución de isotiocianato de guanidina comercialmente se conoce como Trizol, y tiene la característica de ser una solución monofásica compuesta de fenol más isotiocianato de guanidina 4M. Dicho reactivo permite mantener el RNA integro en la fase

acuosa cuando se realiza la extracción y finalmente se precipita con isopropanol; permaneciendo en la fase orgánica DNA, proteínas y otros componentes celulares.⁶⁸

1.3.6.2. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE RNA

PURIFICACIÓN CON HIDROXIAPATITA

La hidroxiapatita son cristales de fosfato de calcio ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)₂, la cual es utilizada para la purificación de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, virus y otras macromoléculas. La hidroxiapatita tiene propiedades únicas de separación, versatilidad y selectividad permitiendo junto con otras técnicas de extracción, el aislamiento de macromoléculas con una elevada pureza, en este caso RNA, aplicable en técnicas de biología molecular como PCR. Comúnmente se utiliza cuando se realiza una extracción a partir de materia cruda obteniendo resultados muy satisfactorios. Tiene una escasa capacidad de adsorción para sustancias de bajo peso molecular tales como nucleótidos, sales y aminoácidos.

Los ácidos nucleicos se unen a la hidroxiapatita debido a la interacción entre los grupos fosfato del polinucleótido al calcio en los cristales de hidroxiapatita, pero esto depende de la disposición estérica de los grupos fosfato del ácido nucleico al calcio, y se ha observado mayor afinidad de los ácidos nucleicos de cadena sencilla por la hidroxiapatita que los de doble cadena.⁵⁶

PURIFICACIÓN CON CF-11

La enzima transcriptasa reversa, que convierte el RNA a DNA antes de la reacción de amplificación del DNA, es susceptible a un gran número de sustancias que interfieren en la reacción. La actividad inhibitora se presenta en casi el 50% de las muestras clínicas y es una limitación significativa en el número de muestras que se desean tipificar por PCR. Algunos reportes indican hacer diluciones de extracto para evitar la inhibición de la reacción, pero la sensibilidad de ésta metodología también puede disminuir por el correspondiente factor de dilución. Debido a este problema se ha utilizado fibra de celulosa CF-11, para purificar el RNA de rotavirus que permite aumentar el número de muestras tipificadas al eliminar completamente toda sustancia inhibitora de la reacción.^{59, 69}

1.3.7. PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES DE LA TÉCNICA DE PCR.

Si bien hasta ahora la PCR se ha enfocado al diagnóstico de enfermedades virales principalmente, en la actualidad se está trabajando en el desarrollo de métodos de

diagnóstico usando esta tecnología en la detección tanto de RNA como DNA de diversos microorganismos, incluyendo diferentes especies de bacterias, hongos y parásitos, por lo que es de esperarse un gran avance en el diagnóstico de enfermedades infecciosas en general mediante la utilización del método de PCR. La alta sensibilidad de esta técnica , puede constituir también una de sus más serias limitantes, ya que es posible amplificar pequeñas cantidades de DNA que puede estar presente como contaminante.⁷⁵

Por tal motivo es necesario contar con estrictas condiciones de trabajo para evitar esta posibilidad. Otro factor limitante es la inadecuada selección de las secuencias utilizadas como oligonucleótidos. La pequeña longitud de estos, aumenta el riesgo de hibridización con otras especies de DNA que contengan secuencias con alto rango de homología, por tal motivo, es importante, además, descartar una probable similitud con otras secuencias. La selección de los iniciadores con un alto porcentaje de guanina/citocina (G/C), favorece la estabilidad del híbrido oligonucleótido-DNA y de esta manera permite aumentar la temperatura de hibridación en la reacción de PCR, lo que disminuye las posibilidades de uniones no específicas. Este factor es de particular importancia en el caso de investigación directa de muestras clínicas.

Una desventaja actual de la estrategia de amplificación de secuencias (como la utilizada en PCR) en comparación con otros métodos basados en el incremento de la señal de detección como son los sistemas de captura del DNA o RNA, radica en que estos son cuantitativos, mientras que la técnica de PCR, hasta ahora, es una metodología sólo cualitativa. Sin embargo, existen posibilidades razonables de desarrollo de métodos de cuantificación de productos de PCR. Otra alternativa consiste en la integración de bases fluorescentes o de enzimas acopladas covalentemente a los oligonucleótidos sintéticos utilizándose como iniciadores, de esta forma, el DNA obtenido mediante el método de PCR podría ser cuantificado por técnicas fluorescentes o colorimétricas. Otra posibilidad sería una combinación de PCR con sistemas de captura del RNA y DNA con el fin de desarrollar métodos cuantitativos.⁷⁰

2.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Para la realización de estudios de epidemiología molecular y determinar la importancia de los rotavirus como principales agentes virales productores de diarreas agudas, es necesario la estandarización de técnicas de laboratorio, que nos permitan trabajar de manera rápida y específica en el diagnóstico y tipificación de estos agentes virales.

Actualmente existen anticuerpos monoclonales serotipo específico (VP7) a rotavirus para la técnica de ELISA. Sin embargo, aún contando con una batería de antisueros disponibles, restan más del 36 % de cepas virales sin identificar.

Alternativamente se cuenta con una técnica de biología molecular PCR, de gran utilidad en la tipificación de rotavirus, mediante la utilización de oligonucleótidos específicos para grupo y serotipo además de RNA viral extraído de muestras fecales sin importar la viabilidad del virus o alteraciones en su morfología.

Por lo tanto, consideramos que dicha metodología sería de gran importancia para la tipificación de rotavirus a partir del genoma viral, permitiéndonos conocer un panorama general de la circulación y distribución de los serotipos de mayor frecuencia en el estado de Tamaulipas (Cd. Victoria, Matamoros, Tampico, Reynosa, Mante y San Fernando), durante un año de estudio 1996-1997.

3.- OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Estandarización de la transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la tipificación de rotavirus a partir de materia fecal.

3. OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Detección de rotavirus por la técnica de rotaforesis como prueba tamiz, en muestras diarreicas procedentes del Estado de Tamaulipas.

2.- Desarrollar un método rápido y sencillo de extracción y purificación del RNA viral con CF-11 a partir de materia fecal útil en la tipificación de rotavirus por RT-PCR.

3.- Comparar la técnica de extracción fenol-cloroformo-ISTG con la de purificación con CF-11, necesaria en la estandarización de PCR.

4.- Determinación de rotavirus del grupo A (RVHA) con oligonucleótidos Beg-9/End-9.

5.- Determinación de rotavirus del grupo C (RVHC) con oligonucleótidos C-1/C-3 y C1-C4.

6.- Utilización de PCR para la tipificación de rotavirus a serotipos 1, 2, 3, y 4 con oligonucleótidos serotipo específico.

7.- Aplicación de la RT-PCR en el análisis epidemiológico de un brote por rotavirus en el estado de Tamaulipas en 1995-1996.

4.- HIPÓTESIS

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa amplifica millones de veces “*in vitro*”, una secuencia específica del genoma (DNA), por lo tanto al estandarizar ésta metodología de biología molecular nos permitirá tipificar de manera sencilla, rápida y específica, cepas de rotavirus a partir de una mínima cantidad de partículas virales presentes en la muestra clínica, sin importar la viabilidad del virus o alteraciones morfológicas en el virión.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. MATERIAL

5.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para este trabajo se utilizaron 100 muestras clínicas; positivas a rotavirus del Estado de Tamaulipas. Dichas muestras son representativas de un brote correspondiente al periodo de 1995-1996; en las diferentes entidades que conforman dicho Estado (Cd. Victoria, Tampico, Reynosa, Matamoros, Cd. Mante y San Fernando).

