



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA

**Diagnóstico Molecular de Astrovirus Humanos por RT-PCR
en cuadros de Gastroenteritis Aguda Infantil.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

TERESA HERNÁNDEZ ANDRADE



MÉXICO, D.F.

2012



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: AIDA NAVAS PÉREZ

VOCAL: Profesor: ROCÍO GABRIELA TIRADO MENDOZA

SECRETARIO: Profesor: HERLINDA GARCÍA LOZANO

1er. SUPLENTE: Profesor: MARTHA GILES GÓMEZ

2º SUPLENTE: Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE VIRUS GASTROINTESTINALES DEL INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y
REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS (INDRE) DE LA SECRETARÍA DE SALUD**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. HERLINDA GARCÍA LOZANO

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. FABIÁN GÓMEZ SANTIAGO

SUSTENTANTE (S):

TERESA HERNÁNDEZ ANDRADE

AGRADECIMIENTOS

A Dios: por permitirme llegar hasta este momento tan importante en mi vida, por las dichas y tristezas que me forjaron, por poner en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este tiempo.

A mi mamá: por el apoyo moral, tu cariño y comprensión que desde niña me has brindado, por guiar mi camino, por corregirlo en infinidad de ocasiones, por estar junto a mí en los momentos más difíciles y por seguirme amando tanto a pesar de todos mis errores.

A mi papá: porque viste por mí desde pequeña, porque has sido para un hombre maravilloso que Dios puso en mi camino, al que siempre he admirado y lo seguiré haciendo. Por acompañarme en este camino lleno de alegrías, tristezas, miedos, triunfos, entre muchas otras cosas más.

A mis hermanos Montse y Ulises: porque sé que sacrificaron algunas cosas por dejarme terminar mi tarea o dejaron de ver su programa favorito por dejarme estudiar para un examen, aún en contra de su voluntad; por estar ahí en mis triunfos y fracasos; y sobre todo por creer en mí. Espero que esto los aliente a salir adelante y llegar más lejos de lo que eh llegado el día de hoy.

A mis tíos: porque sin su apoyo incondicional, sus sabios consejos, su preocupación, sus palabras de aliento, por ponerme de ejemplo ante sus hijos y sobre todo, por todo ese grande amor que me tienen, no podría ser quien soy ni podría haber llegado hasta donde estoy. Espero que la presente sirva para que mis primos se den cuenta de que los sueños se pueden alcanzar.

A Mi Esposo: porque a pesar de tantas cosas, me enseñaste que no siempre los caminos son fáciles y que tarde o temprano uno tiene que sacrificar comodidades para obtener lo ansiado; porque cambiaste mi forma de ver las cosas y sobre todo porque a tu manera, presionaste para ver concluido este proyecto, 521.

A la Dra Herlinda y a Fabián: porque me acogieron desde el inicio en el laboratorio, porque gracias a sus enseñanzas, regaños (que no fueron muchos) y palabras sabias me forjaron como profesionista y me ayudaron a crecer como ser humano; porque los tres pusimos mucho esfuerzo y muchas horas extra para poder ver concluido este trabajo y porque han depositado en mí mucha más confianza de la que creo merecer.

A mis amigos de la fac: por compartir tantos momentos, tantas horas en la facultad, juegos, alegrías (al sacar 10 en las prácticas o exámenes, jeje), tristezas (cuando reprobábamos o no salían las benditas prácticas!!); por las mil horas en el messenger haciendo los reportes, entre muchas otras cosas más. Gracias por su hombro cuando lo necesité y gracias por reír conmigo.

A mis compañeros de trabajo de Rotavirus: porque me dejaron ser parte de su equipo desde el primer día que llegué; porque me enseñaron que el compañerismo en el trabajo es importante para sacar a flote el laboratorio, que las cosas no siempre son lo que parecen; y sobre todo por colaborar con la realización de ésta tesis.

Y a esas personitas tan importantes para mí y que aunque no están físicamente conmigo, sé que contribuyeron en gran manera a llegar hasta donde estoy, de ser quién soy y de procurarme cada uno de mis días: **abuelita Tere, abuelita Panchita, abuelita Paula, abuelito José.**

GRACIAS

“La Enseñanza que deja huella no es la que se hace de Cabeza a Cabeza, sino de Corazón a Corazón”

CONTENIDO

Capítulo / Tema	Página
Agradecimientos.	
Índice.	I
Índice de abreviaturas	IV
Índice de figuras.	VI
Índice de Tablas.	VIII
Introducción.	IX
1. Marco teórico.	1
1.1 Importancia de la Gastroenteritis Viral.	2
1.2 Perspectiva histórica de los Astrovirus.	3
1.3 Aspectos generales de los Astrovirus.	6
1.3.1 Clasificación de la familia <i>Astroviridae</i> .	6
1.3.2 Morfología de Astrovirus Humanos (HAstVs).	6
1.3.3 Ciclo replicativo de HAstVs.	8
1.3.4 Organización Genómica de HAstVs.	10
1.3.5 Serotipos y genotipos de HAstVs.	14
1.4 Aspectos Clínicos de HAstVs.	14
1.4.1 Patogénesis.	14
1.4.2 Transmisión.	15

