

10  
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

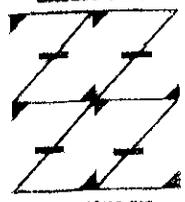
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

DETECCION DE ROTAVIRUS GRUPO C EN  
PREESCOLARES Y ADOLESCENTES CON  
GASTROENTERITIS AGUDA.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
BENITA DIAZ DE JESUS

DIRECTORA DE TESIS: QBP. HERLINDA GARCIA LOZANO.  
ASESOR: DR. HIRAM OLIVERA DIAZ.

UNAM  
FES  
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

267687



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



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):

**DIAZ DE JESUS BENITA**

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: DETECCION DE ROTAVIRUS GRUPO C EN PREESCOLARES Y ADOLESCENTES CON GASTROENTERITIS AGUDA.

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

PRESIDENTE	Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCIA
VOCAL	Q.B.P. HERLINDA GARCIA LOZANO
SECRETARIO	DR. HIRAM OLIVERA DIAZ
SUPLENTE	Q.F.B. HUGO LEYNEZ CELISEO
SUPLENTE	Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZALEZ MELENDEZ

ATENTAMENTE.  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
México, D.F. a, 2 de Septiembre de 1998.

Q.F.B. JOSE LUIS ALFREDO MORA GUEVARA  
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p Departamento de Control de Egresados  
c c p. Interesado

# DEDICATORIAS

A mis padres: **APOLINAR DÍAZ Y SIRIA DE JESÚS.**

Por mi oportunidad de existir, por su gran cariño, comprensión y sobre todo por sus sacrificios realizados, porque sin ustedes no hubiera sido posible la culminación de mi profesión. Por todo esto y más **GRACIAS.**

A mi hermana: **BERTINA**

Por ser una gran compañera y amiga, además de ser una persona a la que admiro y respeto.

A mis tíos y primos que siempre me han brindado su apoyo.

A la QBP. **HERLINDA GARCÍA LOZANO**

Con respeto y agradecimiento. Por su apoyo y asesoramiento en la realización de este trabajo y por todas las oportunidades brindadas.

**A MARTÍN MELO MUNGUÍA**

Por tu amistad, comprensión, apoyo incondicional y por el valioso tiempo dedicado para la culminación de este trabajo.

# AGRADECIMIENTOS

**A mis amigos de la FES-Zaragoza:**

Beto, Poncho, Elizabeth, Chela, Sandra, Eli, Pablo, Fernando, Yedi, Pancho<sup>†</sup>, May, Rafael, Jorge y Ana, por su amistad incondicional y por compartir con ustedes momentos de tristeza y alegría.

**A mis compañeros del Laboratorio de Rotavirus:** Araceli, Ernesto, Elvira, Andrés, Lizbeth, Juanito, Hugo, Yara y Ángel, que de alguna manera contribuyeron en la elaboración de este trabajó.

**A mis sinodales.** Gracias por el tiempo dedicado en la revisión de este trabajo.

**A TODOS GRACIAS**

**DETECCION DE ROTAVIRUS GRUPO C  
EN PREESCOLARES Y ADOLESCENTES  
CON GASTROENTERITIS AGUDA**

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE GRÁFICAS.....	II
LISTA DE TABLAS.....	III
GLOSARIO.....	IV
RESUMEN.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades de los rotavirus del grupo C.....	2
1.1.1. Morfología y Estructura.....	3
1.1.2. Estructura genómica.....	4
1.2. Clasificación de los RGC.....	6
1.2.1. Serotipos.....	6
1.2.2. Electroferotipos.....	7
1.3. Proteínas virales.....	9
1.4. Propiedades fisicoquímicas.....	14
1.5. Propagación <i>in vitro</i> .....	15
1.6. Clínica y patología de la infección por RGC.....	17
1.6.1. Manifestaciones clínicas.....	17
1.6.2. Patología de la infección.....	18
1.7. Epidemiología.....	19
1.8. Método de diagnóstico de los RGC.....	22
1.8.1. Microscopía electrónica.....	22
1.8.2. Inmunomicroscopía electrónica.....	23
1.8.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)..	24

1.8.4. Hibridación de ácidos nucleicos.....	24
1.8.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	25
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo general.....	28
3.2. Objetivos particulares.....	28
4. HIPÓTESIS.....	29
5. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	30
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
6.1. Material.....	31
6.1.1. Material Biológico.....	31
6.1.2. Material de Laboratorio.....	31
6.1.3. Equipo.....	32
6.1.4. Reactivos.....	32
6.1.5. Oligonucleótidos.....	34
6.2. Métodos.....	35
6.2.1. Diagrama de flujo.....	35
6.2.2. Rotaforesis.....	36
6.2.2.1. Extracción del RNA viral a partir de materia fecal.....	36
6.2.2.2. Preparación del gel de poliacrilamida al 5%.....	36
6.2.2.3. Electroforesis.....	37
6.2.2.4. Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata.....	37

6.2.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%.....	38
6.2.3. Purificación de RNA viral por CF-11.....	39
6.2.4. Transcriptasa reversa acoplada a la reacción en Cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	40
6.2.4.1. Determinación de rotavirus grupo C.....	40
6.2.4.2. Observación de los productos de amplificación en geles de agarosa.....	41
7. RESULTADOS.....	43
8. DISCUSIÓN.....	57
9. CONCLUSIONES.....	63
10. APÉNDICE.....	65
11. REFERENCIAS.....	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 1.1.</b> Micrografía electrónica de un cultivo de rotavirus.....	4
<b>Fig. 1.2.</b> Estructura genómica y proteica de RGC.....	5
<b>Fig. 1.3.</b> Electroferotipos I y II de RGC.....	9
<b>Fig. 7.1.</b> Análisis de los electroferotipos de RGC.....	48
<b>Fig. 7.2.</b> Gel de agarosa al 2% con productosde cDNA de RGC.....	49
<b>Fig. 7.3.</b> Distribución geográfica de los rotavirus grupo C.....	56

## LISTA DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 7.1.</b> Análisis global de las frecuencias de RGC y RGA por la técnica de rotaforesis.....	47
<b>Gráfica 7.2.</b> Período estacional de la infección por RGC.....	51
<b>Gráfica 7.3.</b> Manifestaciones clínicas más sobresalientes en la infección por RGC.....	53
<b>Gráfica 7.4.</b> Grupos de edad en los que se presentó la infección por RGC.....	55

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Serotipos de RGC.....	7
<b>Tabla 1.2.</b> Electroferotipos I y II de RGC aisladas de Japón.....	8
<b>Tabla 1.3.</b> Composición comparativa de proteínas de rotavirus grupo A y C.....	11
<b>Tabla 1.4.</b> Pesos moleculares correspondientes a VP7 de las diferentes cepas de RGC.....	13
<b>Tabla 1.5.</b> Distribución mundial de la infección por RGC.....	20
<b>Tabla 7.1.</b> Muestras clínicas analizadas por rotaforesis de diversas entidades de la República Mexicana.....	46
<b>Tabla 7.2.</b> Confirmación de RGC y RGA por RT-PCR.....	50
<b>Tabla 7.3.</b> Frecuencia mensual de la infección por RGC.....	50
<b>Tabla 7.4.</b> Manifestaciones clínicas de la infección por RGC.....	52
<b>Tabla 7.5.</b> Grupos de edad en los que se presentó la infección por RGC.....	54

## GLOSARIO

AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de plata
CF-11	Fibra de celulosa
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfatados
dATP	2'-desoxi-adenosin-5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxi-citosin-5'-trifosfato
dGTP	2'.desoxi-guanosin-5'-trifosfato
dTTP	Timidin-5'-trifosfato
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble cadena
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
IME	Inmunomicroscopía electrónica
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
kDa	Kilodaltones
MA-104	Células de riñón de mono Rhesus

mM	Milimolar
M	Molar
ME	Microscopía electrónica
min	Minutos
Mg <sup>+2</sup>	Ión Magnesio
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
ml	Mililitros
ng	Nanogramos
nmoI	Nanomoles
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PK-15	Células de riñón de cerdo
RGA	Rotavirus grupo A
RGB	Rotavirus grupo B
RGC	Rotavirus grupo C
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsin	Inhibidor de RNAsas
RT	Transcriptasa reversa

RT-PCR	Transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
ST	Células testiculares de cerdo
SDS	Duodecil sulfato de sodio
sol.	Solución
seg.	Segundo
STE	NaCl-EDTA-TRIS-Base
Taq	Taq-polimerasa obtenida de <i>Thermus aquaticus</i>
TEB	Tris-base-Ácido bórico-EDTA
TEMED	Tetrametilendiamina
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VP	Proteína viral
μg	Microgramos
μl	Microlitros
°C	Grados centígrados

## RESUMEN

En este estudio se analizaron un total de 126 muestras fecales de pacientes con gastroenteritis aguda de 4 a 18 años de edad, procedentes de diferentes entidades de la República Mexicana (Tampico, Cd. Victoria, Reynosa, Colima, Monterrey, La Paz, Veracruz, Cancún, Chetumal, Mérida, Saltillo, Chihuahua y Morelia), correspondientes al período Enero 97 a Junio 98.

La técnica de PAGE nos permitió observar el patrón electroforético característico de RGC (4-3-2-2), asimismo, se observó la circulación de 3 electroferotipos diferentes: Tipo I en La Paz (1997); Tipo II Monterrey (1997); y Tipo III en Tampico y Colima (1998). En las entidades restantes no se encontró la circulación de este agente viral. Del total de muestras analizadas por la técnica de RT-PCR se confirmaron 14 positivas a RGC, 18 positivas a RGA, 94 fueron negativas a rotavirus y 2 no fueron confirmadas.

La infección por RGC se observó durante un período estacional de Enero a Mayo, observándose un incremento en los meses de Febrero y Marzo. Las manifestaciones clínicas presentadas durante la infección fueron diarrea líquida menor a 72 hrs (91.66%), dolor abdominal (75%), vómito (66%), deshidratación (25%), temperatura mayor de 38°C (25%) y de 3 a 8 evacuaciones por día.

Los grupos de edad más afectados por RGC fueron los de 4 años (5 casos), 10 años (2 casos) y en menor proporción las edades de 6,8,11,12 y 15 años (con un caso respectivamente).

# 1. INTRODUCCIÓN

Los rotavirus del grupo C (RGC) han sido reconocidos por más de una década como agentes etiológicos productores de gastroenteritis aguda en humanos, la población de mayor riesgo a la infección por este virus son personas mayores de 4 años de edad. En este grupo de edad también se ha determinado la presencia de los RGA asociados con diarrea, aunque con menor frecuencia que los RGC.<sup>1-4</sup>

Los RGC fueron reportados por primera vez por Saif y col. (1980) como agentes etiológicos productores de gastroenteritis en porcinos recién nacidos. Más tarde, Rodger y col. (1982) demostraron la presencia de éste agente viral en humanos con diarrea.<sup>5-9</sup>

Posteriormente, Oseto y col. (1985) detectaron el primer brote esporádico de RGC en niños en la ciudad de Matsuyama, Japón. A partir de 1986 se ha observado un incremento de casos relacionados con este virus en diferentes partes del mundo.<sup>3</sup>

La importancia de RGC como agentes etiológicos de enfermedades diarreicas no ha sido establecida. Sin embargo,

recientemente se ha observado la presencia de este patógeno en diversas partes del mundo. A la fecha, no se conoce el panorama epidemiológico de los RGC en humanos, debido a que no existen reactivos comerciales para su detección. <sup>2,3,10,11</sup>

Por lo que es necesario el desarrollo de métodos adecuados para su diagnóstico que nos permitan implementar programas de vigilancia epidemiológica de la infección por RGC.