5.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

Pipetas Pasteur
Tubos de ensaye de 12x75
Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10 y 25 ml
Vidrios (7.5x 6.5cm)
Separadores y peines de teflón
Pinzas, bulbos y perillas
Tubos eppenford de 1.5 ml
Micropipetas Gilson de 0.5-20 ul, 20-200 ul
Puntas para pipetas (160 ul y hasta 1000 ul)
Cristalería común de Laboratorio
Tubos de reacción para PCR Micro Amp de Perkin Elmer (0.2 ml y 0.5 ml)
Baño de -20°C Stratagene
Celda de cuarzo para espectrofotómetro

5.1.3 EQUIPO

Microcentrífuga con sistema de refrigeración
Vortex GENIE-2 VWR
Cámara horizontal para electroforesis
Cámara de electroforesis MINI PROTEAN BIORAD
Cámara de electroforesis Mini Sub DNA cell
Fuente de poder 200/2.00 BIORAD
SABAN (secador de ácidos nucleicos a vacío RC 10.10 Jovan)
Espectrofotómetro Gene Quant RNA/DNA Pharmacia
Termociclador Gene Amp System 2400 Perkin Elmer
Transiluminador UV Ultra-Lum UVB-20
Revcó de -20°C American

Refrigerador de 4°C American
Campana de Flujo Vertical
Balanza MJ-3000 Chyo
Cámara fotográfica POLAROID 57

5.1.4 REACTIVOS

Sol. A 5x (solución de lisis)
Sol. B (fenol)
Sol. C 10x (agarosa 1% xilen-cianol)
Sol. D 10x (glicina)
Sol. E 10x (etanol-ácido acético)
Sol. F 100x (nitrato de plata)
Sol. G 125x (formaldehído)
Sol. de hidróxido de sodio 3%
Sol. salina fisiológica
Sol. H (ácido acético)
Sol. de monómeros (acrilamida-bis-acrilamida)
Tris pH 8.8
Persulfato de amonio 2%
Agarosa 1%
Tetrametilendiamina (TEMED)
Etanol absoluto
Cloroformo
Sol. de isotiocianato de guanidina (trizol)
Agua DEPC
Acetato de amonio 5M
Buffer para PCR 10x
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Inhibidor de RNAsas de placenta humana (RNAsin) 40 U/ μ l
Dimetil sulfóxido (DMSO)
Transcriptasa reversa 25U/ μ l (Boehringer Manneheim)
Taq-polimerasa 5U/ μ l(Boehringer Manneheim)
Bromuro de etidio
Sol. de TBE 10x (Acido bórico, EDTA)

5.1.5 OLIGONUCLEÓTIDOS

Oligonucleótidos específicos del grupo A (Beg9 y End 9)

Oligonucleótidos específicos de serotipo (aBT1, aCT2, aET3, aDT4 y RVG-9)

Oligonucleótidos específicos del grupo C (C-1,C-3 y C-4)

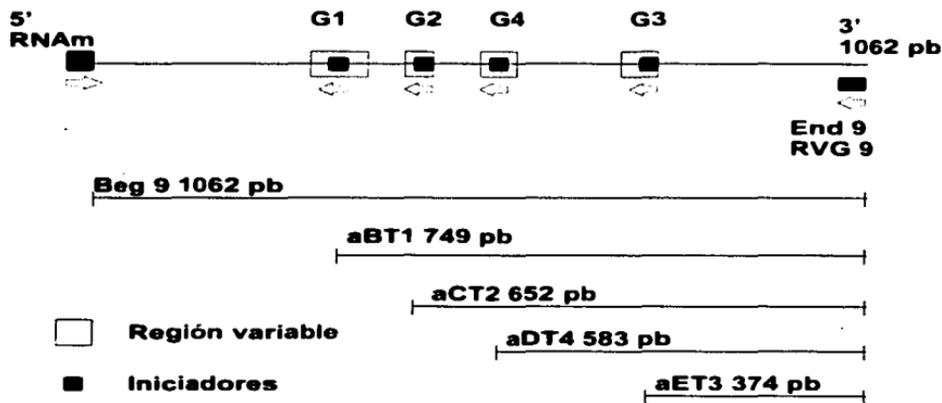


FIG. 5.1. ESQUEMA DEL GEN 9 (O GEN 8), EL CUAL CODIFICA PARA LA GLICOPROTEÍNA VP7, MOSTRANDO LA LOCALIZACIÓN DE LA REGIÓN VARIABLE DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS Y EL TAMAÑO DE LOS SEGMENTOS AMPLIFICADOS PARA GRUPO A.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 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 con nitrato de plata. Esta metodología modificada en el Laboratorio de Rotavirus ha permitido trabajar con pequeñas cantidades de materia fecal.

1).- Extracción de RNA viral a partir de materia fecal

A 300 μ L de heces se adicionaron 300 μ l de sol A, 300 μ l de sol B y 300 μ l de cloroformo; se mezcló homogéneamente y centrifugó a 7500 rpm durante 15 min. El sobrenadante se separó y guardó a 4°C hasta su uso.

2).- Preparación del gel de poliacrilamida al 5%

Se colocaron los separadores de teflón y el peine entre los vidrios, se sujetaron con una pinza a cada lado y se sellaron las orillas de los vidrios con agarosa.

La preparación del gel consistió en 1.32 ml de sol. de monómeros, 2 ml de sol. de Tris pH 8.8, 4.56 ml de agua destilada, 480 μ l de persulfato de amonio y 10 μ l de TEMED.

Se procedió a llenar el espacio entre los vidrios y se esperó a la polimerización. Se retiró el peine y secaron los pozos con papel absorbente.

3).- Electroforesis

A 80 μ l de la extracción de RNA se adicionó una gota de sol. C. Se colocó la muestra en los pozos del gel y esperó a que solidificara. Posteriormente se hizo un corrimiento electroforético a 100 volts por 2 horas aproximadamente en 250 ml de sol. D (1X).

4).- Tinción de geles de poliacrilamida

Se retiró el gel de los vidrios, se realizó un pequeño corte en la parte inferior de primer carril, se fijó en sol. E (1X) durante 30 min; se procedió a la tinción con sol. F. Posteriormente se reveló con la sol. G hasta la observación de las bandas del carril de la muestra y control positivo (primer carril), finalmente se detuvo la reacción con solución de ácido acético al 1%.

5).- Interpretación de los resultados

La muestra colocada en cada uno de los carriles del gel fue comparada con el control positivo y se verificaron las once bandas del genoma característico de rotavirus.

5.2.2 PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA AL 10%

Esta metodología presenta el mismo fundamento que la rotaforesis. Las condiciones en la metodología fueron las mismas, sólo que en esta técnica se utilizó una cámara de electroforesis vertical (BIORAD). La electroforesis se llevó a cabo a 100 volts durante 14 horas.

La finalidad de esta metodología es el análisis de los perfiles electroforéticos de las cepas de rotavirus.

5.2.3 TRANSCRIPCIÓN REVERSA ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

Es una técnica de biología molecular "in vitro" que consiste en la retrotranscripción de RNA a cDNA mediante la transcriptasa reversa y posterior amplificación de secuencias características de grupos A, B y C, y serotipos mediante oligonucleótidos específicos que hibridizan las cadenas de DNA expuestas y luego son amplificadas por la Taq-polimerasa.

5.2.3.1 EXTRACCIÓN DE RNA VIRAL A PARTIR DE MATERIA FECAL

EXTRACCIÓN FENOL-CLOROFORMO-ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA

- 1.- Se colocaron 200 μ l de materia fecal en un tubo eppendorf, se adicionaron 200 μ l de sol. A y 200 μ l de trizol. Se agitó vigorosamente y se se centrifugó a 10, 000 rpm/10 min.
- 2.- Posteriormente se realizó la extracción del RNA con fenol-cloroformo 1:1. Se centrifugó a 10, 000 rpm/10 min.
- 3.- El RNA se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío en presencia de 40 μ l de acetato de amonio 5M a -70°C durante 24 horas.
- 4.- El botón de RNA se lavó con 500 μ l de etanol al 70 %, se centrifugó a 8,000 rpm/5min/ 4°C .
- 5.- El genoma viral fue secado en un sistema de vacío (SABAN) a 5, 000 rpm por 30 min y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.- Se resuspendió el RNA viral en 15 μ l de agua DEPC hasta su utilización.

7.- El RNA se verificó en PAGE al 5%. empleando 2 μ l de la extracción.

PURIFICACIÓN DE RNA CON CF-11

1.- Se colocaron 200 μ l de materia fecal en un tubo eppendorf, se adicionaron 200 μ l de sol. A y 200 μ l de trizol. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10,000 rpm/10 min.

2.- Posteriormente se realizó la extracción del RNA con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 24:24:1. Se centrifugó a 10,000 rpm/10 min.

3.- A la fase acuosa se adicionó 30 mg de CF-11 y se mantuvo mezclando 24 hrs. a 4 °C.

4.- La muestra se centrifugó a 13,000 rpm/ 1 min, el sobrenadante se decantó y la CF-11 se lavó 3 veces con STE (0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA, 0.05 M de tris-HCl, pH 7.0), que contiene 60 % de etanol (vol/vol).

5.- En seguida el RNA se eluyó de la CF-11 con 30 μ l de agua DEPC, a 56°C/5min.

6.- La extracción de RNA se verificó en PAGE al 5 %.

5.2.3.2. CUANTIFICACIÓN DE RNA VIRAL

El espectrofotómetro se calibró con agua destilada y estéril. La cuantificación se llevó a cabo en una microcelda de cuarzo colocando 2 μ l de la extracción en 98 μ l de agua destilada. Posteriormente se determinó a 260 y 280 nm la lectura de la concentración de RNA, la pureza y la presencia de proteínas contaminantes en la muestra.

La concentración del RNA de rotavirus en μ g/ μ l se determinó con la siguiente fórmula

$$[\text{RNA}] = \frac{\text{Abs}_{260} \times 40 \times 50}{1000}$$

Donde

El factor es 40 para lecturas de DNA de cadena sencilla.

50 es el factor de la dilución.