Capítulo / Tema	Página
1.4.3 Manifestaciones clínicas.	16
1.4.4 Inmunidad.	16
1.4.5 Tratamiento para la infección por HAstVs.	16
1.4.6 Vacunas.	18
1.4.7 Prevención.	19
1.5 Técnicas de diagnóstico para Astrovirus humanos.	19
1.6 Epidemiología de las infecciones por Astrovirus humano.	23
1.6.1 A nivel Mundial	23
1.6.2 A nivel Nacional y Latinoamérica	25
1.6.3 Estacionalidad	26
2. Justificación.	28
3. Hipótesis.	29
4. Objetivo General.	30
5. Objetivos Particulares.	30
6. Materiales y Métodos.	31
6.1 Organigrama general de trabajo.	32
6.2 Material biológico y controles del ensayo.	33
6.3 Preparación de las muestras primarias para el diagnóstico de HAstVs	33
6.4 Criterios de inclusión y exclusión de las muestras clínicas.	33

6.5 Diagnóstico de HAstVs por Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).	34
Fundamento	34
Procedimiento de la ELISA	35
6.6 Extracción y purificación de ARN viral.	37
Fundamento.	37
Procedimiento.	37
6.7 Selección de los iniciadores para la detección de HAstVs.	39
6.8 Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la detección de HAstVs.	40
6.9 Electroforesis en geles de agarosa.	41
Fundamento.	41
Procedimiento.	41
6.10 Secuenciación y Análisis Filogenético de los productos de cADN obtenidos.	42
7. Resultados.	43
8. Discusión.	61
9. Conclusiones.	72
10. Bibliografía.	73

INDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Aa	Aminoácidos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
Ca-Co2	Células de Carcinoma de Colón
dNTP's	Desoxiribonucleótidos trifosfato
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotritol
EDA	Enfermedad Diarreica Aguda
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático
ME	Microscopía Electrónica
EtBr	Bromuro de etidio
GA	Gastroenteritis Aguda
HAsVs	<i>Astrovirus humano</i>
HAsVs-1	<i>Astrovirus humano</i> serotipo 1
HAsVs-2	<i>Astrovirus humano</i> serotipo 2
HAsVs-3	<i>Astrovirus humano</i> serotipo 3
HAsVs-4	<i>Astrovirus humano</i> serotipo 4
HAsVs-5	<i>Astrovirus humano</i> serotipo 5
HAsVs-6	<i>Astrovirus humano</i> serotipo 6
HAsVs-7	<i>Astrovirus humano</i> serotipo 7
HAsVs-8	<i>Astrovirus humano</i> serotipo 8
HEK	Células embrionarias de riñón de origen humano
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía
IFA	Inmunofluorescencia
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
Kb	Kilobases
LLC-MK2	Células epiteliales de riñón del mono Rhesus
MBL-1	<i>Astrovirus humano</i> serotipo MBL-1
μl	Microlitros
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPV	Vacuna Oral contra la polio
ORF's	Marcos de lectura abiertos
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBK	Células primarias de riñón de baubino

INDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
RT-PCR	Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa
SPIEM	Microscopía Electrónica en Fase Sólida
UV	Ultravioleta
µg/mL	Microgramos / mililitro
UTR's	Regiones flanqueantes no traducidas (untranslated regions)
V	Volts

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Electromicrofotografías de los diferentes virus gastrointestinales.	3
FIGURA 2: Cronología del estudio y diagnóstico de <i>Astrovirus humano</i> .	5
FIGURA 3: Clasificación taxonómica de <i>Astrovirus</i> .	6
FIGURA 4: Estructura tridimensional de la cápside de <i>Astrovirus humano</i> .	7
FIGURA 5: Tipos de replicación viral.	9
FIGURA 6: Esquema de la organización genómica de <i>Astrovirus humano</i> .	10
FIGURA 7: Esquema de los tres marcos de lectura (ORF's) de HAsVs.	12
FIGURA 8: Esquema del genoma y procesamiento proteolítico de la lipoproteína estructural de HAsVs.	13
FIGURA 9: Organigrama general de trabajo.	32
FIGURA 10: Diagrama del Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para la detección de HAsVs	36
FIGURA 11: Diagrama de la técnica de extracción y purificación del RNA viral por medio del kit comercial Qlamp.	38
FIGURA 12: Ubicación de los iniciadores MON 340 / MON 348 utilizados para la detección de HAsVs.	39
FIGURA 13: Identificación de las muestras positivas a HAsVs mediante la técnica de ELISA.	44
FIGURA 14: Gel de agarosa al 1.5% para la detección de HAsVs.	47
FIGURA 15: Electroferograma obtenido de la secuenciación del control positivo de HAsVs.	47
FIGURA 16: Gel de agarosa al 1.5% para la prueba de reactividad cruzada de los iniciadores MON340/Mon 348 en la identificación de HAsVs.	48
FIGURA 17: Gráfica del límite de cuantificación para el control positivo de HAsVs.	49

FIGURA 18: Gel de agarosa al 1.5% para la prueba de límite de detección de cADN de HAstVs.	50
FIGURA 19: Gel de agarosa al 1.5% para la prueba de variación de la cantidad de enzima Titán en la RT-PCR de HAstVs.	51
FIGURA 20: Gel de agarosa al 1.5% para la detección de HAstVs con diferentes volúmenes de ARN molde.	52
FIGURA 21: Amplificación de la región de la polimerasa de HAstVs utilizando ARN molde almacenado a diferentes temperaturas.	53
FIGURA 22: Gel de agarosa al 1.5% representativo de las muestras clínicas analizadas por RT-PCR para el diagnóstico de HAstVs.	54
FIGURA 23: Graficas comparativas en % de las técnicas diagnósticas para la identificación de HAstVs.	55
FIGURA 24: Distribución de casos positivos a HAstVs en México.	57
FIGURA 25: Frecuencia de los casos positivos a HAstVs con respecto al grupo de edad.	57
FIGURA 26: Frecuencia de los casos positivos a HAstVs con respecto al género de la población del estudio	58
FIGURA 27: Estacionalidad de HAstVs durante el periodo de estudio.	59
FIGURA 28: Árbol filogenético de las cepas de HAstVs circulantes en México.	60