### **1.1. GENERALIDADES DE LOS ROTAVIRUS DEL GRUPO C**

Los rotavirus son miembros de la familia *Reoviridae*, su genoma esta compuesto de 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA). Con base en los determinantes antigénicos de la proteína VP6 y perfiles electroforéticos, los rotavirus se han dividido en 7 grupos (A-G), pero solamente los grupos A, B y C se han relacionado con diarrea en humanos y animales. <sup>5,6,9,12-15</sup>

Los rotavirus del grupo A (RGA) son los principales agentes productores de gastroenteritis aguda en niños menores de 3 años de edad en todo el mundo. Mientras que, los rotavirus del grupo B (RGB) se han asociado a brotes diarreicos en adultos en la República

Popular de China. El grupo C (RGC) se ha reportado principalmente como productor de diarrea en preescolares y adolescentes en brotes y casos esporádicos, siendo un problema de salud pública en algunos países como China y Japón <sup>7,8,12,16</sup>

Los RGC son también conocidos como pararotavirus (PaRV), rotavirus no A y rotavirus atípicos. <sup>7,8,12,17-19</sup>

Los rotavirus del grupo C (RGC) son agentes patógenos importantes en cerdos y actualmente se han reportado como productores de diarrea en seres humanos en diversas áreas geográficas tales como Japón, Asia, Australia, Europa, Centroamérica, Sudamérica y Norteamérica; también se han reportado en bovinos y gatos. <sup>6,9,11,12,17,20,21</sup>

### **1.1.1. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA**

La palabra rotavirus proviene del latín "**rota**" que significa rueda ya que por microscopía electrónica se observa la forma circular nítidamente definida de la cápside externa dando la apariencia de una rueda de carreta. <sup>22,23</sup>

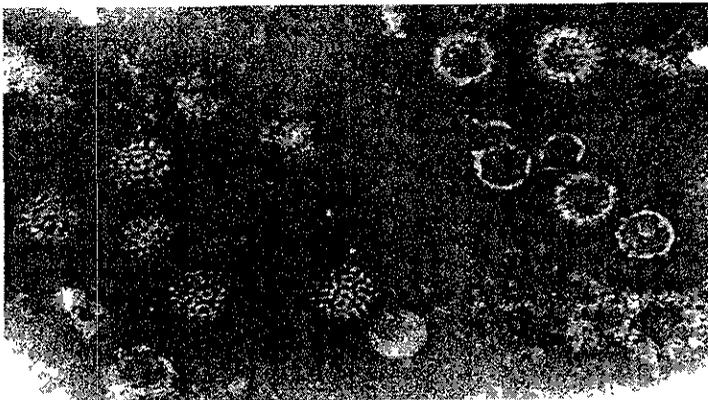
Los RGC son morfológicamente idénticos a los RGA pero genética y antigénicamente diferentes. Estos virus no tienen envoltura

lipídica y sólo las partículas completas con genoma viral en su interior poseen actividad infectante.<sup>23</sup>

Las partículas virales completas miden aproximadamente de 65 a 80 nm de diámetro y presentan tres cápsides proteicas (externa, media e interna). Las partículas sin la cápside externa miden aproximadamente 50 a 65 nm de diámetro, mientras que la nucleocápside es de forma icosaédrica tiene un diámetro de 37 nm.<sup>20,</sup>

23

Estudios de microscopía electrónica (ME) indican que los RGC presentan una simetría icosaédrica con 720 subunidades que forman 240 capsómeros.<sup>20</sup> **Figura 1.1.**



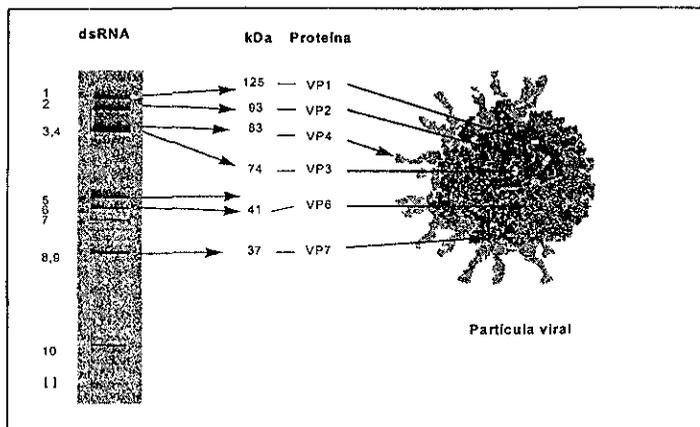
**Fig. 1.1.** Microfotografía electrónica de un cultivo celular infectado con rotavirus.  
Tomada de Carmen Soler, 1993.

## 1.1.2. ESTRUCTURA GENÓMICA

Los RGC poseen un genoma compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) con pesos moleculares que van desde 0.2 a  $2 \times 10^6$  daltons. <sup>6,16,17,20,23</sup>

El genoma de los rotavirus puede ser separado por corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida (PAGE), observándose los 11 segmentos de RNA de distinto peso molecular distribuidos en 4 bloques (I - IV). Los RGC presentan un perfil electroforético característico en la migración de su dsRNA, 4-3-2-2 y cada uno de estos segmentos codifica por lo menos para una proteína. <sup>3,8,9,20</sup>

**Figura 1.2.**



**Fig. 1.2.** Estructura proteica y genómica de Rotavirus grupo C.

Existen diferencias electroforéticas en la migración de los 11 segmentos de RNA entre los RGC y RGA. El perfil genómico de los RGC presenta un triplete característico en el bloque II (segmentos 5,6 y 7) a diferencia de los RGA el cual se encuentra en el bloque III (segmentos 7, 8 y 9), el bloque IV (segmentos 10 y 11) presenta una migración más rápida en los RGC, el bloque I (segmentos 1-4) es similar en ambos grupos.<sup>4,20</sup>

## **1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS RGC.**

### **1.2.1. SEROTIPOS.**

Tsunemitsu y col. (1992) reportaron 6 cepas de RGC, 4 de las cuales fueron de origen porcino (cepa: Cowden, WH, Wi, y HF), una de origen bovino (cepa Shintoku) y una cepa de origen humano (Ehime 86-542).<sup>12</sup>

Recientemente estos mismos investigadores mediante la utilización de ensayos de neutralización clasificaron a estas cepas de RGC en diferentes serotipos. De esta manera la cepa Cowden fue asignada como serotipo 1, la cepa Shintoku correspondió a serotipo 2,

la cepa HF como un probable serotipo 3 y las cepas WH y Ehime fueron clasificadas como posible serotipo 1 .<sup>12,21</sup> **Tabla 1.1.**

La secuencia nucleotídica del gene que codifica para la glicoproteína de la cápside externa VP7 de la cepa Shintoku, HF y WH fue comparada con las secuencias correspondientes a las cepas Cowden y Ehime, observándose que las 5 cepas presentaron una longitud de 1063 nucleótidos. El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos a VP7 permitió determinar una identidad de 85.2 - 97% entre las cepas relacionadas serotípicamente (Cowden, WH y Ehime) y una identidad de 69.9 - 74.7% con respecto a las otras dos cepas Shintoku y HF. Entre los diferentes serotipos se reconocieron 8 regiones variables en la glicoproteína VP7, las cuales fueron similares a los de VP7 de RGA.<sup>21</sup>

**Tabla 1.1.** Serotipos de rotavirus grupo C

SEROTIPO	CEPA(ORIGEN)
1	Cowden (Porcino), WH <sup>a</sup> (Porcino); Ehime <sup>a</sup> (Humano)
2	Shintoku (Bovino)
3	HF <sup>a</sup> (Porcino)

<sup>a</sup> probable serotipo.

Se ha propuesto que la diversidad serológica entre las cepas de RGC esta relacionada con variaciones en la glicoproteína VP7 de la cápside externa.<sup>12,25</sup>

### 1.2.2. ELECTROFEROTIPOS.

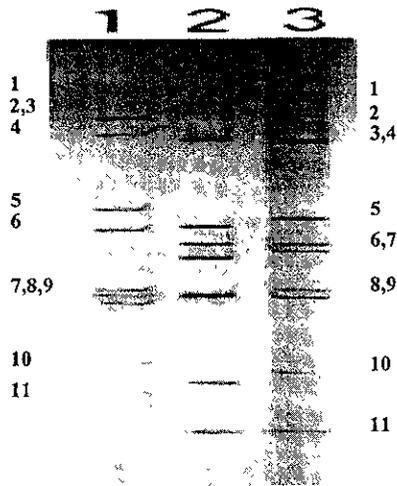
Kuzuya y col. (1996) clasificaron a los electroferotipos de los rotavirus humanos grupo C (CHRV) aislados de Okayama, Japón en dos perfiles electroforéticos (I y II). Mediante la técnica de Dot blot, analizaron 11 muestras clínicas, de las cuales 6 presentaron el patrón I y 5 mostraron el patrón II.<sup>25</sup> **Tabla 1.2.**

**TABLA 1.2.** Electroferotipo I y II de 11 muestras aisladas de Okayama, Japón.

MUESTRA	ELECTROFEROTIPO	TOMA DE MUESTRA
OK70	I	11-Enero-1988
OK118	I	06-Febrero-1988
OK222	I	07-Abril-1988
OK231	I	25-Abril-1988
OK239	I	28-Abril-1988
OK450	II	08-Febrero-1989
OK459	I	13-Febrero-1989
OK462	II	13-Febrero-1989
OK595	II	12-Agosto-1989
154	II	07-Junio-1990
157	II	13-Junio-1990

Tomado de Kuzuya M, 1996.

Los perfiles electroforéticos I y II mostraron diferencias en la migración de los segmentos 5, 7 y 10 presentando una migración más lenta en el patrón II con respecto al patrón I y también se observaron otra pequeñas diferencias en los segmentos 3, 4 y 8. <sup>25,26</sup> **Figura. 1.3**



**Fig. 1.3.** Electroferotipos de RGC. Carril 1 RGA; Carril 2, electroferotipo I de RGC; Carril 3, electroferotipo II de RGC. Tomado de Kuzuya M 1996.

### 1.3. PROTEÍNAS VIRALES

La difícil propagación en cultivo celular de los RGC ha obstaculizado el estudio de sus proteínas virales. Los RGC de origen humano y de animales, presentan proteínas estructurales muy similares; hasta la fecha se han identificado 6 proteínas estructurales

en los RGC de humanos, con PM que van desde 35,000 a 93,000 daltons. <sup>14,16,20,27</sup>

Bremont y col. (1988) reportaron que la composición de las proteínas de RGC son similares a las proteínas de los RGA. <sup>14</sup>

Jiang y col, (1989-1990) identificaron por análisis de purificación del virión y patrón de migración por lo menos 6 proteínas estructurales. (**Tabla 1.3.**) Dos de las cuales fueron localizadas en la cápside externa con pesos moleculares de 33 kDa, 37 kDa y posiblemente una de 25 kDa. Las cuatro restantes fueron localizadas en la cápside interna con pesos moleculares de 125 kDa, 93 kDa, 74 kDa y 41 kDa las cuales pudieron corresponder a las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP6 respectivamente, esta última se encuentra en mayor cantidad y presenta una estructura oligomérica. <sup>14,27</sup>

Estudios con marcaje radioactivo de lisados celulares infectados con RGC demuestran la presencia de dos proteínas no estructurales con pesos moleculares de 39 kDa y 35 kDa. La proteína de 25 kDa se ha descrito como una proteína estructural, pero pudiera ser una proteína análoga a la fosfoproteína no estructural (26 kDa) de los RGA. <sup>14,20,27</sup>

**TABLA 1.3.** Composición comparativa de proteínas de rotavirus grupo A y C <sup>a</sup>.

<b>PROTEÍNAS (kDa)</b>		
	<b>GRUPO A (SA11)</b>	<b>GRUPO C (Cowden)</b>
<b>Cápside interna y nucleocápside</b>	125 (VP1)	125
	94 (VP2)	93
	88 (VP3)	74
	41 (VP6)	41
		33
		25
<b>Cápside externa</b>	88 (VP4)	83
	60 (VP5) <sup>b</sup>	
	28 (VP8) <sup>b</sup>	
	37 (VP7)	37
<b>No estructural</b>	53	39
	35	35
	34	
	28	
	26 (VP9)	
	20 (VP10) <sup>d</sup>	22 <sup>c</sup>
<b>Variante</b>	37 <sup>e</sup>	37 <sup>e</sup>
	28 <sup>e</sup>	
	26 <sup>f</sup>	25 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Citado por Ericson et al. (1982); Fang et al. (1989a); Jiang et al. (1989, 1990); Liu et al. (1988); Mason et al. (1980, 1983); y Welch et al. (1989).