5.2.3.3 PRIMERA AMPLIFICACIÓN DE dsRNA

DETERMINACIÓN DE GRUPO A DE ROTAVIRUS

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 50 μ l. La preparación de la mezcla de reacción se realizó en un baño de hielo a -20°C.

La primera mezcla de reacción consistió en buffer 10X(Tris 10mM pH 8.3, KCl 40 mM, MgCl₂ 1.5mM), dNTPs 0.2 mM de cada nucleótido, RNAsin 8U, oligonucleótidos específicos del grupo A (Beg-9 y End-9 0.1 μ M); en un volumen suficiente de agua DEPC. Se adicionaron las enzimas a la mezcla de reacción 12.5 U de transcriptasa reversa y 2.0 U de Taq-polimerasa, se homogenizó. Cuando se trabajó con varias muestras esta mezcla se calculó y dividió entre el número de muestras.

Por otra parte, 5 μ l de RNA se desnaturalizó a 97°C/5 min en presencia de 7% de DMSO y rápidamente se enfrió en etanol a -20°C/5 min. Posteriormente se adicionó la mezcla de reacción para un volumen total de 50 μ l y se colocaron los tubos en el termociclador con el siguiente programa: 20 min a 50°C, 3 min a 94°C, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 2 min a 47°C, 40 seg a 72°C aumentando 3 seg por ciclo, luego 7 min a 72°C finalmente 4°C.

5.2.3.4. SEGUNDA AMPLIFICACIÓN DE dsDNA

DETERMINACIÓN DE SEROTIPO DE ROTAVIRUS GRUPO A

En esta reacción se empleó el producto de la primera amplificación.

La segunda mezcla de reacción consistió en el mismo buffer 10X, 0.2 mM de cada dNTP, 0.05 μ M de cada oligonucleótido serotipo específico (aBT1, aCT2, aET3, aDT4 junto con RVG-9); 1.5 U de Taq-polimerasa en un volumen suficiente de agua DEPC.

A 5 μ l de producto de la primera reacción (dsDNA) fue previamente desnaturalizado a 97°C/ 5 min en presencia de 7% de DMSO, se adicionaron 45 μ l de la mezcla de reacción, se homogenizó y se colocaron los tubos en el termociclador con el siguiente programa: 5 min a 97 °C, 30 ciclos de: 30 seg a 94°C, 2 min a 47°C, 1 min a 72°C, luego 7 min a 72°C, finalmente 4°C.

5.2.3.5. DETERMINACIÓN DE GRUPO C DE ROTAVIRUS

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 50 μ l. La mezcla de reacción se realizó en un baño de hielo a -20°C .

La primera mezcla de reacción consistió en buffer 10X(Tris 10mM pH 8.3, KCl 40 mM, MgCl_2 1.5mM), dNTPs 0.2 μ M de cada nucleótido, RNAsin 8U, oligonucleótidos específicos del grupo C (C-1 y C-4 0.05 μ M); en un volumen suficiente de agua DEPC. Se adicionaron las enzimas a la mezcla de reacción 12.5 U de transcriptasa reversa y 2.0 U de Taq-polimerasa, se homogenizó. Cuando se trabajó con varias muestras esta mezcla se calculó y dividió entre el número de muestras.

Se utilizaron 5ul de RNA que fue desnaturalizado a $97^{\circ}\text{C}/5$ min en presencia de 7% de DMSO y rápidamente se enfrió en etanol a $-20^{\circ}\text{C}/5$ min. Posteriormente se adicionó la mezcla de reacción hasta un volumen total de 50 ul y se colocaron los tubos en el termociclador con el siguiente programa: 20 min a 50°C , 3 min a 94°C , 30 ciclos de: 30 seg a 94°C , 2 min a 47°C , 40 seg a 72°C aumentando 3 seg por ciclo, luego 7 min a 72°C , finalmente 4°C .

La comprobación de grupo C se determinó mediante PCR anidado empleando las mismas condiciones de reacción anteriores, a excepción de los oligonucleótidos que fueron (C1/C3).

5.2.3.6 OBSERVACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS EN GELES DE AGAROSA

Los productos de las amplificaciones se verificaron en geles de agarosa al 2% que contenía 0.5 ug de bromuro de etidio por ml. En el primer pozo del gel se colocaron 2 ul de marcador ϕ X-174 digerido en Hind III con el propósito de visualizar el tamaño de los segmentos de las amplificaciones. Se colocaron 10 ul de los productos amplificados en cada uno de los pozos del gel y se realizó la electroforesis en buffer TBE (0.089M de TRIS, 0.089 M de ácido bórico y 2mM de EDTA pH 8); a 120 V durante una hora.

Finalmente se observó el gel en el transiluminador y se tomó fotografía con cámara Polaroid 57, utilizando película 667 con tiempo de exposición de 1 segundo y una apertura del diafragma entre 8 y 11.

5.2.3.7 ANÁLISIS DE AMPLIFICACIÓN DE SEGMENTOS

Se verificó el tamaño de los segmentos amplificados tanto para grupo como para serotipo, comparándolos con el marcador de peso molecular ϕ X-174 que va de 72 a 1353 pb.

SEGMENTO	TAMAÑO (pares de bases)
Grupo A	1062
Serotipo 1	749
Serotipo 2	652
Serotipo 3	374
Serotipo 4	583
Grupo C	356
Comprobación de grupo C	327

6. RESULTADOS

Se analizaron 100 muestras positivas a rotavirus en niños con gastroenteritis aguda menores de 5 años procedentes del Estado de Tamaulipas (Cd. Victoria, Matamoros, Tampico, Reynosa, Mante y San Fernando); durante el periodo de 1995-1996. La metodología que se utilizó para el diagnóstico de rotavirus fue rotaforesis, la cual mostró claramente el perfil genómico de 11 fragmentos de RNA, característico de los rotavirus.

En este trabajo se compararon dos metodologías de extracción de RNA viral a partir de muestras clínicas, una con fenol-cloroformo-ISTG, la cual generalmente es realizada en estudios de este tipo y otra de extracción y purificación de RNA con fibra de celulosa 11 (CF-11). Esta última metodología fue necesaria para aquellas muestras que no se amplificaron en la primera reacción de RT-PCR mediante la extracción fenol-cloroformo-ISTG. En ambas metodologías de extracción y purificación de RNA viral se determinó la presencia del RNA en geles de poliacrilamida al 5% teñidos con nitrato de plata, observándose mayor nitidez en el perfil electroforético mediante la técnica de CF-11, a diferencia de la extracción con fenol-cloroformo-ISTG, donde el genoma viral muestra un fondo menos limpio, lo que significa la presencia de sustancias inhibitoras que interfieren de manera importante en la retrotranscripción. **Fig. 6.1**

Posteriormente, se determinó la concentración de RNA viral en ambas metodologías mediante un espectrofotómetro para ácidos nucleicos, los resultados mostraron que con la metodología fenol-cloroformo-ISTG se obtiene mayor concentración de RNA (683 ng/ μ l). Asimismo la presencia de proteínas (0-0.2 ng/ml) y una pureza de (58-86%); la cual no fue suficiente para realizar la amplificación en la mayoría de las muestras, mientras que con la purificación con CF-11 se logró obtener una menor concentración de RNA (309 ng/ μ l) y ausencia de proteínas, las cuales son inhibidores comunes de la RT-PCR además de obtener una pureza mayor (88 a 100%). Esta metodología nos permitió determinar el grupo y serotipo cuando en las mismas, no fue posible tipificarlas por la metodología convencional con fenol-cloroformo-ISTG. **Tabla 6.1**

La previa estandarización de extracción y purificación de RNA viral nos permitió conocer las condiciones adecuadas para la transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa.

Por otra parte, fue determinante en la optimización de la PCR la concentración de RNA viral a partir de muestras clínicas. Para ello se ensayó un amplio intervalo de concentraciones de RNA para la primera amplificación y determinar la cantidad óptima del RNA molde en la reacción. Los resultados mostraron que la mejor amplificación se realizó

cuando se utilizaron de 5 a 500 ng de RNA total, lo que corresponde a 250 pg - 25 ng del RNA del gen 9 equivalente al 5% del RNA del genoma total de rotavirus aproximadamente. En conclusión, concentraciones menores de 1 ng no fueron suficientes para una buena amplificación, mientras que, concentraciones mayores de 1000 ng inhibieron la reacción enzimática. **Fig. 6.2**

PRIMERA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE PCR (dsRNA-cDNA). Para la primera amplificación se realizaron en el mismo tubo de reacción la transcripción reversa y la amplificación por PCR utilizando la misma solución reguladora para ambas reacciones. Asimismo, se requirió de la presencia de Mg²⁺ 1.5 mM para la actividad óptima tanto para la transcriptasa reversa como de la Taq-polimerasa **Fig. 6.3**. Por otra parte se requirió 5 µl de la extracción de RNA total necesaria para la amplificación observándose un fragmento nítido de 1062 pb característico del grupo A de rotavirus.