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Epidemiología de HAstVs.	27
TABLA 2: Iniciadores para la detección de HAstVs.	39
TABLA 3: Resultados de las muestras procesadas por ELISA para la detección de HAstVs.	45
Tabla 4: Valores de concentración del control positivo en la prueba del límite de cuantificación.	49
Tabla 5: Variación de la cantidad de enzima Titán en la mezcla de reacción de la RT-PCR para HAstVs.	51
Tabla 6: Variación en la cantidad de ARN molde en la mezcla de reacción para la identificación de HAstVs.	52
Tabla 7: Comparación de las técnicas diagnósticas para la identificación de HAstVs en muestras clínicas.	54
Tabla 8: Datos generales de las muestras clínicas positivas a la identificación de HAstVs por la técnica de RT-PCR.	56

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) es un problema de Salud Pública y representa una causa importante de morbilidad y mortalidad en la población infantil entre 7 meses y 2 años de edad. Anualmente, causa la muerte de 4 millones de niños menores de 5 años en Asia, África y América Latina.

La importancia de los *Astrovirus humanos* (HAstVs) asociados a la EDA infantil ha sido documentada en la literatura a medida que se han desarrollado métodos de prueba para el diagnóstico en el laboratorio con una alta sensibilidad y especificidad para su identificación; los cuales han permitido una mejor comprensión de la epidemiología de éste agente viral. Actualmente, se han identificado nueve serotipos (equivalentes a los genotipos existentes) de HAstVs (HAstV-1 / HAstV-8 y el MLB1) con base en su reactividad con anticuerpos policlonales, mediante ensayos de inmunomicroscopía electrónica, inmunofluorescencia, neutralización, inmunoenzimáticos y con técnicas moleculares como la genotipificación y el análisis de secuencias.

En México existen escasos estudios sobre el papel que juegan estos agentes en la EDA en la población infantil, por lo tanto, en este trabajo se pretende el uso de técnicas de biología molecular, como la RT-PCR con el propósito de ampliar la cobertura diagnóstica de la gastroenteritis viral, así como conocer el panorama epidemiológico de HAstVs en el país. Para éste fin, se seleccionaron 812 muestras de pacientes menores de 5 años que presentaron cuadros de gastroenteritis aguda (GA) con deshidratación severa, pero negativas a Rotavirus por la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). Se realizó un tamizaje inicial por medio del inmunoensayo enzimático (ELISA) para HAstVs, a partir de lo cual se seleccionó como control positivo la muestra con clave 1852 para la optimización de la técnica de RT-PCR.

Para dicho proceso se consideraron las siguientes variables:

- **Reactividad cruzada de los iniciadores Mon 340/348:** donde se incluyeron muestras positivas a otros virus gastrointestinales (Cepa prototipo PRICE de Rotavirus; Adenovirus y Norovirus) y únicamente se obtuvo amplificación la muestra positiva a HAstVs.
- **Límite de cuantificación y de detección:** donde se obtuvo que a una dilución 2×10^{-1024} de la muestra control, aún podía observarse una amplificación.
- **Variación en la cantidad de enzima:** Se probaron con diferentes cantidades de enzima Titán, llegando a la conclusión del uso de 1 μ L en la mezcla de reacción.
- **Variación en el volumen de ARN molde:** de igual manera en que se varió el punto anterior, se realizó con el ARN molde, observando que 5 μ L de ARN molde era óptimo para una amplificación adecuada.
- **Variación de la temperatura de almacenamiento de los extractos de ARN viral:** durante el ensayo, se pudo observar que la intensidad de la banda que se asocia a la amplificación del control positivo disminuía considerablemente. Dicho control se almacenaba a -20° C; por lo tanto se consideró la posibilidad de almacenarlo a -70° C; observando que en esta última temperatura ya no había una degradación de consideración.

Una vez optimizada la RT-PCR, se seleccionaron 28 muestras positivas, 5 muestras indeterminadas y 112 muestras negativas a ELISA para su análisis por la técnica de RT-PCR; obteniéndose un 26.9% de muestras positivas para la detección HAstVs por esta técnica; donde el grupo de edad con mayor incidencia fue del rango de los 7-24 meses, observando una mayor presencia en los meses de invierno (diciembre-enero) en los estados de Tamaulipas y Michoacán.

Por otra parte, se observó que 11 muestras negativas a HAstVs e identificadas por ELISA, fueron positivas mediante la técnica de RT-PC, demostrando que ésta última es mucho más sensible y específica que el ELISA.

El trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Virus Gastrointestinales del Departamento de Virología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). La obtención de los recursos para su elaboración fueron obtenidos con el apoyo del InDRE y del Proyecto CONACYT SALUD-2009-01-113740 *“Desarrollo de un Programa de Vigilancia Epidemiológica de la Gastroenteritis Viral Infantil en México”*, bajo la dirección de la Dra. Herlinda García Lozano y la asesoría técnica del M en C Fabián Gómez Santiago.

1. Marco Teórico.

1.1 Importancia de la Gastroenteritis Viral.

La enfermedad diarreica aguda (EDA) es un problema de Salud Pública y representa una causa común de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo. Diversos estudios han demostrado que existen más de 700 millones de casos de diarrea aguda por año, y que el grupo de edad más propenso a sufrir esta enfermedad son los niños menores de 5 años. La mortalidad asociada con la gastroenteritis ha sido estimada entre 3 y 5 millones de casos por año, de los cuales, la mayoría han ocurrido en países en vías de desarrollo (Wilhelm, I. y col. 2003).