<sup>b</sup> Productos de VP4

<sup>c</sup> Designación tentativa

<sup>d</sup> Precursor de NS28

<sup>e</sup> Glicosilado

<sup>f</sup> Fosforilado

Estudios de cinética indican que la síntesis máxima de las proteínas virales ocurren entre las 6 y 9 horas postinfección en células MA-104.

27

## **PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE EXTERNA.**

**VP7.** Es una proteína glicosilada con un PM de 37 kDa, (**Tabla 1.4**) es la segunda más abundante de las proteínas estructurales, y es codificada por el segmento 8, esta proteína es análoga en tamaño y localización a la glicoproteína VP7 de RGA, es altamente inmunogénica e induce la formación de anticuerpos neutralizantes.

12,20-24

Los genes que codifican para la proteína VP7 de las 5 cepas de RGC están compuestas de 1063 nucleótidos y poseen un marco de lectura abierto que codifica para un polipéptido de 332 aminoácidos.<sup>21.</sup>

25

**VP4.** Es una proteína de cápside externa con PM de 83 kDa codificada por el segmento 3 de los RGC.<sup>31</sup>

**Tabla 1.4.** Pesos moleculares correspondientes a VP7 de las diferentes cepas de RGC.

<b>CEPA DE RGC</b>	<b>PM (kDa) DE VP7</b>
Cowden	37.4
WH	37.4
Ehime	37.5
Shintoku	37.6

### **PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE INTERNA.**

**VP6.** Es una proteína de la cápside interna, codificada por el segmento 5 ó 6 dependiendo de la cepa, presenta estructura tridimensional y es la más abundante de la partícula viral (50%). Además no contiene los determinantes antigénicos que son comunes en todos los RGA. Es un componente estructural importante ya que mantiene la conformación de la nucleocápside y es altamente inmunogénica; es la proteína más frecuentemente utilizada en el diagnóstico de rotavirus. <sup>20,22,28-30</sup>

### **PROTEÍNAS DE LA NUCLEOCÁPSIDE.**

**VP1.** Es una posible proteína estructural, con un peso molecular de 125 kDa y es codificada por el segmento 1 del genoma viral. <sup>31</sup>

**VP2.** Esta proteína presenta un peso molecular de 93 kDa en la cepa Cowden, actualmente no existen reportes sobre el gene que codifica para dicha proteína. <sup>31</sup>

**VP3.** Es una proteína que se encuentra formando la nucleocápside, con PM de 74 kDa y es codificada por el segmento 4 del genoma viral.

<sup>31</sup>

Existen muy pocos estudios sobre las funciones de estas proteínas. <sup>20</sup>

#### **1.4. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS**

Mediante estudios de purificación por centrifugación en gradientes de cloruro de cesio o sacarosa se ha determinado que las partículas virales completas de los RGC presentan una densidad de 1.369 g/ml, mientras que las partículas sin la cápside externa tienen una densidad de 1.387g/ml y finalmente la nucleocápside con una densidad de 1.44 g/ml. <sup>20,23,27</sup>

Las partículas de RGC son lábiles a 56°C, ligeramente sensibles a pH 3 y relativamente estables a pH 5 y en éter; no tienen actividad hemaglutinante con eritrocitos humanos (tipo O). <sup>20,30,32,33</sup>

La infectividad puede ser inactivada por desinfectantes tales como fenoles, formalina, cloro y etanol al 95% este último es tal vez el más efectivo ya que destruye la cápside externa.<sup>23</sup>

## 1.5. PROPAGACIÓN IN VITRO

Los rotavirus del grupo no A, son de difícil propagación *in vitro*. A la fecha sólo 3 cepas de RGC han sido adaptadas a líneas celulares, (Cowden, Shintoku y Ehime).<sup>20</sup>

Nilsson y col. (1993) propagaron a los RGC de porcino en células testiculares de cerdo (ST) utilizando concentraciones no tóxicas de tripsina demostrando que las cepas cultivables poseen una hemaglutinina que requiere de ácido siálico para unirse a los receptores de los enterocitos.<sup>34</sup>

Recientemente en Japón los RGC de origen humano han sido adaptado en células de carcinoma de colón humano (CaCo-2) en presencia de tripsina (4µg/ml), las células infectadas no muestran efecto citopático aparente, sin embargo el virus es detectado en las células citoplasmáticas por inmunofluorescencia (IF).<sup>18,21</sup>

Existen diversos factores que determinan la propagación en cultivo celular de los rotavirus no A los cuales incluyen: el uso inicial de cultivos primarios, tubos rotatorios y la adición de enzimas proteolíticas en el inóculo y en el medio de mantenimiento. <sup>2,20</sup>

Diversos estudios recomiendan que para la adaptación de los RGC en líneas celulares (MA-104, ST y PK-15) es necesario realizar pases previos en cultivos primarios de células de riñón de cerdo (PPK), utilizando enzimas como la tripsina y la pancreatina, siendo esta última más eficaz ya que incrementa la infectividad de este grupo de virus en líneas celulares. <sup>2,20,35,36</sup>

Cabe mencionar que cuando se utilizan altas concentraciones de pancreatina para la propagación de RGC, ésta provoca toxicidad en la monocapa de las líneas celulares, por lo que efecto citopático del virus no puede ser determinado. <sup>19</sup>

También se han logrado adaptar cepas de RGC provenientes de gato en células MA-104 adicionando al inóculo altas concentraciones de tripsina. <sup>20</sup>

## **1.6. CLÍNICA Y PATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR RGC**

### **1.6.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

Snodgrass y col (1984), determinaron las manifestaciones clínicas por RGC, realizando estudios con porcinos de 1 día de nacidos, a los cuales se les administró una suspensión de RGC, observando 24 horas después una diarrea severa, vómito, anorexia y deshidratación.<sup>37</sup>

También experimentos realizados con porcinos gnotobióticos infectados con RGC demostraron la presencia de gastroenteritis con una severidad clínica similar a la de los RGA. Observando la presencia de diarrea de 24 a 48 horas después de la inoculación y persistiendo de 2-6 días.<sup>2,8,12</sup>

Algunas de las manifestaciones clínicas que se han reportado en personas infectadas por RGC se han caracterizado por una diarrea profusa que puede persistir hasta por 5 días, fiebre de 38-39°C, dolor abdominal, náuseas, vómito con episodios de 1-10/ día, deshidratación poco severa y fatiga.<sup>3,4,12,15,18</sup>

Se ha propuesto que los RGC de humanos originalmente fueron de origen porcino por lo tanto la transmisión puede ser de tipo zoonótica y emergente.<sup>24</sup>

### **1.6.2. PATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN**

Mediante estudios realizados en biopsias de intestino delgado de porcinos infectados con RGC se ha demostrado los daños histopatológicos que provoca este agente viral.<sup>36</sup>

Los RGC infectan directamente la parte apical de las células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado provocando acortamiento, atrofia de las vellosidades, infiltración linfocítica en la lámina propia y cisternas distendidas del retículo endoplásmico, especialmente en el íleon.<sup>8,20,36</sup>

La diarrea inicia cuando los enterocitos se desprenden del intestino, los enterocitos maduros son reemplazados por enterocitos inmaduros los cuales en lugar de tener la función de adsorción tienen la función de secreción; provocando disminución en la adsorción de solutos iónicos sodio y cloro; y solutos no iónicos glucosa y aminoácidos. La lesión puede extenderse e incluir parte o todo el intestino delgado. El tamaño de la lesión determina la severidad de los

síntomas, también existen otros factores determinantes como son la cantidad de partículas virales, la edad y estado inmunológico del paciente.<sup>8,20,23</sup>

## 1.7. EPIDEMIOLOGÍA

Los RGC han sido reportados en muestras fecales de cerdos infectados en Australia, Canadá, Nueva Zelanda y Estados Unidos; en vacas y gatos en Japón, y en humanos en muchos países (Tailandia, Nepal, Inglaterra, Norteamérica, Japón entre otros).<sup>3,7,10-13,26</sup> **Tabla 1.5.**

Los RGC infectan principalmente a personas de 4 a 8 años de edad, aunque actualmente se ha reportado que infecta a adultos.<sup>1,13</sup>

En un estudio realizado en Reino Unido (1983), con sueros de humanos y utilizando antígenos de RGC (origen porcino), se observó un porcentaje del 0-11% de positividad. Asimismo por técnicas serológicas se ha demostrado la presencia del 3 - 45% de anticuerpos contra RGC en diversas partes del mundo.<sup>1,5,13,32</sup>

En Tokio (1987 - 1988) se detectaron 4 casos de RGC durante 7 años de estudio, la infección se presentó en pacientes de 6 meses, 1,2 y 9 años de edad.<sup>38</sup>

**Tabla 1.5.** Distribución mundial de la infección por RGC.

PAÍS, AÑO	Nº. CASOS POSITIVOS / Nº DE MUESTRAS EXAMINADAS	EDAD DEL PACIENTE
Australia 1981	1/ 400 <sup>a</sup>	20 meses
Brasil 1983	1/ NR	infante
Francia 1981	1/ NR <sup>a</sup>	2 años
1984	3/ 1,020 <sup>a</sup>	Infante
Bulgaria 1983	2/ NR <sup>a</sup>	Infante
1986	5/ 691	Infante
México 1984	1/ 658 <sup>a</sup>	2 años
Italia 1985	1/ NR <sup>a</sup>	4 meses
Chile 1986	1/ NR <sup>a</sup>	6 meses
Argentina 1986	1/ NR <sup>a</sup>	1 año
Japón 1985	5/ NR	niños
1986	7/ 572	niños
1988	48/ NR	niños
China 1987	60/ NR	niños
Finlandia 1988	6/ 600	4-7 años
India 1988	4/ NR	niños
Inglaterra 1983	1/ NR	Adulto
Nepal	1/ NR	8 años
Tailandia 1986	4/ NR	niños y adulto

<sup>a</sup> Los RGC fueron clasificados con base a su electroferotipo pero no fueron confirmados. Tomado de Peñaranda ME, 1989; Saif LJ y Jiang B, 1994.

NR No reportados

En Estados Unidos se presentó la infección por este agente viral en 1.5 % de infantes con diarrea en un estudio de casi 1,100 infantes.