Cabe señalar, que en esta reacción se adicionó DMSO a una concentración final del 7% misma que permitió una completa desnaturalización del genoma y una menor cantidad de RNA molde en la amplificación logrando obtener una mayor sensibilidad de la técnica. **Fig. 6.3.**

De un total de 100 muestras analizadas en la determinación de grupo; 100 (100%) amplificaron un producto de 1062 pb correspondiente al grupo A de rotavirus. **Fig. 6.4.** Por otra parte, se estandarizó la RT-PCR para la determinación de RVHC en 7 muestras las cuales amplificaron un producto de 356 pb, perteneciente al grupo C de rotavirus. **Fig. 6. 5 y Gráfica 6.1**

SEGUNDA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE PCR. (cDNA-dsDNA). Esta metodología se realizó para la serotipificación a VP7 de rotavirus a los serotipos 1,2,3,4, de rotavirus del grupo A. Para ello se requirió de una mezcla de reacción con los cuatro oligonucleótidos -aBT1, aCT2, aET3 y aDT4- los cuales fueron adicionados a la mezcla de reacción con el oligonucleótido común RVG-9, en la reacción de amplificación; demostrando un alineamiento específico de los oligonucleótidos al DNA blanco correspondiente al serotipo y observándose fragmentos de diferente peso molecular que van de 374-749 pb correspondientes a cada uno de los serotipos. **Fig.6.6**

Los resultados mostraron que de 100 muestras positivas al grupo A, 45 (45%) fueron serotipo 1, 15 (15. %) a serotipo 2, 35 (35%) al serotipo 3 y 5 (5%) no pudieron ser clasificadas a ningún serotipo. Cabe señalar que ninguna de las muestras en estudio correspondió al serotipo 4. **Gráfica 6.2.**

ANALISIS DEL BROTE POR ROTAVIRUS EN TAMAULIPAS. De un total 259 muestras clínicas de niños con gastroenteritis aguda enviadas al INDRE durante el brote, sólo 194 (74.9%) fueron positivas a rotavirus por la técnica de rotaforesis y 65 (25.09%) negativas. Por otra parte, se observó que en Cd. Victoria 26.27%, Matamoros 20.74% Tampico 16.86% se presentaron el mayor número de infecciones por rotavirus a diferencia de lo que aconteció en las entidades de Reynosa, San Fernando y Cd. Mante donde se registraron el menor número de infecciones por este agente viral.

El análisis de electroferotipos mediante PAGE al 10%, reveló que de las 194 muestras positivas a rotavirus se encontró el 72 % electroferotipos "largos" y el 28% electroferotipos "cortos". En este mismo estudio se determinó la presencia de electroferotipos "supercortos" y "superlargos", los cuales han sido reportados en otros trabajos de epidemiología de rotavirus, señalando de manera importante la presencia de estos electroferotipos. En este estudio se resalta la gran diversidad de electroferotipos que se encontraron durante el brote y la alta frecuencia del serotipo 2 a diferencia de lo que se reporta en otros trabajos, hace inferir que la circulación de los diferentes serotipos y electroferotipos en una misma entidad geográfica permitió que se presentara un brote diarreico por rotavirus de gran magnitud y severidad . **Fig.6.7**

Las manifestaciones clínicas más importantes que caracterizaron la infección por rotavirus se determinaron mediante las Encuestas Centinelas de Diarreas de la Secretaría de Salubridad que se registraron en el momento de la toma de muestra. En este periodo los pacientes presentaron diarrea aguda (100%), vómito (78.71%), fiebre de 37-39°C (59.21%) y deshidratación (51.97%) así como algunas otras manifestaciones clínicas tales como shock hipovolémico (7.85%), náuseas (6.27%) y dolor abdominal (5.88%) en un menor número de pacientes.

Por otra parte, el grupo de edad más afectado en la infección por rotavirus se presentó en los niños de 7-12 meses de edad (50.67%) de 0-6 meses (25.0%), 19-24 meses (12.83%), de 13-18 meses (9.45%) y mayor de 24 meses 2%.

En el periodo de estudio, el serotipo que más predominó fue el G1 (45%), seguido del G3 (35%) y G2 (15%) sin reportar en este brote el serotipo 4. Los serotipos que se determinaron en cada una de las entidades en orden de frecuencia fueron las siguientes: en Cd. Victoria G1, G3, y G2; en Tampico G3, G1 y G2; en Matamoros G1, G3 y G2, en Reynosa predominaron G1 y G3. **Gráfica 6.3. Tabla 6.1 y Figura 6.8**

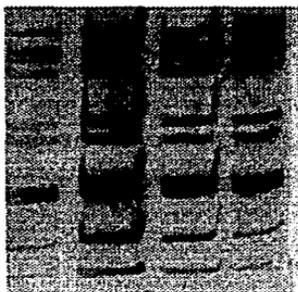
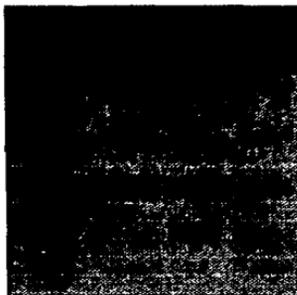
A. Fenol-cloroformo-ISTG**B. CF-11**

FIG. 6.1 A. GEL DE POLIACRILAMIDA AL 10% TENIDO CON AgNO_3 , CARRILES 1-4 EXTRACTO DE RNA VIRAL UTILIZANDO FENOL CLOROFORMO-ISTG, B. GEL DE POLIACRILAMIDA AL 10% TENIDO CON AgNO_3 , CARRILES 1-4 EXTRACTO DE RNA VIRAL UTILIZANDO CF-11

Método	Concentración de RNA ng/ul	% Pureza	Presencia de Proteínas ng/ml
Extracción fen/clor/ISTG	683	58-86	0-0.2
Purificación CF-11	309	88-100	0

TABLA 6.1 CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PUREZA DEL RNA VIRAL

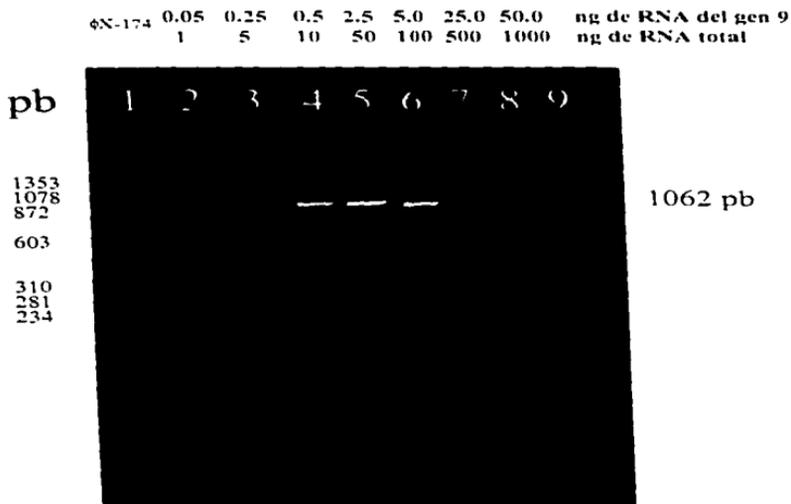


FIG 6.2. GEL DE AGAROSA AL 2% TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE RNA PARA LA PRIMERA AMPLIFICACIÓN. EL RANGO DE CONCENTRACIÓN DEL GÉNOMA VIRAL ES DESDE 1 A 1000 ng . LA MEJOR CONCENTRACIÓN ES DE 5 A 500 ng DE RNA TOTAL POR REACCIÓN.

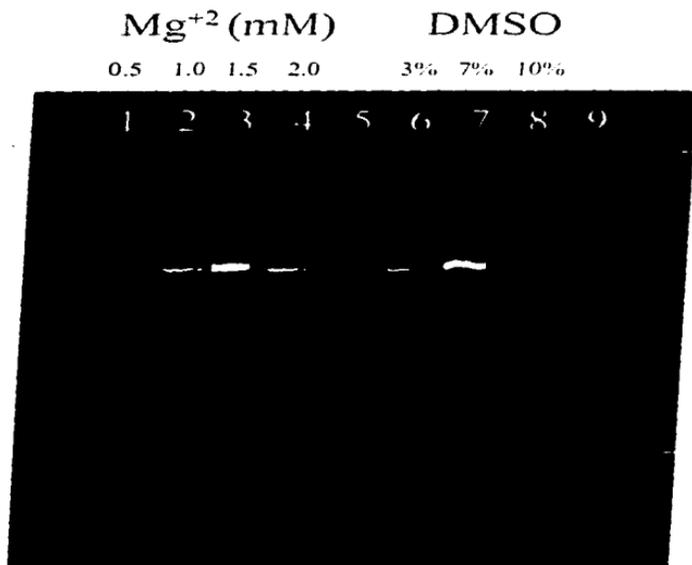


FIG 6.3. GEL DE AGAROSA TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION ÓPTIMA DE Mg²⁺ Y DMSO PARA LA PRIMERA AMPLIFICACIÓN.