La Gastroenteritis Aguda (GA) tiene diversos agentes etiológicos, entre los que destacan: *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.* y *Shigella sp.*, principalmente en adultos, mientras que en infantes, son los virus los principales agentes causales (Rotavirus). La gastroenteritis infecciosa producida por agentes de etiología desconocida continúa siendo una causa importante de enfermedad y muerte en países desarrollados y en vías de desarrollo (Eiros, J. y col. 2007).

Desde 1940, los virus han sido asociados como agentes que dan origen a la GA, así como las bacterias y los parásitos. Pero no fue hasta 1972 que Kapikian y su grupo de investigación identificaron por primera vez al virus Norwalk en heces, después de un brote de diarrea, como una causa de gastroenteritis aguda. Un año más tarde, Bishop y su grupo de trabajo observaron la presencia de Rotavirus en la mucosa intestinal de un niño con GA, y es hasta 1975 que Astrovirus y Adenovirus entérico fueron identificados en heces de niños con GA. Desde entonces, el número de virus asociados con la GA ha ido incrementándose. De esta manera, los Coronavirus, Picobirnavirus, Pestivirus y Torovirus, que producen diarrea en animales, han emergido como causantes de gastroenteritis viral en humanos (Wilhelm, I. y col. 2003).

Principalmente, los agentes patógenos virales más asociados a la Gastroenteritis Viral Aguda (GVA) son: Rotavirus, Calicivirus humanos (que comprende los géneros Norovirus y Sapovirus), Astrovirus, Aichivirus y Adenovirus entéricos 40 y 41 (figura 1) (Chen S. y col, 2007; Le Guyader, F. y col. 2008).

De los agentes antes mencionados, los **rotavirus** constituyen la causa más importante de deshidratación aguda en niños; sin embargo también los otros agentes virales son asociados como agentes que causan gastroenteritis aguda en niños (Rodríguez, N., y col. 2002; Le Guyader, F., y col. 2008).

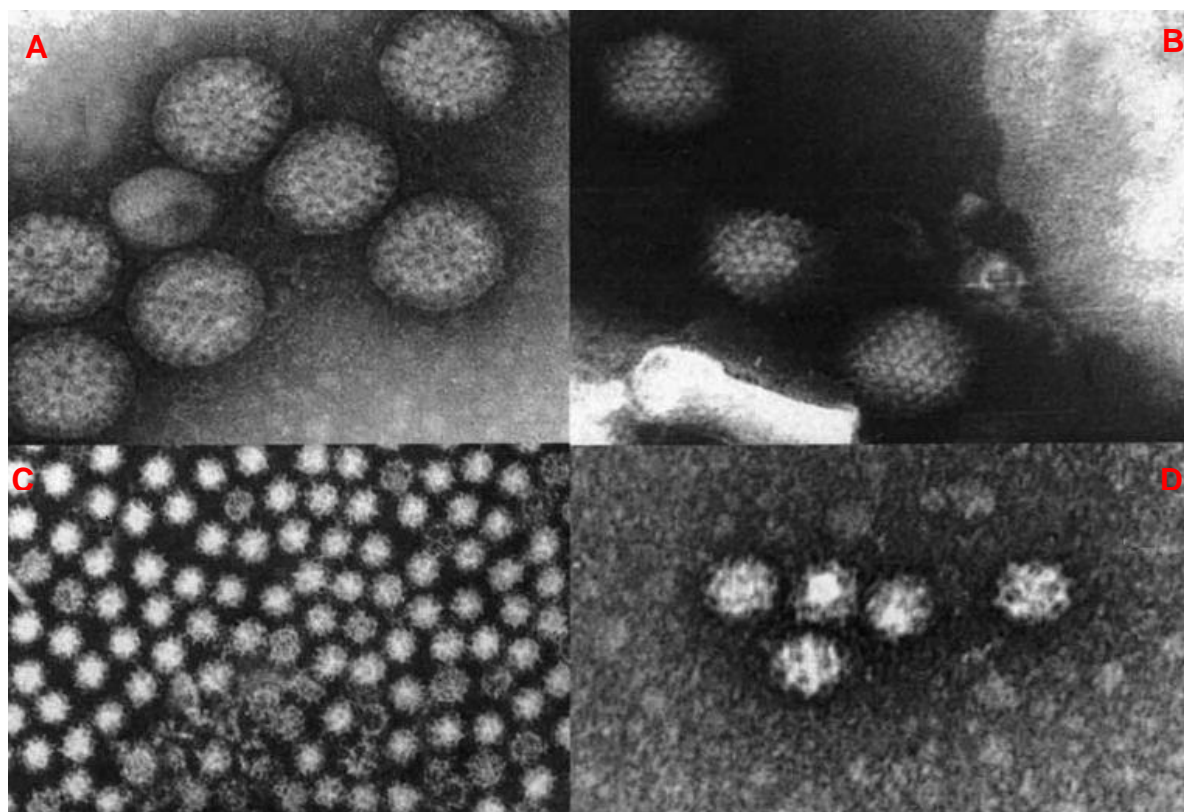


Figura 1: Electromicrofotografías de los diferentes virus gastrointestinales. Podemos observar que las electromicrofotografías corresponden a: A) *Rotavirus* Humano; B) *Adenovirus* entérico; C) *Astrovirus* humanos, D) *Calicivirus* humanos. Bar = 50nm. Referencia: Wilhelm, I.; Roman, E.; Sánchez-Fauquier, A. Viruses causing gastroenteritis. Clin Microbiol Infect 2003;