Se estima que aproximadamente 1 de cada 3 adultos jóvenes han sido infectados alguna vez por RGC. <sup>6</sup>

En porcinos se observa una alta prevalencia de anticuerpos (97% en Estados Unidos, 93% en Japón y el 77% en Australia y Brasil) y en bovinos la presencia de anticuerpos contra RGC es menor, en Estados Unidos se reporta el 47% y en Japón el 56%, lo cual sugiere que se trata de una infección zoonótica y emergente. <sup>1,7,11</sup>

Los RGC tienen una estacionalidad similar a la de los RGA, que es generalmente en los meses fríos aunque en algunos países como Tokio se ha reportado la infección en los meses de Febrero, Marzo y Junio. <sup>38</sup>

Se ha reportado que durante la fase diarreica la cantidad de partículas virales que se eliminan en materia fecal es aproximadamente de  $10^9$ - $10^{10}$  partículas/ml. <sup>4</sup>

Actualmente los RGC se han encontrado asociado a pacientes con atresia biliar extrahepática, ya que se ha detectado tanto en muestras fecales como en hígado, pero aún no se sabe si es el

causante de esta enfermedad. Tal vez RGC hepatotrópico circula antes de un gran brote de RGA ó RGC tipo gastrointestinal. <sup>13,17</sup>

## **1.8. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA RGC**

Los RGC no son detectados por las mismas técnicas serológicas utilizadas para el diagnóstico de RGA, ya que no comparten el mismo antígeno común de grupo. Este grupo de rotavirus presenta una gran dificultad para ser cultivado en líneas celulares y por otro lado se observa un menor título de partículas virales en materia fecal, <sup>13</sup> por lo que se ha recurrido a diferentes técnicas moleculares para el diagnóstico de éste agente viral, actualmente se utilizan los siguientes:

### **1.8.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME)**

Cuando se dispone de un microscopio electrónico su empleo para el diagnóstico de rotavirus resulta un método rápido y eficiente. En general es de gran utilidad en casos en que no se tenga un alto número de muestras, y nos permite diagnosticar brotes en tiempos muy cortos. La eficiencia de la ME se basa en detectar de  $10^6$  a  $10^9$  partículas virales/ml de heces, lo que implica gran facilidad para la

observación microscópica. Además la morfología de estos virus es muy característica y no se puede presentar confusión con otros agentes y finalmente, tiene la ventaja de que se pueden detectar otros virus simultáneamente. Para la detección de Rotavirus se realiza una suspensión al 10% de materia fecal en PBS y se mezcla con un volumen igual de triclorotrifluoroetano posteriormente es centrifugado a 1,700g /20 min, la fase acuosa es colectada y mezclada con 30% de sacarosa seguida de una centrifugación a 110,000g/ 2.5 hr a 4°C por último se realiza una tinción negativa con ácido fosfotungstico al 2%. Esta técnica no permite diferenciar morfológicamente a los diferentes grupos de rotavirus.<sup>3,18,36,39</sup>

### **1.8.2. INMUNOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA (IME)**

Es una variante del método anterior pero con el uso de anticuerpos que inducen la aglutinación de partículas virales. Se utiliza cuando se desea tipificar a los rotavirus pero es indispensable disponer de los anticuerpos monoclonales específicos correspondientes para que puedan diferenciarse los grupo de rotavirus. Actualmente se ha utilizado para la identificación de RGC,

usando como referencia antisueros grupo C de porcino (cepa Cowden).<sup>3,11,18,39</sup>

### **1.8.3 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE)**

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada eléctricamente cuando ésta se somete a un campo eléctrico. Se trata de un método que permite el diagnóstico de RGC en muestras de materia fecal, partiendo de la extracción del RNA con fenol-cloroformo, la muestra se coloca en un gel de poliacrilamida, se separa por electroforesis y por último se tiñe con Nitrato de plata, observándose los 11 segmentos de RNA viral, el patrón de migración es característico de grupo (4-3-2-2).<sup>1,3,6,9,13,15,18,26,37-40</sup>

### **1.8.4. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS**

En los últimos años se han desarrollado técnicas rápidas de hibridación para el análisis de los genes, muchas de estas se basan en la detección de ácidos nucleicos por la hibridación de DNA:RNA o DNA:DNA. En la práctica el procedimiento de hibridación puede usarse para detectar una secuencia específica en una muestra heterogénea de DNA. Para esto se requiere tener copias de la

secuencia que se desea encontrar, estas copias se marcan de alguna manera que nos permita confirmar la formación de las moléculas híbridas. A las cadenas marcadas se les llama sondas (o "probe" en inglés) y serán utilizadas para buscar en la muestra la cadena con secuencia complementaria que se llamara secuencia blanco. Gran parte de las técnicas de hibridación se han fundamentado en el marcaje con sustancias radioactivas. <sup>14</sup>

El procedimiento de hibridación consta de 4 partes: transferencia, marcado de la sonda, hibridación y detección de los híbridos.

Actualmente se ha analizado la diversidad genética entre los rotavirus grupo C, mediante la técnica de hibridación DNA-RNA utilizando el gene 8 de la cepa Cowden (de origen porcino). <sup>12,42</sup>

#### **1.8.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es un método que permite la rápida amplificación y detección *in vitro* del material genético (DNA) que produce el proceso de replicación del DNA *in vivo*. La técnica consiste en un proceso cíclico de tres pasos: desnaturalización del DNA de doble cadena, unión de los

oligonucleótidos iniciadores y extensión de los mismos. Cada uno de los pasos se efectúa mediante cambios de la temperatura de reacción. El método consta de 25 a 30 ciclos, lo cual se lleva a cabo en un *reciclador térmico programable*, lo que hace posible procesar gran cantidad de muestras en pocas horas.<sup>43</sup>

La tipificación de los RGC se realiza mediante una RT-PCR (transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa) para retrotranscribir el RNA a cDNA mediante la enzima transcriptasa reversa y oligonucleótidos específicos de grupo, provenientes de la secuencia del gene 6 o gene 8.<sup>13,44,45</sup>

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En México se desconoce el panorama general sobre la incidencia de los rotavirus grupo C, por lo que en este trabajo se pretende realizar la búsqueda de este agente viral en preescolares y adolescentes con gastroenteritis aguda de diferentes entidades de la República Mexicana mediante la utilización de técnicas moleculares (Rotaforesis y RT-PCR).

Este estudio nos permitirá conocer el panorama general de la infección por los RGC, así como su estacionalidad e incidencia en nuestro país.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Detectar la presencia de los rotavirus grupo C en muestras fecales de pacientes de 4 a 18 años de edad con gastroenteritis aguda, provenientes de diferentes entidades de la República Mexicana.

### **3.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Identificar mediante la técnica de rotaforesis el electroferotipo característico de los rotavirus grupo C.
2. Extraer del RNA viral a partir de materia fecal y purificar con CF-11.
3. Confirmar la presencia de los rotavirus grupo C por la técnica de Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).
4. Conocer los indicadores epidemiológicos más frecuentes en la infección por los RGC.

## **4.HIPÓTESIS**

En México existe la circulación de los rotavirus grupo C en preescolares y adolescentes provocando casos esporádicos de gastroenteritis aguda en estos grupos de edad. Mediante la técnica de rotaforesis y RT-PCR se demostrará la presencia de este agente viral.

## **5. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**

### **A) CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Población de estudio: preescolares y adolescentes
- Edad: 4 a 18 años
- Diagnóstico: gastroenteritis aguda menor de 72 horas
- Período de estudio: Enero 97 a Junio 98

### **B) CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes menores de 4 años y mayores de 18 años

### **VARIABLES DEPENDIENTES**

- Gastroenteritis aguda
- Edad: 4 a 18 años

### **VARIABLES INDEPENDIENTES**

- Sexo
- Estado nutricional

### **TIPO DE ESTUDIO**

Prospectivo, experimental y transversal.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. MATERIAL

#### 6.1.1. Material Biológico

Se trabajaron 126 muestras clínicas, de pacientes mayores de 4 años y menores de 18 años de edad provenientes de Tampico, Cd Victoria, Reynosa, Morelia, Monterrey, Veracruz, Chihuahua, Colima, Cancún, Chetumal, Mérida, La Paz y Saltillo; correspondientes al período de Enero 97- Junio 98.

#### 6.1.2. Material de Laboratorio

Tubos Eppendorf de 1.5 ml

Tubos Eppendorf Micro Amp de Perkin Elmer (0.2 y 0.5 ml)

Pipetas Pasteur

Pipetas graduadas de 1,2,5, 10 y 25 ml

Vidrios de 7.5x6.5 cm

Separadores y peines de teflón

Pinzas

Micropipetas Gilson de 0.5-20  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l

Puntas para pipetas de 160-1000  $\mu$ l

Baño maría

Cristalería común de laboratorio

Guantes de latex

### **6.1.3. Equipo**

Vortex Genie-2 VWR

Microcentrífuga

Cámara horizontal para electroforesis

Cámara de electroforesis Mini Protean BIORAD

Cámara de electroforesis Mini Sub DNA cell

Fuente de poder 200/2.00 BIORAD

Termociclador Gene Amp System 2400 Perkin Elmer

Transiluminador UV Ultra-Lum UVB-20

Revco de  $-20^{\circ}\text{C}$  American

Refrigerador de  $4^{\circ}\text{C}$  American

Campana de flujo laminar vertical

Balanza MJ-3000 Chyo

Cámara fotográfica POLAROID 57

### **6.1.4. Reactivos**

Sol. A 5x (solución de lisis)

Sol. B (Fenol)

Sol. C 1x (Agarosa, Xilen-cianol)

Sol. D 10x (Glicina)

Sol. E 10x (Etanol-Ácido acético)

Sol. F 100x (Nitrato de plata)

Sol. G 125x (Formaldehído)

Sol. H (Ácido acético)

Sol. de Hidróxido de sodio 3%

Sol. de monómeros (Acrilamida-bis-Acrilamida)

Tris pH 8.8

Persulfato de amonio 2%

Tetrametilendiamina (TEMED)

Agarosa 2%

Cloroformo

Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (24:24:1)

Agua DEPC

Sol. de Isotiocianato de guanidina (Trizol)

Fibra de celulosa (CF-11)

Sol. STE (0.1M NaCl, 0.001M EDTA, 0.05M Tris-base) pH 7.0

Buffer para PCR 10x

dNTPS (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Inhibidor de RNAsas de placenta humana (RNAsin) 40 U/μl

Dimetil sulfóxido (DMSO)

Transcriptasa reversa 25 U/μl (Boehringer Manneheim)

Taq-polimerasa 5 U/μl (Boehringer Manneheim)

Bromuro de etidio

Sol. TBE 10x (Tris-base, Ácido bórico, EDTA)

#### **6.1.5. OLIGONUCLEÓTIDOS**

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

**C1- 5' CTC GAT GCT ACT ACA GAA TCA G 3'**

**C4- 5' AGC CAC ATA GTT CAC ATT TCA TCC 3'**

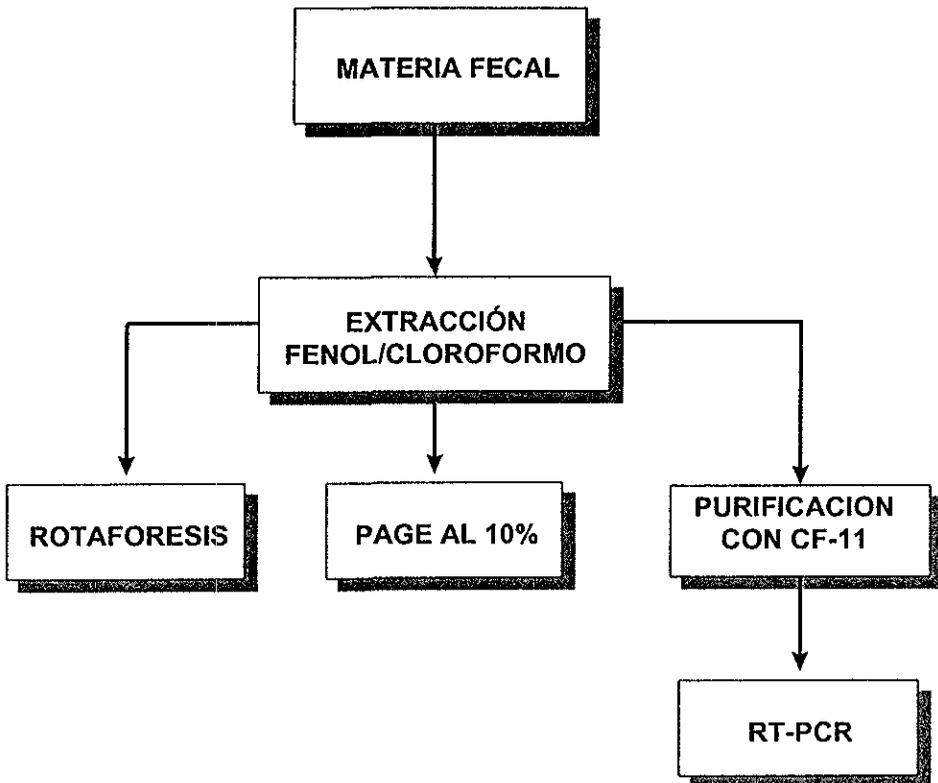
Oligonucleótidos específicos del grupo A (Beg 9 y End 9)