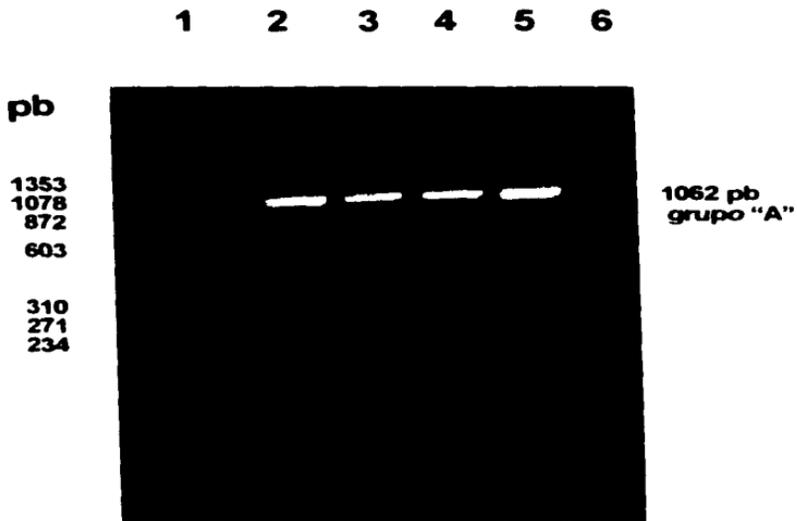


FIG 6 4. GEL DE AGAROSA TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO. DETERMINACIÓN DE ROTAVIRUS DE GRUPO A POR PCR. CARRIL 1 MARCADOR DE PESO MOLECULAR (bX-174-Hae III, CARRILES 2,3,4, Y 5 FRAGMENTO DE 1062 pb CORRESPONDIENTES A GRUPO A DE ROTAVIRUS.

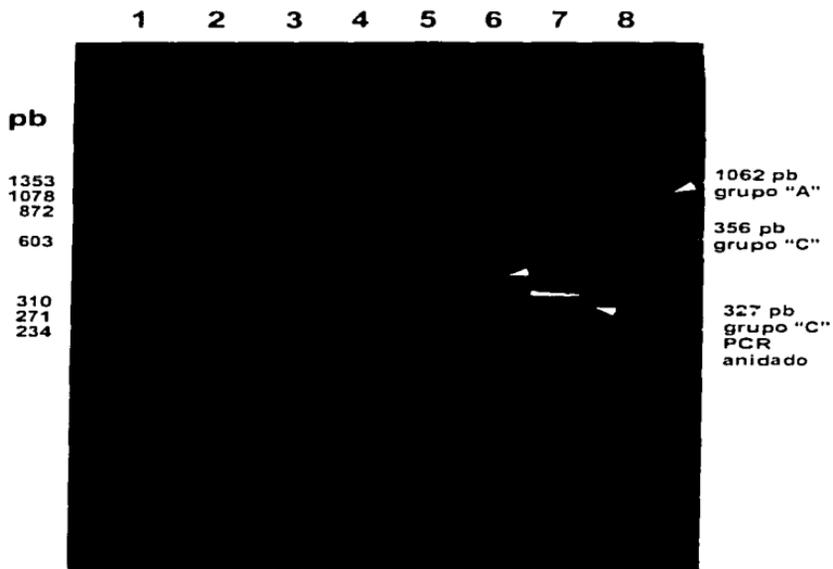
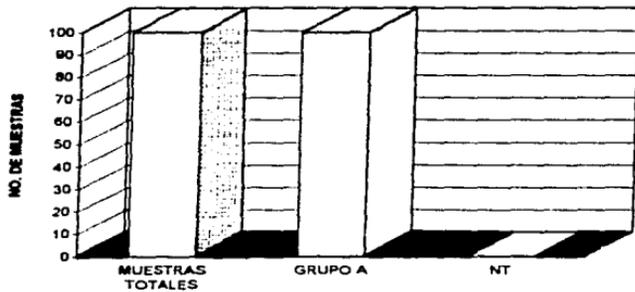


FIG 6.5 GEL DE AGAROSA AL 2% TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO. CARRIL 1, MARCADOR DE PESO MOLECULAR Φ X-174-Hae III; CARRILES 2-6 FRAGMENTO DE 356 pb CORRESPONDIENTE A GRUPO C, CARRIL 7 FRAGMENTO DE 327 pb, CORRESPONDIENTE A PCR ANIDADO DE GRUPO C.



NT: NO TIFICABLES

GRAFICA 6.1. DETERMINACIÓN DE GRUPO A

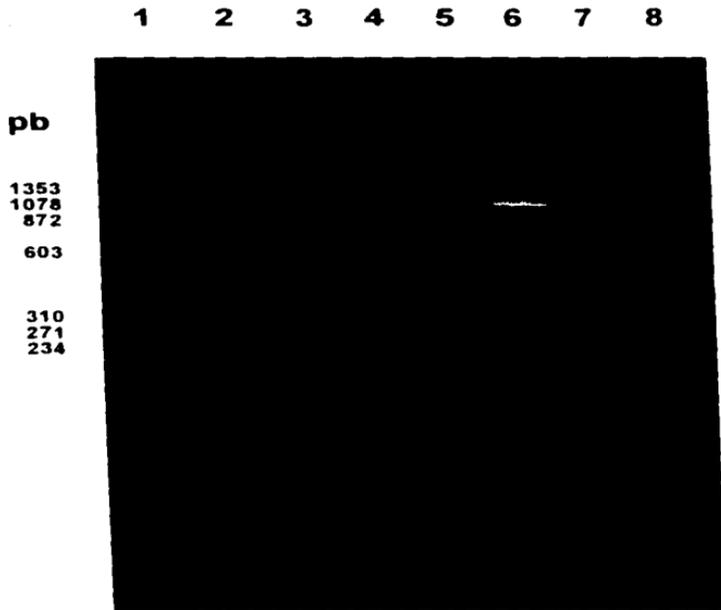
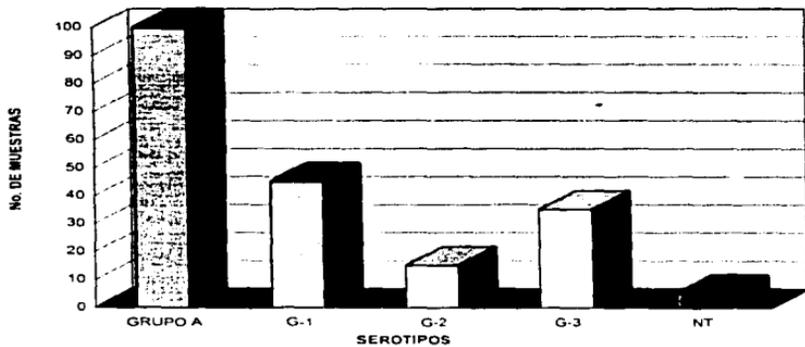


FIG 6.6. GEL DE AGAROSA AL 2% TIÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO. CARRIL 1, MARCADOR DE PESO MOLECULAR ϕ X-174 Hae III, CARRIL 2 SEROTIPO G1 (749 pb), CARRIL 3 SEROTIPO G2 (652 pb), CARRIL 4 SEROTIPO G3 (374 pb), CARRIL 5 SEROTIPO G4 (583 pb), CIPÁ PROTOTIPO, CARRIL 6 RGA (1062 pb), CARRIL 7 RGA (257 pb) PCR ANIDADO



GRAFICA 6.2. DETERMINACION DE SEROTIPOS G DE ROTAVIRUS EN TAMAULIPAS

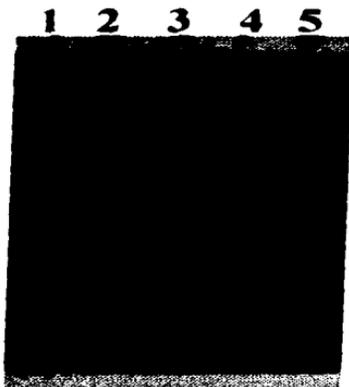
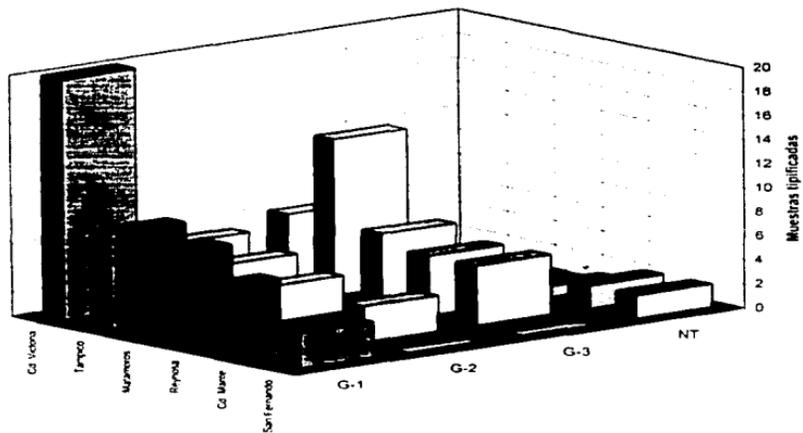


FIG 67. GEL DE POLIACRILAMIDA AL 10% TEÑIDO CON AgNO₃, CARRIL 1 ELECTROFEROTIPO "LARGO" ; CARRILES 3 Y 5 ELECTROFEROTIPO "SUPERLARGO", CARRIL 2 ELECTROFEROTIPO "CORTO", CARRIL 4 ELECTROFEROTIPO "SUPERCORTO"



GRAFICA 6.3.SEROTIPOS G PREDOMINANTES EN LOS MUNICIPIOS DE TAMAULIPAS EN EL BROTE POR ROTAVIRUS.