1.2 Perspectiva histórica de los Astrovirus.

Astrovirus humano fue asociado por primera vez con la gastroenteritis aguda en 1975 por Appleton y Higgins cuando reportaron un brote de diarrea leve y vómito en infantes de un centro de maternidad en la ciudad de Scottish, Inglaterra (Appleton, A. y col 1975). Meses después, por medio de la microscopía electrónica, Madeley y Cosgrove pudieron observar partículas pequeñas, de aproximadamente 28 nm de diámetro en las heces de lactantes hospitalizados con diarrea y en brotes de gastroenteritis en las estancias de recién nacidos, con una apariencia de estrella de 5 a 6 picos, a las que denominaron *Astrovirus* (del griego *astron*=estrella). En un estudio retrospectivo realizado por Mansi y colaboradores en un tipo diferente de

hepatitis en patos, se encontraron partículas virales de las características del Astrovirus tanto en heces como en el hígado de las aves. Subsecuentemente, los Astrovirus fueron asociados con la gastroenteritis en una gran variedad de mamíferos y aves, incluyendo corderos, terneras, venados, lechones, gatos, ratones, perros y pavos. Diversos estudios asociaron a los Astrovirus a una gran variedad de especies, demostrando que la infección de este agente es específica de cada género, por lo que en la actualidad no se cuenta un modelo animal para el estudio de la infección provocada por Astrovirus en humanos (Eiros, J. y col. 2003; Rohayem, J. y col. 2004).

En 1981, Lee y Kurtz reportaron el primer aislamiento de *Astrovirus Humano* (HAstVs) en células embrionarias de riñón de origen humano (HEK, por sus siglas en inglés *Human Embryonic Kidney*), seguido de pases seriados en células epiteliales de riñón de mono Rhesus (LLCMK2, por sus siglas en inglés *Rhesus monkey kidney epithelial cells*) en presencia de tripsina. Este descubrimiento, además de establecer la presencia de 5 serotipos de HAstVs en 1984, permite la diferenciación de éste virus con otros agentes, tales como *Norwalk*, el cual no puede crecer en cultivo celular (Mustafa, H. y col. 2000, Willcocks, M., y col. 1990).

En 1988, con ayuda del cultivo celular y del ensayo inmunoenzimático, Hermann y colaboradores desarrollaron anticuerpos monoclonales específicos de Astrovirus, lo cual hizo el diagnóstico más específico. En este mismo año, Willcocks y su grupo de trabajo infectaron células de carcinoma de colon humano (CaCo-2), con muestras de heces obtenidas de un brote de gastroenteritis en niños de Reino Unido, donde el HAstVs-1 fue el agente causal (Herrmann, J. y col. 1991, Willcocks, M. y col. 1990).

En 1989 se identificó en Reino Unido el serotipo 6 de HAstVs. Dos años más tarde, en el mismo lugar, se identificó al serotipo 7 (Guix, S. 1999).

En los años noventa, se confirmó la importancia clínica de los Astrovirus como agentes causales de gastroenteritis viral en niños a raíz de numerosos estudios epidemiológicos. (Guix, S. 1999).

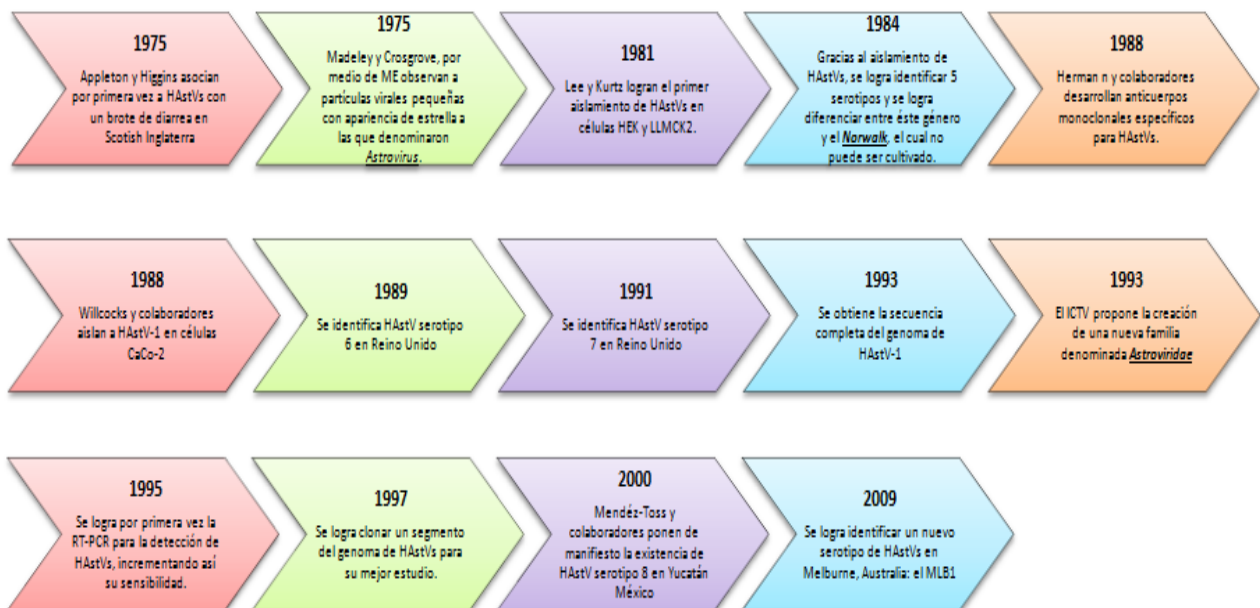
En 1993, con la ayuda de técnicas de biología molecular, es secuenciado el genoma completo de HAstVs-1. Durante este año, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés) propone la creación de la familia *Astroviridae* para clasificar a los *Astrovirus* (Monroe, S. y col. 1993).