**Beg 9- 5' GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G 3'**

**End 9- 5' GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG 3'**

## 6.2. MÉTODOS

### 6.2.1. DIAGRAMA DE FLUJO



## **6.2.2. ROTAFORESIS**

Rotaforesis es un kit de diagnóstico desarrollado por el Dr. Espejo y col. (1982) en el que se lleva a cabo la detección directa del RNA viral a partir de materia fecal, mediante un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida y posterior tinción con  $\text{AgNO}_3$ .<sup>49, 50</sup>

### **6.2.2.1. Extracción del RNA viral a partir de materia fecal**

- ◆ A 300  $\mu\text{l}$  de materia fecal se adicionaron 300  $\mu\text{l}$  de sol. A, 300  $\mu\text{l}$  de sol. B y 300  $\mu\text{l}$  de Cloroformo.
- ◆ Se mezcló homogéneamente en vortex y se centrifugó a 7500 r.p.m. durante 15 minutos.
- ◆ El sobrenadante fue separado y almacenado a 4°C, hasta su uso.

### **6.2.2.2. Preparación del Gel de Poliacrilamida al 5%**

- ◆ Se colocaron los separadores y el peine de teflón entre los vidrios, se sujetaron con pinzas los 3 extremos de los vidrios y se sellaron estos extremos con agarosa.

- ◆ En un vaso de precipitados de 25 ml se colocaron 1.32 ml de la sol. de Bis-Acrilamida 2 ml de Tris pH 8.8, 4.56 de agua destilada estéril, 480  $\mu$ l de Persulfato de amonio al 2% y finalmente 10  $\mu$ l de TEMED.

- ◆ Se mezcló suavemente y se procedió a llenar el espacio existente entre los dos vidrios esperando la polimerización.

- ◆ Posteriormente se retiró el peine y con papel absorbente se secaron perfectamente los pozos.

#### **6.2.2.3. Electroforesis**

- ◆ A 80  $\mu$ l de sobrenadante obtenido en la extracción de RNA se le adicionó una gota de sol. C.

- ◆ Se adicionó la mezcla en los pozos del gel.

- ◆ Dejar solidificar las muestras.

- ◆ Realizar el corrimiento electroforético con 250 ml de sol. D (1x) a 100 volts durante 2 horas aproximadamente.

#### **6.2.2.4. Tinción de Geles de Poliacrilamida con Nitrato de plata.**

- ◆ Una vez terminado el corrimiento electroforético, se retiró el gel del los vidrios.

- ◆ Se realizó un pequeño corte en la parte inferior del primer carril.
- ◆ Se fijó en sol. E (1x) durante 30 minutos.
- ◆ Se retiró la solución anterior y se procedió a la tinción con sol. F durante 30 minutos.
- ◆ Transcurrido el tiempo se realizaron dos lavados con agua destilada estéril.
- ◆ Posteriormente se adicionó la sol. G hasta que se observaron las bandas del control positivo.
- ◆ Finalmente se detuvo la reacción con sol. de ácido acético glacial al 1%.

#### **6.2.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %.**

La metodología para la preparación de este tipo de geles es básicamente la misma que se sigue para los geles al 5% y se utilizan cámaras de electroforesis de BIO-RAD. El corrimiento electroforético se lleva a cabo a 100 volts/14 h. La finalidad de esta metodología es el análisis de los electroferotipos de las diferentes cepas de rotavirus.

### 6.2.3. PURIFICACIÓN DEL RNA VIRAL CON CF-11

Para realizar la técnica de RT-PCR, es necesario que el RNA este libre de impurezas que pueden interferir en la reacción de amplificación, por lo tanto se lleva a cabo la purificación del material genético mediante el uso de una fibra de celulosa (CF-11).<sup>44</sup>

- ◆ A 300  $\mu$ l del sobrenadante obtenido en la extracción de RNA se le adicionó 50 $\mu$ l sol. A, 300 $\mu$ l Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (24:24:1).
- ◆ Se mezcló homogéneamente en vortex y se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 10 minutos.
- ◆ Al sobrenadante obtenido se le adicionó 200 $\mu$ l de trizol y nuevamente se mezcló y centrifugó a 8000 r.p.m. durante 10 minutos.
- ◆ Finalmente este último sobrenadante se colocó en otro tubo y se le adicionó 30 mg de Fibra de celulosa 11 (CF-11).
- ◆ Se mantuvo mezclando por 3 días a 4°C.
- ◆ Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 13 000 rpm/1 minuto.
- ◆ Se realizaron 3 lavados con STE.

♦ El RNA fue eluido 2 veces de la CF-11 con 30  $\mu$ l de agua DEPC, a 60°C/10 min.

#### **6.2.4. TRANSCRIPTASA 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 y C, mediante oligonucleótidos específicos que hibridan las cadenas de DNA expuestas y posteriormente son amplificadas por la Taq-polimerasa.<sup>51</sup>

##### **6.2.4.1. Determinación de rotavirus grupo C**

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

♦ La mezcla de reacción consistió en buffer 10X (Tris 10mM pH 8.3, KCl 40mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM), dNTPs 0.2 mM de cada nucleótido, RNAsin 8U, oligonucleótidos específicos del grupo C (C-1 y C-4 0.05  $\mu$ M); en un volumen suficiente de agua DEPC. a

la mezcla de reacción también se adicionaron las enzimas 12.5U de transcriptasa reversa y 2.0 U de Taq-polimerasa, se homogeneizó perfectamente.

◆ Se utilizaron 5 µl de RNA, posteriormente fue desnaturalizado a 97°C/5 min. en presencia de 7% de DMSO.

◆ Rápidamente se enfrió en Etanol a -20°C/5 minutos.

◆ Después se adicionó la mezcla de reacción hasta un volumen total de 50 µl.

◆ Se colocaron los tubos en el termociclador con el siguiente programa: 30 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, posteriormente 7 min. a 72°C, finalmente a 4°C.

◆ A la mezcla de reacción también se adicionaron los oligonucleótidos específicos del grupo A (Beg-9 y End-9 0.1 µl).

#### **6.2.4.2. OBSERVACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN EN GELES DE AGAROSA**

Los productos de las amplificaciones se verificaron en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio 0.5 µg/ml.

- ◆ En el primer pozo del gel se colocaron 2  $\mu\text{l}$  de marcador  $\phi\text{X-174}$  digerido en *HaeIII* para observar el tamaño de los segmentos de las amplificaciones.
- ◆ Se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de los productos amplificados en cada uno de los pozos del gel.
- ◆ Posteriormente realizó la electroforesis en buffer TBE a 120 V durante 30 minutos.
- ◆ Finalmente se observó el gel en el transiluminador.
- ◆ Se tomó una fotografía con cámara Polaroid 57, utilizando películas 667 con tiempo de exposición de 1 segundo y una apertura del diafragma entre 8 y 11.

## 7. RESULTADOS

En este estudio se trabajaron 126 muestras diarreicas de pacientes de 4 a 18 años de edad con gastroenteritis aguda, procedentes de diferentes entidades de la República Mexicana: Tampico, Cd. Victoria, Reynosa, Morelia, Monterrey, Veracruz, Chihuahua, Colima, Cancún, Chetumal, Mérida, La Paz y Saltillo; correspondientes al período de Enero 97 a Junio 98; las cuales fueron enviadas al laboratorio de rotavirus para su diagnóstico.

Del total de muestras analizadas por la técnica de rotaforesis se observó que: 12 (9.52%) fueron positivas a RGC; 20 (15.87%) a RGA; y 94 (74.60%) fueron negativas a Rotavirus. **Tabla 7.1 y Gráfica 7.1**

La técnica de PAGE al 10% teñido con nitrato de plata mostró que las muestras positivas a RGC presentaron un perfil electroforético característico de estos virus (4-3-2-2), así como la presencia de tres electroferotipos diferentes: Tipo I en La Paz (1997); Tipo II en Monterrey (1997); y Tipo III en Tampico y Colima (1998); con variación en la migración de los segmentos de RNA 3 y 9. Por la misma metodología fue posible determinar la presencia de RGA, con

un perfil electroforetico característico de este grupo (4-2-3-2). **Figura 7.1**

La técnica de RT-PCR se realizó a partir de la materia fecal para confirmar la presencia de RGC utilizando oligonucleótidos específicos para este grupo. Las muestras correspondientes a RGC; amplificaron un producto de cDNA de 356 pb. Asimismo, fue posible confirmar por esta metodología que las muestras positivas a RGA por rotaforesis, mostraron un producto de amplificación de 1062 pb. **Figura 7.2**

Cabe destacar que las 12 (100%) muestras positivas a RGC por la técnica de rotaforesis también se confirmaron por la técnica de RT-PCR. Sin embargo de las 20 muestras que presentaron el electroferotipo característico de RGA, solo 18 (90%) fueron confirmadas por RT-PCR, mientras que 2 muestras no amplificaron los productos correspondientes a este grupo de rotavirus. Todos los casos negativos por rotaforesis también fueron negativos (100 %) por RT-PCR. **Tabla 7.2**

En este primer estudio, el panorama general de la infección por rotavirus grupo C en México, mostró un período estacional de Enero a Mayo, durante el año y medio de estudio. Observándose que en 1997

se presentaron 6 casos positivos a RGC, distribuidos en los meses de Febrero (3 casos), Marzo (2 casos) y Enero (1 caso). Asimismo, en 1998 se encontraron casos positivos en Marzo (3 casos) seguido de Febrero, Abril y Mayo con 1 caso respectivamente. **Tabla 7.3 y Gráfica 7.2**

Las manifestaciones clínicas más importantes que se presentaron en la infección de RGC, se obtuvieron consultando las encuestas centinelas de diarreas de la Secretaría de Salubridad diseñadas para el Programa de Vigilancia Epidemiológica de Rotavirus que se registraron en el momento de la toma de muestra. Los pacientes presentaron diarrea líquida con duración menor a 72 horas (91.6%), dolor abdominal (75%), vómito (66)%, deshidratación (25%), temperatura mayor de 38°C (25%) y de 3 a 8 evacuaciones por día. **Tabla 7.4 y Gráfica 7.3**

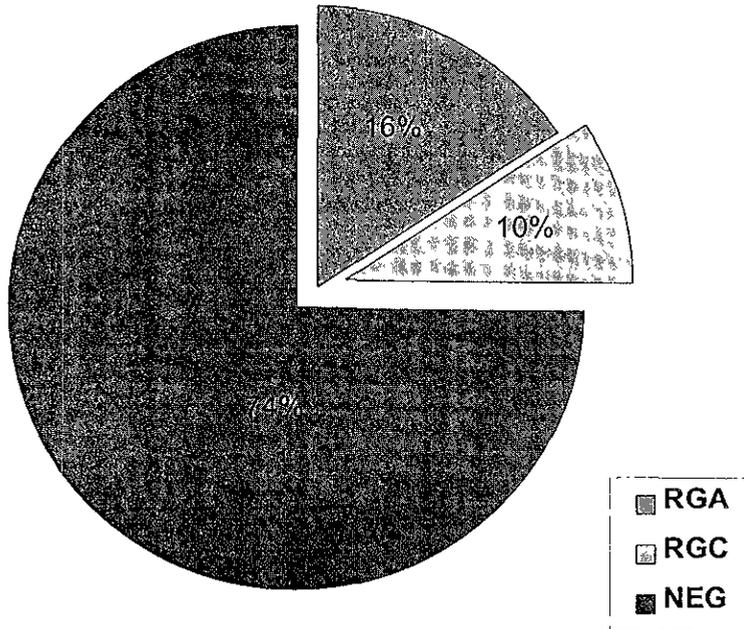
Es importante destacar que el grupo de edad más afectado a la infección de RGC fue de 4 años (5 casos), seguido de 10 años (2 casos) y por último las edades de 6, 8, 11, 12 y 15 años con 1 caso respectivamente. **Tabla 7.5 y Gráfica 7.4**