Entidad	G-1	G-2	G-3	NT	TOTAL
Cd. Victoria	20	5	6	0	31
Tampico	8	4	13	0	25
Matamoros	7	3	6	0	16
Reynosa	5	0	5	1	11
Cd. Mante	2	3	5	2	12
San Fernando	3	0	0	2	5
	45	15	35	5	100

TABLA 6.1 . CIRCULACIÓN DE SEROTIPOS G EN LOS MUNICIPIOS DE TAMAULIPAS

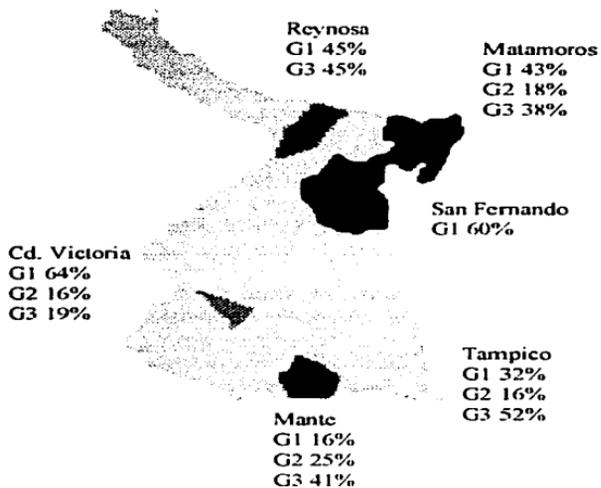


FIG. 6.8. MUNICIPIOS QUE CONFORMAN EL ESTADO DE TAMAULIPAS.

7. DISCUSION

La RT-PCR utilizando el gen 9 (Grupo A) o gen 6 (Grupo C) permitió la tipificación de las cepas involucradas en un brote de gastroenteritis aguda en la población infantil de Tamaulipas. Esta metodología es una herramienta de biología molecular de gran importancia en el estudio de la epidemiología de rotavirus, la cual nos permite conocer los diferentes grupos y serotipos que circulan en nuestro país .

Es importante señalar que para la estandarización de la RT-PCR en la determinación de grupo y serotipo de rotavirus se requieren de estrictas condiciones para su realización. En nuestra experiencia, una de las más importantes fue obtener RNA viral libre de inhibidores para realizar una óptima amplificación. Asimismo, fue necesaria la estandarización de una técnica de extracción de RNA con fenol-cloroformo-ISTG y un paso adicional para la purificación del genoma con CF-11 debido a que en la materia fecal se encuentran sustancias inhibitorias como polisacáridos, lípidos, proteínas, etc; las cuales son de difícil eliminación por los métodos convencionales y pueden interferir principalmente en la primera reacción de amplificación disminuyendo la actividad enzimática de la transcriptasa reversa.

La extracción de RNA a partir de cultivos celulares infectados, suero u otros fluidos biológicos es suficiente con la solución de ISTG conocida comercialmente como trizol ya que es un potente eliminador de RNAsas y de algunas sustancias inhibitorias para lograr una óptima amplificación de ácidos nucleicos. Sin embargo, la purificación de RNA viral por CF-11 es recomendada para obtener una mayor pureza de los ácidos nucleicos cuando se requiere de la detección de agentes patógenos presentes en aguas residuales y materia fecal como fue en este estudio.

Para la optimización de la primera reacción de amplificación de la RT-PCR, la concentración de RNA molde, presencia de DMSO al 7% y magnesio al 1.5 mM fueron factores críticos y constantes para la estandarización de esta metodología a partir de materia fecal. Una de las mayores ventajas de ésta metodología fue la retrotranscripción y amplificación en un sólo tubo de reacción lo que nos permitió disminuir tiempo y costo a diferencia de otros estudios que realizan cada reacción por separado; asimismo, las dificultades que se presentan para amplificar fragmentos mayores de 1000 pb., como lo fue en el caso de la amplificación del segmento para el grupo A de rotavirus que correspondió a 1062 pb donde se requirió de enzimas que presentaran alta termoestabilidad y actividad enzimática para la amplificación de productos con las características antes mencionadas.

Nuestros resultados mostraron que el proceso de purificación de RNA viral es un paso necesario que permite aumentar el número de muestras amplificadas y obtener una mejor amplificación del producto esperado lo que significa que, la utilización de CF-11 garantiza una mayor calidad de genoma viral requerido en la RT-PCR.

Por otra parte, la concentración óptima de dsRNA viral requerido para la reacción de la primera amplificación fue de 250 pg a 25 ng de RNA total para la observación del producto de 1062 pb perteneciente al grupo A el cual se mostró con mayor nitidez. De la cantidad total de RNA aproximadamente el 5% corresponde al gen 9 ó gen 6 que se utiliza para amplificación de productos de los grupos A y C respectivamente.²³ Cabe señalar que cantidades menores de 50 ng de RNA molde no son suficientes para amplificar dichos productos y mayores a 500 ng pueden inhibir la reacción enzimática, disminuyendo el rendimiento de los productos amplificados.

Debido a que las cadenas de RNA-RNA mantienen mayor fuerza de unión en comparación con las cadenas DNA-DNA o DNA-RNA, fue necesario la presencia de DMSO al 7% como desestabilizador de ácidos nucleicos y la previa desnaturalización a 97°C durante 5 minutos permitió la separación completa de las cadenas RNA-RNA y por lo tanto el alineamiento de los oligonucleótidos a las cadenas de DNA molde. También es importante mencionar que la adición de DMSO al 7% requiere de menor cantidad de RNA molde en la reacción de amplificación del gen 9 desde nanogramos, a diferencia de lo que acontece en ausencia de DMSO donde se requiere mayores concentraciones de RNA para su amplificación.

Cabe mencionar, que en nuestro caso la presencia de magnesio 1.5 mM fue requerida tanto para la primera como para la segunda reacción de amplificación simplificando aún más nuestra metodología con la adición de ambas enzimas en la misma solución reguladora en un sólo tubo de reacción.

Por otra parte, la segunda amplificación de PCR presentó menores dificultades que la primera reacción, ya que se trabajó con DNA omitiendo el paso de retrotranscripción cuya enzima es susceptible a una gran cantidad de inhibidores de la reacción y los fragmentos amplificados son de menor peso molecular. La presencia de DMSO al 7% en la segunda reacción aunque no fue necesario, permitió aumentar la sensibilidad de esta metodología para la determinación de serotipo, al requerir menor cantidad de DNA para su amplificación. Esta misma reacción fue específica para cada uno de los serotipos, observándose un sólo fragmento correspondiente a alguno de ellos.

Aún cuando el principal objetivo de este trabajo, fue estandarizar las condiciones necesarias para RT-PCR de rotavirus grupo A, se presentó la oportunidad de estandarizar las condiciones de RT-PCR para grupo C con oligonucleótidos específicos C-1/C-3 del gen 6. Para la determinación de este grupo, se realizaron las mismas condiciones de extracción, purificación y estandarización para la primera reacción de amplificación mencionadas anteriormente, observándose un fragmento de 357 pb. Por lo que una vez estandarizada la técnica de RT-PCR para la tipificación de rotavirus es posible aplicarla en cualquier estudio de epidemiología molecular de rotavirus.

El perfil electroforético característico del grupo C de acuerdo a la bibliografía y el grupo de edad afectado permitió inferir en un posible grupo de rotavirus diferente al grupo A, y se determinó cuando se amplificó un producto de 357 pb con los oligonucleótidos C-1/C-3, posteriormente se realizó una segunda amplificación utilizando los oligonucleótidos C-1/C-4 cuyo producto fue de 327 pb útil para la comprobación de grupo C. Las mismas muestras se sometieron a PCR con los oligonucleótidos de grupo A no amplificándose ningún producto, comprobándose así la presencia de grupo C en nuestro país.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las diferentes jurisdicciones del Estado de Tamaulipas predominó el serotipo 1 (45%) y serotipo 3 (35%), correspondiendo con la literatura. El serotipo 2 (15%) se encontró con menor frecuencia y el serotipo 4 no fue reportado en el Estado.