En 1995, se logra por primera vez, una transcripción reversa y una reacción en cadena de la polimerasa para la detección de Astrovirus, lo que incrementa la sensibilidad de detección de este agente viral (Guix, S. 1999). Dos años más tarde se logra clonar un segmento del genoma de HAstVs para el estudio de su replicación viral (Geigenmüller y col., 2002).

En México, Méndez – Toss y colaboradores reportaron la secuencia completa del genoma completo del serotipo 8 (HAstV-8) que fue reportado en Yucatán (Méndez-Toss, M. y col. 2000).

Finalmente, en un estudio realizado en el año 2009, que consistió en un análisis retrospectivo de un brote de GA en niños menores de 2 años en Melbourne, Australia, se identificó un nuevo serotipo de HAstVs, el MLB1 (Finkbeiner, S. y col. 2009).

Figura 2: Cronología del estudio y diagnóstico de los Astrovirus humanos.



1.3 Aspectos generales de los Astrovirus.

1.3.1 Clasificación de la familia *Astroviridae*.

En 1993, el Comité Internacional de Taxonomía (ICTV) propuso, para la clasificación de los *Astrovirus*, una familia diferente de virus monocatenario de polaridad positiva a las existentes (*Picornaviridae* y *Caliciviridae*), ya que el análisis de sus proteínas y el ARN sintetizado durante el cultivo celular, comparado con las demás familias de virus existentes, demostró que éste no se comportaba de igual manera, razón por la cual se decidió clasificar a los *Astrovirus* dentro de la familia *Astroviridae* (Kurtz, J. y col. 1987).

Años más tarde, el ICTV propuso la bifurcación de la familia *Astroviridae* en dos géneros: *Mamastrovirus* (*Astrovirus* de mamíferos) y *Avastrovirus* (*Astrovirus* en aves) (ver figura 3) (Monroe, S. y col. 1993):

Familia: <i>Astroviridae</i> Grupo IV (ssRNA (+))	
Género:	Especie:
<i>Mamastrovirus</i>	Astrovirus Bovino Astrovirus Felino Astrovirus Humano Astrovirus Ovinos Astrovirus Porcino Astrovirus de vison
<i>Avastrovirus</i>	Astrovirus de pollos Astrovirus de patos Astrovirus de pavos

Figura 3: Clasificación taxonómica de Astrovirus.
Referencia: Virus taxonomy. Seventh report of International Committee on taxonomy of Viruses (eds. Van Regenmortel, M. H., Fauquet, C.M. & Bishop, D. H., 2005)

1.3.2 Morfología.

Los Astrovirus son virus pequeños de aproximadamente 28 nm de diámetro con una cápside con apariencia de estrella de 5-6 picos (figura 4); sin embargo esta morfología sólo está presente en el 10% de los casos, debido a que ésta particularidad únicamente se pone de manifiesto si la muestras se somete a altos niveles de pH (Guix S. y col, 1999).

Sin embargo, otros estudios sugieren una morfología diferente, una cápside con apariencia icosaédrica, de un diámetro de 41 nm, con espículas bien definidas y no envuelto (Guix S. y col. 1999).

Proteínas estructurales y no estructurales.

Las proteínas estructurales del *Astrovirus*, no se han estudiado por completo, aunque se sugiere que el precursor de las proteínas de cápside, una lipoproteína de 87 kDa, da lugar a las proteínas de la cápside VP34, VP29 y VP27 (Guix S. y col. 1999).

En general, se considera que las cápsides víricas maduras e infecciosas están compuestas por tres proteínas mayoritarias con un tamaño de 35-32 kDa (VP34), 31-27 kDa (VP29) y 26-24 kDa (VP26). (Willcocks, I. y col. 1990; Monroe, S. y col. 1993; Belliot, G. y col. 1997; Bass, D. y col. 2000).

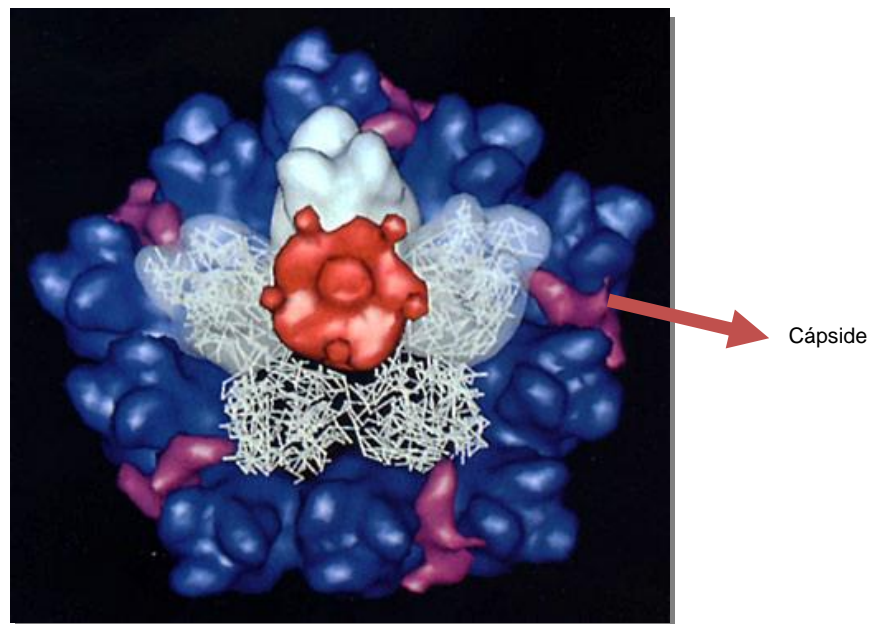


Figura 4: Estructura tridimensional de la cápside de Astrovirus humano. La imagen se obtuvo usando microscopía electrónica y técnicas computacionales de procesamiento de imágenes.