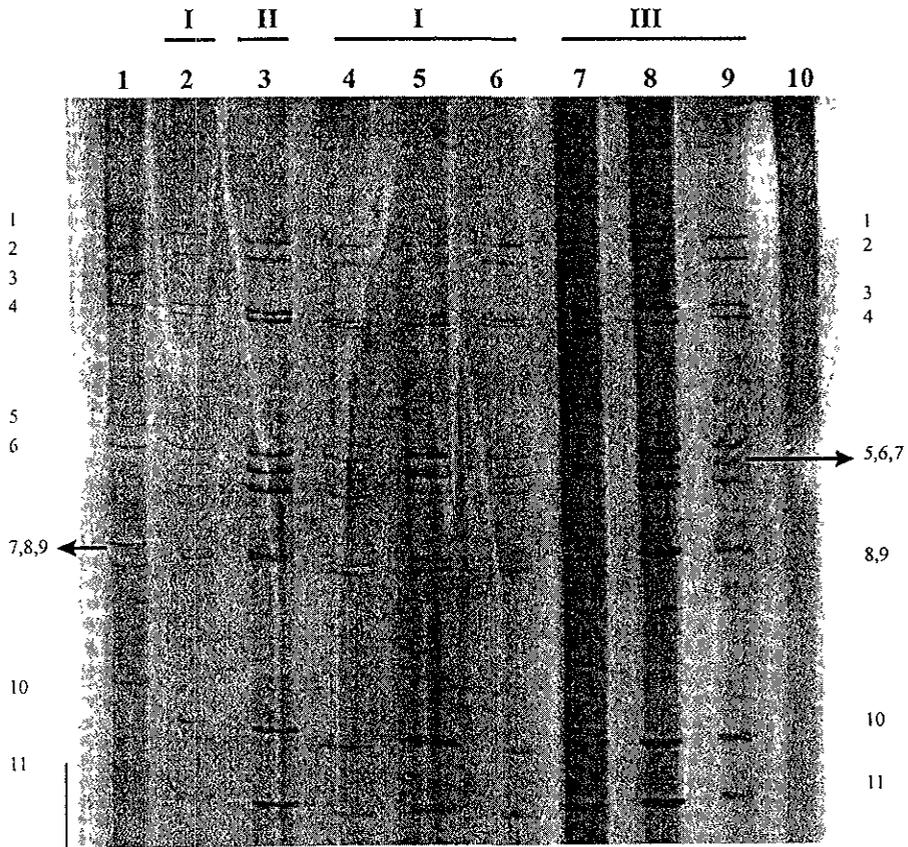
Las muestras positivas a RGC se presentaron distribuidas únicamente en 4 de las 13 entidades de la República Mexicana estudiadas observándose un mayor número de casos en La Paz, seguido de Colima, Tampico y Monterrey. **Figura. 7.3**

**Tabla 7.1.** Muestras clínicas analizadas por rotaforesis para el diagnóstico de RGC y RGA, procedentes de diversas entidades de la República Mexicana.

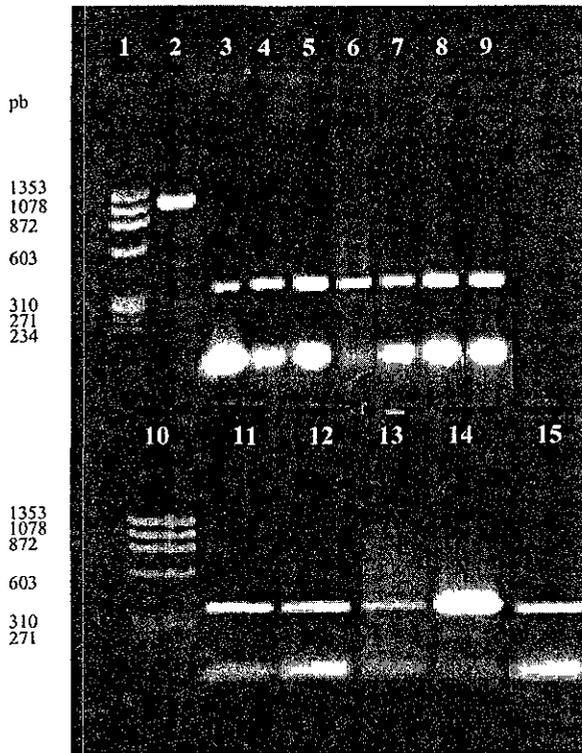
PROCEDENCIA	POSITIVAS	POSITIVAS	NEGATIVAS	TOTAL DE MUESTRAS
	RGC	RGA		
Tampico	2	15	28	45
Monterrey	1	1	19	21
Veracruz	0	0	17	17
Colima	4	0	9	13
La Paz	5	0	1	6
Cd. Victoria	0	1	5	6
Chihuahua	0	0	5	5
Morelia	0	0	4	4
Reynosa	0	1	2	3
Chetumal	0	0	2	2
Cancún	0	2	0	2
Saltillo	0	0	1	1
Mérida	0	0	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>	<b>20</b>	<b>94</b>	<b>126</b>
<b>%</b>	<b>9.52</b>	<b>15.87</b>	<b>74.60</b>	<b>100</b>

**Gráfica 7.1.** Análisis global de las frecuencias de RGC y RGA en pacientes con gastroenteritis aguda, mediante la técnica rotaforesis.





**Fig. 7.1.** Análisis de los electroferotipos de los RGC. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con  $\text{AgNO}_3$ . Carril 1 electroferotipo de RGA; Carriles 2,4-6 RGC Tipo I; carril 3 RGC Tipo II; carriles 7,8 y 9 RGC Tipo III.



**FIGURA 7.2.** RT-PCR para RGC. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1 y 10 marcador de peso molecular  $\phi$ X174-*Haelll*; Carril 2, producto de 1062 pb correspondiente a **RGA**; carriles 3-9 y 11-15 productos 356 pb correspondientes a **RGC**.

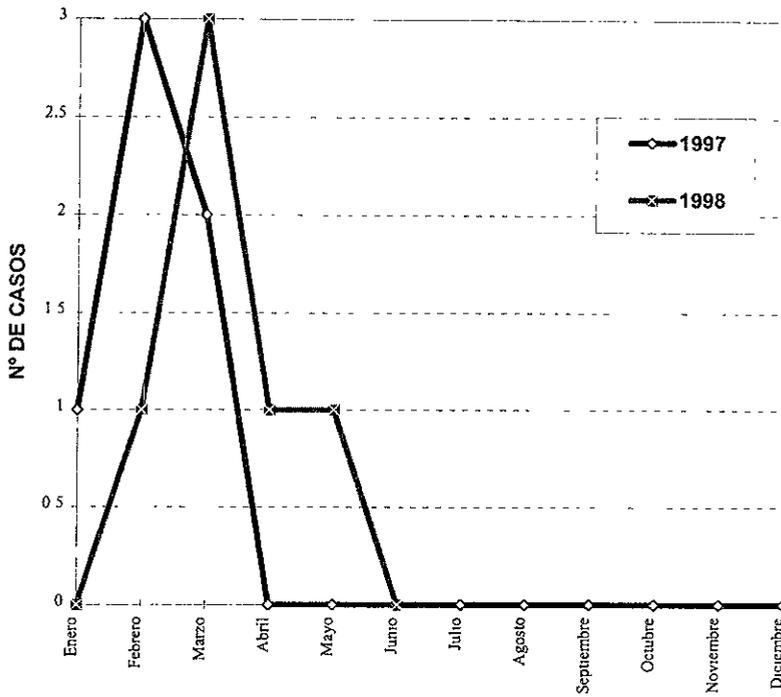
**Tabla 7.2.** Confirmación de RGC y RGA por RT-PCR

<b>RT-PCR</b>	<b>RGC</b>	<b>RGA</b>	<b>NEGATIVAS</b>
CONFIRMADAS	12	18	94
NO CONFIRMADAS	0	2	0
TOTAL DE MUESTRAS	12	20	94
%	100	90	100

**Tabla 7.3.** Frecuencia mensual de la infección por RGC en el período de Enero 97 a Junio 98.

<b>CASOS POSITIVOS A RGC</b>	<b>MES</b>	<b>AÑO</b>
1	ENERO	1997
3	FEBRERO	1997
2	MARZO	1997
1	FEBRERO	1998
3	MARZO	1998
1	ABRIL	1998
1	MAYO	1998

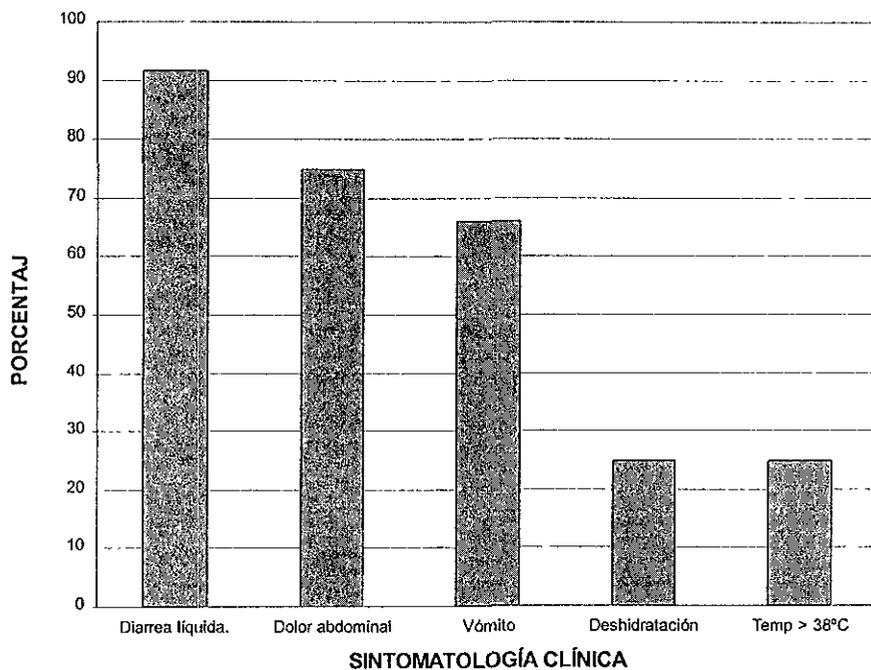
**Gráfica 7.2.** Período estacional de la infección por RGC en niños con gastroenteritis aguda.