En este trabajo, circularon los serotipos 1, 2 y 3, sin embargo, los serotipos 4, 8 y 9 no se detectaron, probablemente se presenten en los próximos años. Por otra parte, existe la posibilidad de que aparezcan serotipos nuevos, debido a los rearrreglos genéticos que puede presentar el genoma de rotavirus y a la introducción de cepas nuevas procedentes de otras regiones geográficas.

La rotaforesis fue una metodología empleada como prueba tamiz, la cual nos permitió diferenciar la presencia de electroferotipos pertenecientes a otros grupos de rotavirus. El perfil electroforético de grupo C presenta el triplete característico de los segmentos 5, 6 y 7 en el segundo bloque a diferencia del perfil de rotavirus del grupo A que muestra sólo los segmentos 5 y 6 en este mismo bloque.

El brote analizado en 1995 en Tamaulipas fue de gran relevancia por lo que se trató de tipificar la mayoría de las cepas para conocer el panorama general de los serotipos que se presentaron con mayor frecuencia.

Finalmente la prevalencia de un electroferotipo por un periodo de tiempo no implica necesariamente que la cepa sea la misma, ya que posiblemente son mutaciones puntuales sucesivas que no afectan la migración electroforética correspondiente. También se encontraron algunos casos esporádicos de cepas del mismo electroferotipo con distinto serotipo.

8. CONCLUSIONES

Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR se han desarrollado para la detección específica de pequeñas cantidades de material genético de patógenos a partir de muestras clínicas. Por lo tanto, la sensibilidad que presenta esta metodología ha permitido ampliamente su aplicación como una herramienta del laboratorio para el diagnóstico de agentes infecciosos, estudios epidemiológicos de la transmisión de enfermedades, así como en infecciones virales las cuales presentan grandes dificultades para su identificación, aislamiento en cultivos celulares y métodos inmunoenzimáticos.

Sin embargo, antes de realizar cualquier método de amplificación de ácidos nucleicos, es de importancia considerar el tipo de muestra clínica (gastrointestinal, contenido intestinal, secreción respiratoria, orina, suero y heces), dado que existen numerosos factores en los fluidos biológicos a partir de los cuales se realiza la extracción del genoma de patógenos, los cuales pueden degradar a los ácidos nucleicos o presentar sustancias que inhiban la reacción de amplificación, especialmente en la actividad enzimática de la transcriptasa reversa (RT) que realiza la reacción RNA-cDNA y la Taq polimerasa en la amplificación. Generalmente estas dificultades afectan de manera particular en el desarrollo de métodos para la detección de virus RNA, debido a que el RNA es más inestable en solución que el DNA.

La naturaleza de la doble cadena de RNA de rotavirus también constituye un factor más en la disminución de la eficiencia de la reacción de RT, por requerir de condiciones más drásticas para la completa desnaturalización de las cadenas RNA molde.

Existen numerosas técnicas de extracción y purificación de ácidos nucleicos a partir de fluidos biológicos que han sido descritas en la literatura. No obstante, la mayoría de ellas han fracasado en la eliminación completa de sustancias que inhiben la actividad enzimática en la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos, donde el mayor problema de inhibición se presenta antes de la conversión catalizada por la RT del RNA a cDNA, paso crítico y determinante de la PCR. Además de ser una de las limitaciones más significativas en la detección de virus RNA en muestras fecales.

Actualmente, en la literatura se han descrito un sin número de métodos para la eliminación de sustancias con actividad inhibitoria a partir de muestras fecales en humanos. Algunos de estos son la precipitación y métodos cromatográficos, los

cuales se han ensayado con mayor frecuencia sin tener éxito alguno en la eliminación de impurezas presentes en las heces. En nuestra experiencia, utilizamos la PCR para la amplificación de Grupo y Serotipos de rotavirus descrita por Gouvea y col. 1990 y un paso adicional para la purificación de RNA viral con CF-11 desarrollada por Wilde y col. 1990, lo que permitió remover los inhibidores presentes y tipificar 100% de las cepas analizadas en este trabajo, aumentando la sensibilidad y especificidad de la RT-PCR para la tipificación e identificación de rotavirus a partir de materia fecal. Estos resultados muestran que las sustancias inhibitorias pueden ser removidas de muestras fecales bajo condiciones iónicas apropiadas incrementando de manera importante la sensibilidad de la PCR o de algunas otras técnicas de amplificación para la detección del RNA rotaviral.

Cabe señalar que para la estandarización de ésta metodología fue determinante la elección de la técnica de extracción de RNA viral a partir de muestra clínica, concentración de RNA molde, eliminación de inhibidores de la reacción y DMSO. La aplicación de RT-PCR en la tipificación de rotavirus a partir de heces, fue de gran utilidad en aquellas muestras insuficientes (100 µl), sin importar la viabilidad o alteración morfológica de este agente viral.

Los resultados obtenidos en este trabajo para la tipificación de rotavirus son similares a los que se han reportado en la literatura, donde se ha destacado la aplicación de esta metodología en la determinación de grupo, serotipos, y estudios de genotipificación a VP4 lo que ha permitido tener un mejor panorama de la epidemiología y biología molecular de los rotavirus, lo cuales destacan como principales agentes etiológicos de la gastroenteritis aguda en la población infantil en todo el mundo.

En nuestra experiencia, la RT-PCR nos permitió determinar de manera rápida y específica la circulación de los serotipos responsables del brote por rotavirus en Tamaulipas. Por lo tanto, sugerimos la realización del estudio microbiológico y la búsqueda de rotavirus en niños con gastroenteritis aguda.

9.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Jiménez CA. Mortalidad por diarreas en México. Boletín de epidemiología, Enero 14 1996; 13: 1-2.
- 2.- Ho MS, Glass RI, Pinsky F and Anderson LS. Rotavirus as cause of diarrheal morbidity and mortality in the United States. J Infect Dis 1988; 158: 1112-1116.
- 3.- Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Shang Ho M. Global seasonality of rotavirus infections. Who Bull. 1990; 68: 171-177.
- 4.- Bern C, Unicomb L, Gentsch JR et al. Rotavirus diarrhea in Bangladeshi children: Correlation of disease severity with serotypes. J Clin Microbiol 1992; 30: 3234-3238.
- 5.- Puerto-Solis M, Puerto F, Polanco GG and González MR. Aspectos generales de rotavirus. Rev Biomed 1993 ; 4: 129-140.
- 6.- Pereira HG, Linhares AC, Candeias JAN y Glass RI. Vigilancia de los virus de la gastroenteritis en los laboratorios nacionales del Brasil. Bol of Sanit Panam 1994; 76: 27-36.
- 7.- Soler SS. Rotavirus. En: Giono Cs, Escobar GA y Valdespino GJL. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México, D.F: Secretaria de Salud; 1994: 157-172.
- 8.- Estes MK. Rotavirus and their Replication. En: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM et al. Fundamental Virology, Philadelphia: Raven Publishers 1996; 2: 731-761.
- 9.- Perea PJE, Araiza J, Campos J y col. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Barcelona España: Ediciones Doyma, 1992: Vol II: 881-884.
- 10.- Estes MK and Cohen J. Rotavirus gene structure and function. Microbiol Rew 1989; 53: 410-449.
- 11.- Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR and Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. J Clin Microbiol 1982; 16: 473-477.

12.- Courbot G, Beraud AM; Beards GM and col. Subgroup, serotypes and electropherotypes of rotavirus isolated from children in Bangui, Central African Republic. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 668-671.

13.- Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus vaccine development for the prevention of severe diarrhea in infants and young children. *Trends in Microbiol* 1994; 2: 242-249.

14.- Labbé M, Charpilienne A, Crawford SE, Estes MK and Cohen J. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *J of Virol* 1991; 65: 2946-2952.

15.- Gorziglia M, Larralde G, Kapikian AZ, and Chanock RM. Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7155-7159.

16.- Hussein HA, Parwani AV, Rosen BI, Lucchelli A and Saif LJ: detection of rotavirus serotypes G1, G2, G3 and G11 in feces of diarrheic calves by using polymerase chain reaction derived cDNA probes. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2491-2496.

17.- López S, Padilla-Noriega L y Arias CF. Correlación entre serotipo y electroferotipo de rotavirus aislados en dos poblaciones de México. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1993; 50:736-740.

18.- Shaw AL, Rothnagel R, Chen D et al. Three dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell* 1993, 74:693-701.

19.- Maass and Atkinson PH. Rotavirus proteins VP7, NS28 and VP4 form oligomeric structures. *J of Virol* 1990; 64: 2632-2641.

20.- Bass DM, Mackow ER and Greenberg HB. NS35 and not VP7 is the soluble rotavirus protein which binds to target cells. *J of Virol* 1990; 64: 322-330.