Estas proteínas, especialmente VP26, son responsables de la variación antigénica observada entre los diferentes serotipos de Astrovirus (Guix S. y col. 1999). Ensayos de anticuerpos monoclonales contra HAstVs sugieren que VP26y/o VP29 son los involucrados en la neutralización y la inmunidad heterotípica de éste virus.

1.3.3 Ciclo Replicativo.

El esquema de replicación, transcripción y traducción propuesto para HAstVs deriva del modelo de *Alphavirus*, debido a que presenta una organización genómica similar y sintetizan las proteínas estructurales de la cápside a partir de un ARN subgenómico, como lo hace HAstVs. El ciclo replicativo, en general, se divide en tres fases principales:

a) *Unión y penetración a la célula huésped.* Esta etapa incluye la *aproximación o acercamiento* de la partícula viral infecciosa a la superficie de la célula blanco, en donde juegan un papel importante las cargas eléctricas presentes en la superficie del virión y de la célula, además de la fluidez de las membranas celulares y virales; la *adsorción* o unión entre el virión y la célula blanco que tiene lugar debido a los elementos complementarios entre las partes. De un lado el virus aporta las proteínas de unión y por otro lado las células aportan los receptores de membrana; y finalmente la *penetración o entrada* del virión. En los organismos complejos como el cuerpo humano los virus pueden penetrar a su hospedero a través de las superficies corporales (piel y membranas mucosas). Los virus animales una vez superadas las barreras para su entrada, poseen varios mecanismos para el ingreso al interior de las células. Primero por un mecanismo de englobamiento endocítico que se conoce como viropexis (Wang, Q. y col. 2001).

b) *Transcripción y replicación del genoma viral.* En ésta etapa se encuentra los procesos de: *desnudamiento* que es el proceso de remoción de la cápside o envolturas virales que permite la liberación del ácido nucléico, este hecho permite que la información genética viral interactúe con la maquinaria biosintética de la célula huésped; la *transcripción* que se define como el proceso por el cual se transfiere la información genética de una secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucléico a otra. En los virus que poseen ARN de polaridad positiva (+) es decir que el genoma se comporta como un ARNm (Togaviridae, Picornaviridae), éste puede ser usado directamente para la síntesis de proteínas, sin requerir la síntesis de ácidos nucleicos complementarios; la *translación*, es el proceso por el cual se sintetiza una cadena polipeptídica a partir de la información genética presente en el ARNm; la *replicación del material genético*, durante esta fase tiene lugar la síntesis de ARN o ADN viral que sigue el esquema de Watson y Crick de bases

complementarias. También se incluye *la síntesis proteica tardía*, donde las proteínas son sintetizadas en la célula infectada después que ha ocurrido la replicación de los nuevos genomas virales. Durante esta fase del ciclo infeccioso se sintetizan proteínas estructurales del virión; el *ensamblaje*, donde se da la organización de las macromoléculas virales (proteínas y ácidos nucleicos) tendientes a la formación de viriones maduros. En el caso de virus desnudos la cápside se ensambla alrededor del genoma viral. Durante esta fase hay una gran expresión de antígenos virales sobre la superficie de la membrana celular. Estos antígenos pueden ser el blanco de los anticuerpos y complemento (Wang Q. y col. 2001).

c) *Salida de las nuevas partículas virales*. Durante esta fase ocurre la salida de los viriones infectantes. Hay dos procesos que pueden tener lugar, de un lado la citólisis y por otro lado los virus pueden ser liberados por un proceso de gemación; este último es un proceso de citosis inversa que si no produce daño a la membrana celular y puede conllevar a infecciones latentes. El genoma viral integrado es denominado un provirus (Wang Q. y col. 2001).

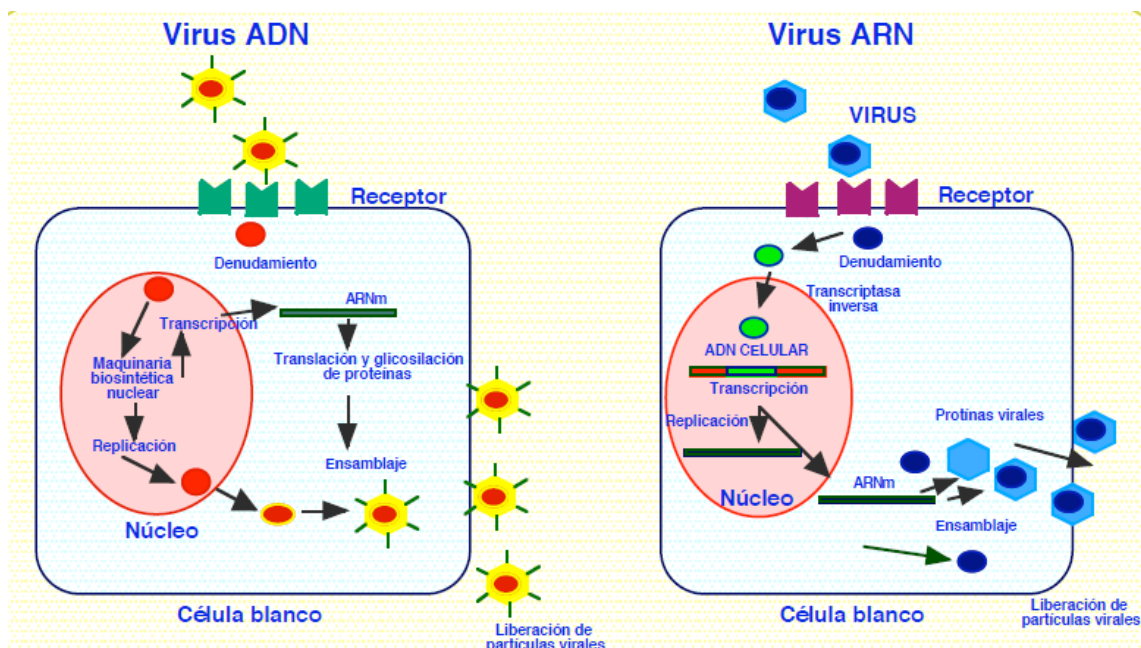


Figura 5: Tipos de Replicación Viral.