**Tabla 7.4.** Manifestaciones clínicas de la infección por RGC

CLAVE INDRE	DIARREA LÍQUIDA < 72 H	DOLOR ABDOMINAL	VÓMITO	DESHIDRATACIÓN	TEMPERATURA > 38°C
3396	+	+	-	+	-
3762	+	+	-	-	+
3763	+	+	+	-	-
3766	+	+	+	-	-
3767	+	+	+	-	-
3770	+	+	+	-	-
9035	+	-	-	+	+
9053	+	+	+	-	-
9079	-	-	-	-	-
9146	+	+	+	-	-
9147	+	-	+	-	+
9203	+	+	+	+	-
<b>%</b>	<b>91.66</b>	<b>75</b>	<b>66</b>	<b>25</b>	<b>25</b>

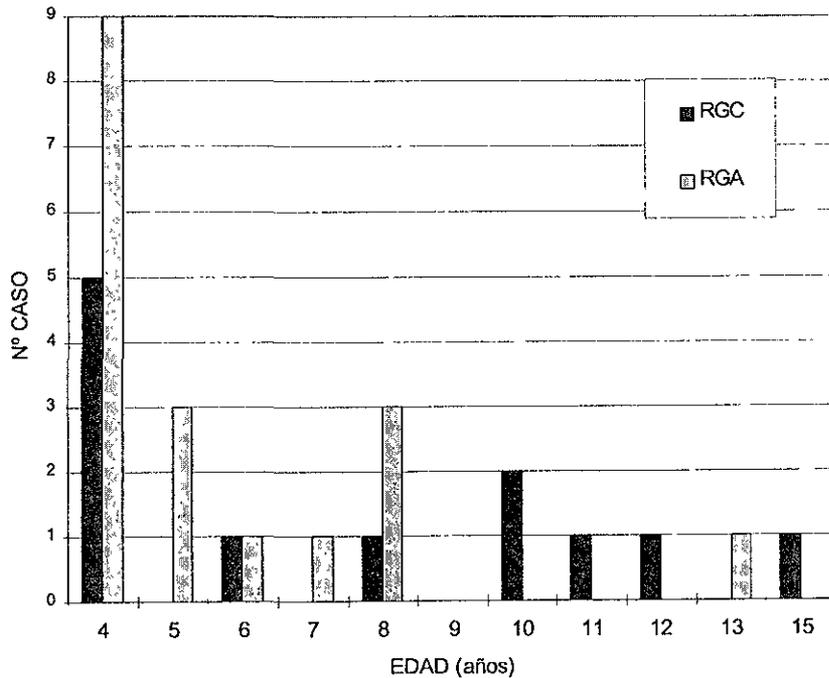
**Gráfica 7.3.** Manifestaciones clínicas más sobresalientes en la infección por RGC.



**Tabla 7.5.** Grupos de edad en los que se presentó la infección por RGC y RGA. Confirmadas por RT-PCR.

EDAD (AÑOS)	Nº DE CASOS POSITIVOS A RGC/ Nº DEMUESTRAS EXAMINADAS	Nº DE CASOS POSITIVOS A RGA/ Nº DEMUESTRAS EXAMINADAS
4	5/54	9/54
5	0/30	3/30
6	1/13	1/13
7	0/4	1/4
8	1/10	3/10
9	0/3	0/3
10	2/6	0/6
11	1/1	0/1
12	1/3	0/3
13	0/1	1/1
15	1/1	0/1
TOTAL	12/126	18/126

**Gráfica 7.4.** Grupos de edad en los que se presentó la infección por RGC y RGA.



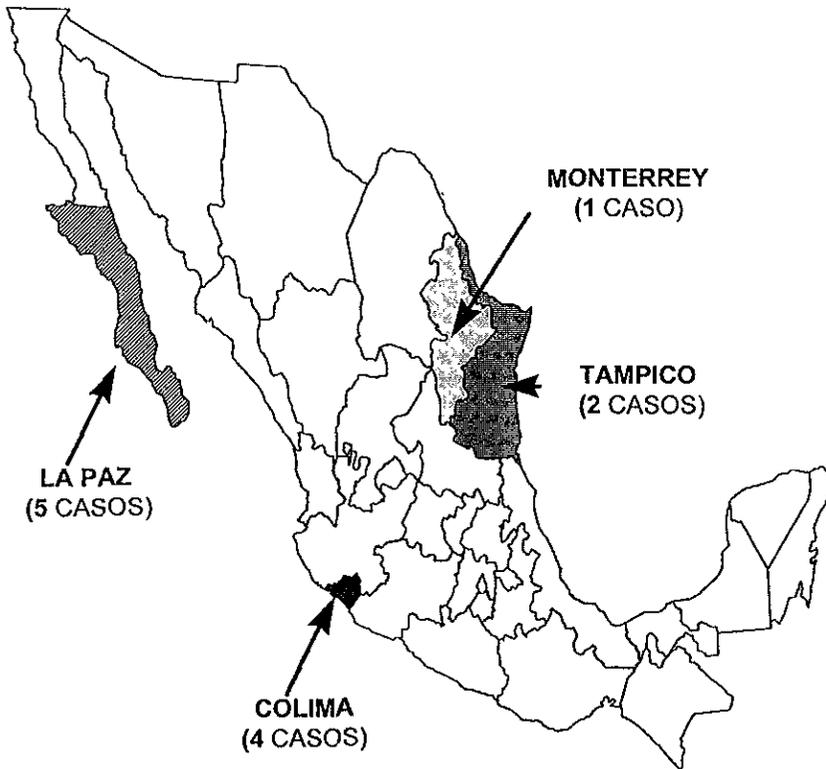


Fig. 7.3. Distribución geográfica de los rotavirus grupo C.

## 8. DISCUSIÓN

La técnica de rotaforesis es una herramienta de laboratorio de gran utilidad para detectar la presencia de los 11 segmentos de dsRNA característico de los rotavirus a partir de materia fecal. Asimismo, nos permite analizar los diferentes perfiles electroforéticos y de esta manera inferir el grupo de rotavirus al que pertenecen, ya que se ha reportado en la literatura que cada grupo (A-G) presenta un electroferotipo característico.

Para confirmar la presencia de RGC y RGA se realizó la RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos de grupo, es importante mencionar que para llevar acabo esta técnica fué necesario obtener el RNA libre de inhibidores por lo que se utilizó la purificación con CF-11 debido a que la materia fecal puede contener sustancias inhibidoras como: polisacáridos, proteínas, lípidos etc. los cuales son de difícil eliminación y pueden interferir en la actividad enzimática de la transcriptasa reversa. La purificación por este método es recomendada cuando se desea detectar agentes patógenos a partir de muestras con grandes cantidades de contaminantes como son

aguas residuales y materia fecal. Así como en el caso de los RGC donde la eliminación de partículas virales en materia fecal es menor con respecto a los RGA.

Los resultados obtenidos por la técnica de rotaforesis y RT-PCR mostraron que existe una alta correlación entre ambas metodologías, ya que sólo 2 muestras positivas a RGA detectadas por rotaforesis no fueron confirmadas por RT-PCR, debido a que posiblemente no hubo una eliminación total de los inhibidores enzimáticos durante la purificación del RNA genómico o bien por que éste se encontraba en muy baja concentración por lo que sería necesaria la utilización de enzimas más sensibles que nos permitieran amplificar cantidades muy pequeñas de RNA. Todas las muestras positivas a RGC por Rotaforesis también lo fueron por RT-PCR.

Al analizar los electroferotipos de RGC que se presentaron en los diferentes estados de la República Mexicana, se observó que en 1997 circularon los electroferotipos Tipo I (La Paz) y Tipo II (Monterrey), mientras que en 1998 únicamente circuló el Tipo III en Colima y Tampico. Lo que nos sugiere que la circulación de los electroferotipos dominantes de RGC pueden variar año con año.

Las diferencias principales entre cada electroferotipo se observaron en la migración de los segmentos 3 y 9 dsRNA, en los segmentos restantes la migración fue similar para todos los estados. Estas diferencias pueden indicar la existencia de diversas cepas de RGC, sin embargo para su caracterización se requiere la realización de estudios específicos en biología molecular lo cual podría ser útil para estudios epidemiológicos de estos agentes virales.

Es importante destacar que en México, Espejo y col. reportaron un caso positivo a RGC (menor de 5 años) de 658 analizados por PAGE en 1984. Sin embargo, este único caso no fue confirmado al grupo perteneciente por RT-PCR.

Este trabajo, es el primer estudio de una búsqueda intencionada para la identificación y confirmación de los RGC a partir de materia fecal de niños con diarrea en México. En este estudio se encontró la presencia de los RGC en un porcentaje de 9.52%, en el grupo de edad analizado (4-18 años), también se encontró a RGA pero en menor proporción con respecto a lo que se presenta en niños menores de 3 años de edad (30-60%). Al respecto, cabe señalar que es de gran importancia el haber demostrado la presencia de RGC en

infantes, ya que actualmente en nuestro país no se conoce nada con respecto a la infección por estos agentes virales.

Las infecciones por RGC registradas durante el año y medio de estudio presentaron un período estacional (Enero a Mayo) que es similar a lo reportado en Tokio (Febrero, Marzo y Junio), pero diferente a lo encontrado en otros países (meses fríos).

Las manifestaciones clínicas más sobresalientes de la infección por RGC fueron diarrea líquida con duración de menos de 72 horas, dolor abdominal, temperatura mayor de 38°C; lo cual correlaciona con las reportadas en la literatura para este virus y no muestran diferencias con las manifestaciones clínicas presentadas por los RGA.

Estudios previos, han reportado que los RGC infectan principalmente a personas mayores de 4 años de edad, pero muy rara vez a niños menores de tres años de edad, en contraste con los RGA donde la infección es más común en menores de 3 años. Los datos obtenidos, demostraron y confirmaron claramente la presencia de RGC en muestras fecales de pacientes de 4 a 15 años de edad con gastroenteritis aguda. Cabe mencionar que la circulación de los RGA disminuyó al aumentar la edad y los RGC se mantuvieron constantes

en este mismo grupo, lo cual correlaciona con lo reportado en la literatura, aunque aparentemente en nuestro país la mayor cantidad de casos se presentó en las edades de 4 y 10 años.

No obstante, debido al número pequeño de muestras positivas obtenidas, no es posible concluir de manera contundente acerca de la prevalencia de estos agentes en niños mayores de 4 años de edad en la población infantil mexicana, ya que para ello se requieren de mayores estudios epidemiológicos que contemplen varios años de estudio.

Mientras que los rotavirus del grupo C han sido reconocidos por más de una década como agentes causales de la gastroenteritis en humanos en diversas partes del mundo, no existen datos en nuestro país que indiquen la presencia de estos agentes patógenos en la población mexicana.

Algunos de los problemas que han afectado de manera importante la detección de estos agentes virales en la población mexicana ha sido la falta de reactivos comerciales para su diagnóstico, reflejando en el pasado la aparente ausencia de estos agentes en nuestro país.

Es importante mencionar que en este estudio no se incluyeron niños menores de 3 años de edad, pero en el año de 1997 en el laboratorio de rotavirus se encontraron 2 casos positivos a RGC en niños de un año de edad. Lo que nos sugiere para estudios posteriores la búsqueda de este agente viral en un rango más amplio de edades y de esta manera conocer el panorama total de la circulación de RGC en nuestro país.

## 9. CONCLUSIONES

Este trabajo nos proporcionó datos relevantes sobre la infección por RGC, mostrando que existe la circulación de este virus en la población mexicana de 4 a 15 años de edad, así como también en niños de 1 año.

En el grupo de edad estudiado se observó que existe la circulación de RGA pero en menor proporción comparado con lo reportado en niños menores de 3 años.

Los RGC presentaron diferentes electroferotipos de acuerdo al lugar de procedencia y variaron de un año a otro lo que podría sugerir que existe la circulación de diferentes cepas en nuestro país.

El período estacional en el que se observó el mayor número de casos positivos por este grupo de rotavirus fue en los meses de Febrero y Marzo.

Las principales manifestaciones clínicas observadas durante la infección por RGC fueron: Diarrea líquida menor a 72 horas, dolor abdominal, vómito, temperatura mayor de 38°C y de 3-8 evacuaciones por día.

La rotaforesis es una herramienta muy útil para el diagnóstico de RGC ya que nos permite observar el electroferotipo característico de este grupo aunque para su confirmación es necesaria la utilización de una técnica más específica como es la RT-PCR.

Basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere la realización de otros estudios encaminados a la caracterización antigénica y genómica de RGC, así como también una vigilancia epidemiológica que nos muestre un panorama general más completo de la circulación de este virus en nuestro país, los cuales incluyan una población más amplia en cuanto a edad, entidades federativas y que contemple varios años de estudio.

## 10. APENDICE

### 1. ACRILAMIDA/BIS-ACRILAMIDA.

Acilamida.....30 g

Bis-acilamida .....0.8 g

Aforara a 100 ml con agua destilada estéril.

### 2. TRIS-ABAJO (pH 8.8)

Pesar 18.17 g de Tris-base y disolver en 40 ml de agua destilada estéril y adicionar 4 ml de SDS al 10%, ajustar el pH a 8.8 y aforar a 100 ml con agua destilada estéril, guardar a 4°C.

### 3. PERSULFATO DE AMONIO AL 2%

Pesar 2 g de Persulfato de amonio, disolver en 70 ml de agua destilada estéril y aforar a 100 ml.

### 4. TEMED

N,N,N',N'- Tetrametilendiamina (TMEDA,TEMED)

este reactivo se emplea como viene en su presentación comercial, almacenar a 4°C.

### 5. SOLUCIÓN "A" (solución de lisis)

Tris-base.....1.6g

EDTA.....1.4g

SDS.....0.65g

NaCl.....2g

Disolver en 20 ml de agua destilada estéril, adicionar 0.6 ml de mercaptoetanol y aforar a 50 ml con agua destilada estéril.

### 6. SOLUCIÓN "B" (Fenol)

El fenol ultra-puro se satura con Tris-EDTA pH de 8, agitar hasta que se disuelva bien y almacenar a 4°C en frasco ámbar.

### 7. SOLUCIÓN "C"

Agarosa.....0.5 g

Disolver con ayuda de calor en 33 ml de agua destilada estéril

Xilen.cianol.....0.2 ml

### 8. SOLUCIÓN "D" 10X

Tris-base.....12 g

Glicina.....57.6 g

Aforar a 500 ml de agua bidestilada estéril

### 9. SOLUCIÓN “E” 10X

Mezclar 3 ml de Ácido acético con 287 ml de Etanol

### 10. SOLUCIÓN “F” 100X

Nitrato de plata.....0.916 g

Disolver en 5 ml de agua destilada estéril

### 11. SOLUCIÓN “G” 125X

Formaldehído al 38%

### 12. SOLUCIÓN “H”

Ácido acético glacial

### 13. FENOL/CLOROFORMO/ALCOHOL ISOAMÍLICO (24:24:1)

Fenol saturado.....24 ml

Cloroformo.....24 ml

Alcohol isoamílico.....1 ml

### 14. AGUA DEPC (Dietilpirocarbonato)

A 1000 ml de agua bidestilada adicionar 1 ml de Dietilpirocarbonato y mantener en agitación durante 12 hr a temperatura ambiente y esterilizar.

15. **SOLUCIÓN DE STE** ( 0.1M NaCl, 0.001M EDTA, 0.05M Tris-base)

pH7.0

NaCl.....0.29 g

EDTA.....0.018g

Tris- base.....0.30 g

Disolver en 30 ml de agua DEPC, ajustar el pH a 7.0 y aforar a 50 ml con agua DEPC.

La solución anterior se mezcla con un volumen igual de etanol al 60%.

16. **SOLUCIÓN DE TBE 10X** (0.089 M de Tris, 0.089 M de Ácido bórico y 2 mM de EDTA) pH8.

Tris-base.....108 g

Ácido bórico.....27.5 g

EDTA.....6.8 g

Aforar a 1 litro con agua destilada estéril.

## 11. REFERENCIAS

1. Bridger JC, Pedley S and Malcolm A. Group C rotaviruses in humans. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 760-763.
2. Saif LJ, Terrett LA, Miller KL and Cross 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.
3. Peñaranda ME, Cubitt WD, Sinarachatanant P, Taylor DN et al. Group C rotavirus infections in patients with diarrhea in Thailand, Nepal and England. *J Infect Dis* 1989; 160: 392-397.
4. Maunula L, Svensson L and Bonsdorff CH. A family outbreak of gastroenteritis caused by group C rotavirus. *Arch Virol* 1992; 124: 269-278.
5. Kuzuya M, Fujii R, Hamano M et al. Rapid detection of human group C rotaviruses by reverse passive hemagglutination and latex agglutination test using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1308-1311.

6. Riepenhoff-Talty M, Morse K, Wang CH, Shapiro C et al. Epidemiology of group C rotavirus infection in Western New York women of childbearing age. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 486-488.
7. Gouvea V, Allen JR, Glass RI, Fang Zhao-Yin, et al. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 519-523.
8. Morin M, Magar R and Robinson Y. Porcine group C rotavirus as a cause of neonatal diarrhea in a Quebec swine herd. *Can J Vet Res* 1990; 54: 385-389.
9. Tsunemitsu H, Saif LJ, Jiang B, Shimizu M et al. Isolation, characterization and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104). *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2609-2613.
10. Ojeh CK, Jiang BM, Tsunemitsu H, Kang SY, Weillnau PA and Saif LJ. Reactivity of monoclonal antibodies to the 41-kilodalton protein of porcine group C rotavirus with homologous and heterologous rotavirus serogroups in immunofluorescence test. *J Clin Microbiol* 1991; 29 :2051-2055.

11. Tsunemitsu H, Jiang B, and Saif LJ. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2129-2134.
12. Tsunemitsu H, Jiang B, Yamashita Y et al. Evidence of serologic diversity within group C rotaviruses. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3009-3012.
13. Jiang B, Dennehy 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.
14. Bremont M, Cohen J and McCrae MA. Analysis of the structural polypeptides of a porcine group C rotavirus. *J Virol* 1988; 62: 2183-2185.
15. Caul EO, Ashley CR, Darville JM and Bridger JC. Group C rotavirus associated with fatal enteritis in a family outbreak. *J Med Virol* 1990; 30: 201-205.
16. Svensson L. Group C rotavirus requires sialic acid for erythrocyte and cell receptor binding. *J Virol* 1992; 66: 5582-5585.

17. Riepenhoff-Talty M, Gouvea V, Evans MJ, Svensson L et al. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *J Infect Dis* 1996; 174: 8-15.
18. Shinozaki K, Yamanaka T, Tokieda M, Shirasawa H and Simizu B. Isolation and serial propagation of human group C rotaviruses in a cell line (CaCo-2). *J Med Virol* 1996; 48: 48-52.
19. Terrett L and Saif LJ. Serial propagation of porcine group C rotavirus (Pararotavirus) in primary porcine kidney cell cultures. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1316-1319.
20. Saif LJ and Jiang B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. *Current Topics in Microbiol Immun* 1994; 185: 339-369.
21. Tsunemitsu H, Jiang B and Saif LJ. Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses. *Arch Virol* 1996; 141: 705-713.
22. Estes MK and Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 1989; 53: 4100-449.
23. Estes MK. Rotaviruses and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM et al. *Virology*, Philadelphia: Raven Publishers 1996; 2: 731-761.

24. Qian Y, Jiang B, Saif L, Kang S et al. Sequence conservation of gene 8 between and porcine group C rotavirus and its relationship to the VP7 gene of group A rotaviruses. *Virology* 1991; 182: 562-569.
25. Kuzuya M, Fujii R, Hamano M et al. Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3185-3189.
26. Fujii R, Kuzuya M, Hamano M, Yamada M and Yamazaki S. Detection of human group C rotaviruses by enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1991; 30: 1307-1311.
27. Jiang BM, Saif LJ, Kang SY and Kim JH. Biochemical characterization of the structural and nonstructural polypeptides of a porcine group C rotavirus. *J Virol* 1990; 64: 3171-3178.
28. Bremont M, Chabanne-Vautherot D, Vannier P, McCrae MA and Cohen J. Sequence analysis of the gene (6) encoding the major capsid protein (VP6) of group C rotavirus: higher than expected homology to the corresponding protein from group A virus. *Virology* 1990; 178: 579-583.

29. Qian Y, Jiang B, Saif LJ, Kang S et al. Molecular analysis of the gene 6 from a porcine group C rotavirus that encodes the NS34 equivalent of group A rotaviruses. *Virology* 1991; 184: 752-757.
30. Jiang B, Tsunemitsu H, Gensch JR, Glass R. Nucleotide Sequence of gene 5 encoding the inner capsid protein (VP6) of bovine group C rotavirus: comparison with corresponding genes of group C, A and B rotaviruses. *Virology* 1992; 190: 542-547.
31. Bremont M, Juste-Lesage P, Chabanne-Vautherot D, Charpilienne A, and Cohen J. Sequences of the four larger proteins of a porcine group C rotavirus and comparison with the equivalent group A rotavirus proteins. *Virology* 1992; 186: 684-692.
32. Espejo RT, Puerto F, Soler C and Gonzalez N. Characterization of a human pararotavirus. *Infect Immun* 1984; 44: 112-116.
33. Terrett L, Saif L, Theil KW and Kohler EM. Physicochemical characterization of porcine pararotavirus and detection of virus and viral antibodies using cell culture immunofluorescence. *J. Clin Microbiol* 1987; 208-272.

34. Nilsson M, Bonsdorff CH and Svensson L. Biosynthesis and morphogenesis of group C rotavirus in swine testicular cells. *Arch Virol* 1993; 133: 21-37.
35. Bohl EH, Theil KW and Saif LJ. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. *J Clin Microbiol* 1984; 19: 105-111.
36. Bohl EH, Saif LJ, Theil KW, Agnes AG and Cross RF. Porcine pararotavirus: Detection, differentiation from rotavirus and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 312-319.
37. Snodgrass DR, Herring AJ, Campbell I, Inglis JM and Hargreaves FD. Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man. *J Gen Virol* 1984; 65: 909-914.
38. Ushijima H, Honma H, Mukoyama A, Shinozaki T et al. Detection of group C rotaviruses in Tokio. *J. Med Virol* 1989; 27: 299-303.
39. Soler C. Rotavirus, En: Giono CS, Escobar GA y Valdespino GJL. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México, D.F: Secretaría de Salud; 1994: 157-172.

40. Theil KW, McCloskey CM, Saif LJ, Redman DR et al. Rapid, simple method of preparing rotaviral double-stranded ribonucleic acid for analysis by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 273-280
41. 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 polyacrilamide gels. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 473-477.
42. Medina FY, Correa BMD, Olivera DH, Soler C, Escobar GA. Manual de técnicas de laboratorio, En: *Biología molecular*. México, D.F: INDRE, Secretaría de Salud; II: 27-45.
43. Huesca C, Echániz G, Figueroa P y Calderón E. Amplificación y detección de DNA y RNA y su aplicación al diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Infectología* 1990; 10: 273-278.
44. Wilde J, Eiden J and Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1300-1307.

45. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B and Fang ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J clin Microbiol* 1990; 28: 276-282.
46. Ericson BL, Graham DY, Mason BB, Estes MK. Identification, synthesis and modifications of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cell. *J Virol* 1982; 42: 825-839.
47. Fang ZY, Glass RI, Peñaranda M, Dong H, Monroe SS. Purification and characterization of adult diarrhea rotavirus: identification of viral structural proteins. *J Virol* 1989a; 63: 2191-2197.
48. Liu M, Offit PA, Estes MK. Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* 1988; 163: 26-32.
49. Ramírez GJE, García LH, Cruz JG. Correlación de grupo, subgrupo, serotipo y electroferotipo de rotavirus en un hospital pediátrico Morelia, Mich. Tesis
50. Espejo R, Romero P, Calderon E, González N. Diagnóstico de rotavirus por electroforesis del RNA viral. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex* 1978; 35: 323-331.