21.- Hua J, Chen X and Patton JT. Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding. *J of Virol* 1994; 68: 3990-4000.

22.- Mattion NM, Cohen J; Aponte C and Estes MK. Characterization of oligomerization domain and RNA-binding properties and rotavirus non structural protein NS34. *Virology* 1992; 190: 68-83.

23.- Gouvea V, Glass RI, Woods P et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 276-282.

24.- Gouvea V and Glass RI. Polymerase chain reaction detection and typing of rotavirus in fecal specimens. En: Becker and Dorai G. *Diagnosis of human virus by polymerase chain reaction technology*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1992: 445-453.

25.- Jiang B, Denny PH, Spangenberg S, Gentsch JR and Glass RI. First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. *J Infect Dis* 1995; 172: 45-50.

26.- Pedley S, Bridger JC, Chasey D and McCrae MA. Definition of two new groups of atypical rotaviruses. *J Gen Virol* 1986; 67: 131-137.

27.- Gouvea V, Brantly M. Is rotavirus a population of reassortants? *Trends in Microbiol* 1995; 3: 159-162.

28.- Bingman F, Unicomb LE, Guantli T and col. Cultivation and characterization of novel human group A rotavirus with long RNA electropherotypes, subgroup II specificities, and serotype 2 VP7 genes. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2224-2227.

29.- Padilla-Noriega L, Arias CF, Lopez S and col. Diversity of rotavirus serotypes in Mexican infants with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1114-1119.

30.- Puerto FI, Polanco Marín GG, Puerto-Solís R y col. Diarrea infantil aguda por rotavirus en una población pediátrica de Mérida Yucatán, México. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1989; 46: 171-173.

31.- Ward RL, Clemens JD, Sack DA and col. Culture adaptation and characterization of group A rotavirus causing diarrheal illnesses in Bangladesh from 1985 to 1986. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 9115-9123.

- 32.- LeBaron CW, Lew J, Glass RI, Weber JM, Ruiz-Palacios GM. Annual rotavirus epidemic patterns in North America. *JAMA* 1990; 264: 983-988.
- 33.- Espejo RT, Calderón E, González N, Salomón A, Martuscelli A and Romero P. Presence of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in México City, 1977. *The J of Infec Dis* 1979; 139: 474-477.
- 34.- Saif LJ. Nongroup A rotaviruses. In: Saif LJ and Theil KW. *Viral diarrheas of man and animals*. Boca Raton, Fla: Press Inc, 1980.
- 35.- Eiden JJ, Wilde J, Firoozmand F and Yolken R. Detection of animal and human group B rotaviruses in fecal specimens by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 539-543.
- 36.- Gouvea V, Allen JR, Glass RI and col. Detection of group B and C rotavirus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 519-523.
- 37.- Rodger SM, Bishop RF and Holmes IH. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. *J Clin Microbiol* 1982; 16:724-726.
- 38.- Saif LJ, Terrett LA, Miller KL and Croos RF. Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) in a continuous cell line and characterization of the passaged virus. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1277-1282.
- 39.- Fujii R, Kuzuya M, Hamano M, Yamada M and Yamazaki S. Detection of human group C rotaviruses by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1307-1311.
- 40.- Peñaranda ME, Cubitt WD, Sinarachatanant P et al. Group C rotavirus infections in patients with diarrhea in Thailand, Nepal and England. *J of Infec Dis* 1989; 160: 392-397.
- 41.- Greenberg HB, McAuliffe V, Valdesuso J. Serological analysis of the subgroup antigen of rotavirus using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1983; 30: 91-99.

42.- Noel JS, Beards GM, Cubbitt WD. Epidemiological survey of human rotavirus serotypes and electropherotypes in young children admitted to two childrens hospitals in Northeast London from 1984 to 1990. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2213-2219.

43.- Ward RL, Knowlton DR, Greenberg HB, Schiff GM and Bernstein DI. Serum-neutralizing antibody to VP4 and VP7 proteins in infants following vaccination with WC3 bovine rotavirus. *J of Virol* 1990; 64: 2687-2691.

44.- Woods PA, Gentsch J, Gouvea V et al. Distribution of serotypes of human rotavirus in different population. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 781-785.

45.- Taniguchi K, Urasawa T, Morita Y, Greenber HH, Urasawa S. Direct serotyping of human rotavirus in stools by and enzyme-linked immunosorbent assay using serotypes 1, 2, 3 and 4 specific monoclonal antibodies to VP7. *J Infect Dis* 1987; 155: 1159-1166.

46.- Flores J, Green KY, García D et al. A dot hybridization assay for distinction of human rotavirus serotypes. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 29-34.

47.- Contreras JF, Menchaca GE, Padilla-Noriega L et al. Heterogeinity of Vp4 neutralization epitopes among serotype P1A human rotavirus strains. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 506-508.

48.- Arias CF, López S, Mascarenhas JDA. Neutralizing antibody immune response in children with primary and secondary rotavirus infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994; 1: 89-94.

49.- Georges CM, Beraud AM, Beards GM, and col. Subgroup, serotypes and electropherotypes of rotavirus isolated from children in Bangui Cental African Republic. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 668-671.

50.- Taniguchi K, Wakasugi F, Pangsuwanna Y et al. Identification of human and bovine rotavirus serotypes by polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 1992; 109 303-312.

51.- Hoshino Y, Sereno MM, Midthun K, Flores J, Kapikian AZ, Chanock RM. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 8701-8704.

52.- Taylor GR, Quirke P and McPherson MJ. PCR a practical approach. Estados Unidos: Oxford University Press, New York, 1992:1-49.

53.- Peter JB. The polymerase chain reaction: amplifying our options. *Rev of Infec Dis* 1991; 13: 166-171.

54.- Oste Ch. Polimerase chain reaction. Product application focus, Perkin-Elmer Cetus Instruments. United States.

55.-Gouvea V. PCR detection of rotavirus. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC and White JT. *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington DC: American Society Microbiology; 1993; 2:383-387.

56.- PCR techniques workshop daily schedule (Offsite). Life technologies, Inc. Training center manual.

57.- PCR applications manual. Boehringer Mannheim. Germany; 1985.

58.- Wilde J, Eiden J and Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1300-1307.

59.- Sambrook J, Fritsch EF and Manniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cool Spring Harbor, New York, 1989.

60.- Nakagomi O, Oyamada H and Nakagomi T. Experience with serotyping rotavirus strains by reverse transcription and two-step polymerase chain reaction with generic and type-specific primers. *Molec and Cell Prob* 1991; 5: 285-289.

61.- Gensch JR, Glass RI, Woods P et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1365-1373.

62.- Ushijima H, Xin Kq, Nishimura S, Morikawa S and Abe T. Detection and sequencing of rotavirus VP7 gene from human materials (stools, sera, cerebrospinal fluids, and throat swabs) by reverse transcription and PCR: *J Clin Microbiol* 1994; 22: 2893-2897.

63.- Atlas RM and Bej AK. Polymerase chain reaction. En: Gerhardt P, Murray RGE and Wood WA. *Methods for general and molecular bacteriology*; Washington DC: American Society for Microbiology, 1994: 418-423.

64.- Erlich HA. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. Estados Unidos de America: Editorial Stockton Press, 1989: Y: 1-57.

65.- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim PME and Noordza JV. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 1990; 28: 495-503.

66.- Shieh SC, Wait DL and Sbsey MD. Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. J Virol Meth 1995; 54: 51-66.

67.- Chomczynski P and Scchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162: 156-159.

68.-Simms D, Cizdziel PE and Chmczynski P. Trizol a new reagentfor optimal single-step isolation of RNA. Focus 15. Tools.

69.- Hale AD, Green J and Brown DWG. Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. J Virol Met1996; 57: 195-201.

70.- Huesca CM, Echániz AG, Figueroa AP y Calderón JE. Amplificación y detección de DNA y RNA y su aplicación al diagnóstico de enfermedades infecciosas. Infectologia 1990; 10: 273-278.

64.- Erlich HA. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. Estados Unidos de America: Editorial Stockton Press, 1989: Y: 1-57.

65.- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim PME and Noordaa JV. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 1990; 28: 495-503.

66.- Shieh SC, Wait DL and Sbsey MD. Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. J Virol Meth 1995; 54: 51-66.

67.- Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162: 156-159.

68.- Simms D, Cizdziel PE and Chmczynski P. Trizol a new reagent for optimal single-step isolation of RNA. Focus 15. Tools.

69.- Hale AD, Green J and Brown DWG. Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. J Virol Met 1996; 57: 195-201.

70.- Huesca CM, Echániz AG, Figueroa AP y Calderón JE. Amplificación y detección de DNA y RNA y su aplicación al diagnóstico de enfermedades infecciosas. Infectología 1990; 10: 273-278.

" Los perdedores se asocian y son tantos que parecen todos, pero los ganadores también existen e igual tienden a asociarse... búscalos "