Referencia: www.medicina.unal.edu.co/Departamentos/.../Replicacion_Viral.pdf 2010

1.3.4 Organización genómica.

El genoma del HAstVs está compuesto por una sola cadena de ARN poliadenilado en el extremo 3' de sentido o polaridad positiva, de un peso total aproximado de entre 6.8 – 7.2 kb (Reis, H. y col. 2007).

Además del ARN genómico, durante el ciclo replicativo del HAstVs también se producen moléculas de ARN subgenómico de un tamaño aproximado de 2.8 kb de polaridad positiva a partir del extremo 5' del ARN anti-genómico. Dicho ARN se utiliza para la síntesis de las proteínas estructurales de la cápside (Monroe, S. y col. 1993).

El genoma de HAstVs posee tres marcos de lectura abiertos (ORFs, por sus siglas en inglés *Open Reading Frame*). ORF1a y ORF1b que codifican para la proteasa y polimerasa viral, respectivamente y son secuencias altamente conservadas. En contraste, el ORF2 codifica para la proteína precursora de la cápside a partir del ARN subgenómico y es muy variable en el extremo 3' terminal del genoma (figura 6).

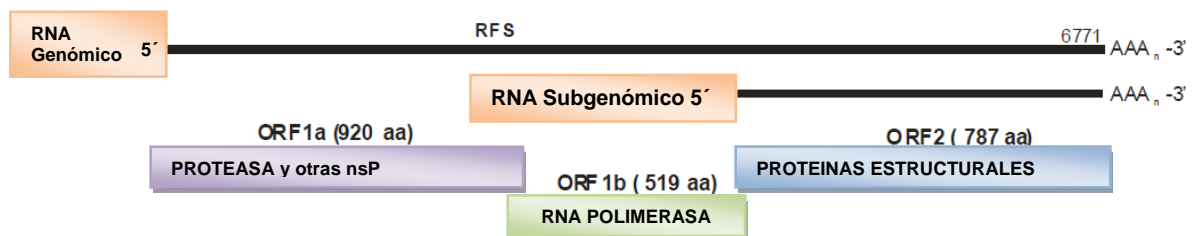


Figura 6: Esquema de la organización genómica del Astrovirus humano. En este esquema se representan los 3 ORF's y el ARN subgenómico que posee HAstVs serotipo 1. Referencia: Caballero, Santiago., 2004

Entre el ORF1a y el ORF 1b existe un solapamiento de 61 y 73 bases, según el serotipo, mientras que el solapamiento entre el ORF1b y el ORF2 es de 8 bases. En el extremo 3' del genoma hay una secuencia no traducida (3'-UTR (regiones flanqueantes no traducidas, por sus siglas en inglés *untranslated regions*.) y una cola de treinta adeninas (Caballero S. y col. 2004).

El ORF1, que codifica para una proteína no estructural (lipoproteína), presenta varios dominios transmembranales que pueden estar implicados en el anclaje del complejo de replicación del material genético vírico a las membranas celulares. Además posee un dominio de proteasa viral perteneciente al grupo de las proteasas tipo 3C – serín proteasa que posee un alto grado de homología con las proteasas de dos virus de la familia *Caliciviridae*: el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) y el Calicivirus felino. En este mismo dominio se han identificado la presencia de un epítipo inmunorreactivo y de un dominio de muerte (*death domain*), relacionados con la activación del proceso de apoptosis de células infectadas. En el extremo carboxi-terminal se ha identificado la presencia de una señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés *Nuclear Localization Signal*) aunque su significado biológico en el ciclo replicativo de HAstVs aún no está definido (Jiang, B. y col. 1993).

ORF1b codifica para una lipoproteína (nsP1b) de entre 515 y 519 aminoácidos dependiendo del serotipo de HAstVs. En esta lipoproteína destaca principalmente un motivo de ARN polimerasa que es altamente conservado en Astrovirus animales y humanos y que se ha propuesto ser el sitio activo de ésta ARN polimerasa (Caballero, S. y col. 2004).

La lipoproteína que codifica el ORF2 tiene un tamaño variable según el serotipo del HAstVs que oscila entre los 782 y los 796 aminoácidos. En un estudio realizado por Wang y col. (2001), la secuencia del ORF2 se dividió en 4 regiones (figura 7) (Wang Q. y col. 2001; Caballero S. 2004):

- Región I: es la zona más conservada entre todos los serotipos. Abarca del aminoácido (aa) 1 al 415 aa. Es una zona rica en residuos básicos que se ha relacionado con el empaquetamiento del ARN vírico.
- Región II: entre los aa 416 y 648. Presenta un ligero grado de variabilidad entre los diferentes serotipos.
- Región III: entre los aa 649 al 707. Es la zona con mayor variabilidad entre los diferentes serotipos con presencia de inserciones y/o deleciones.
- Región IV: del aa 708 al final. Zona donde se vuelve a presentar un alto grado de similitud entre los serotipos.

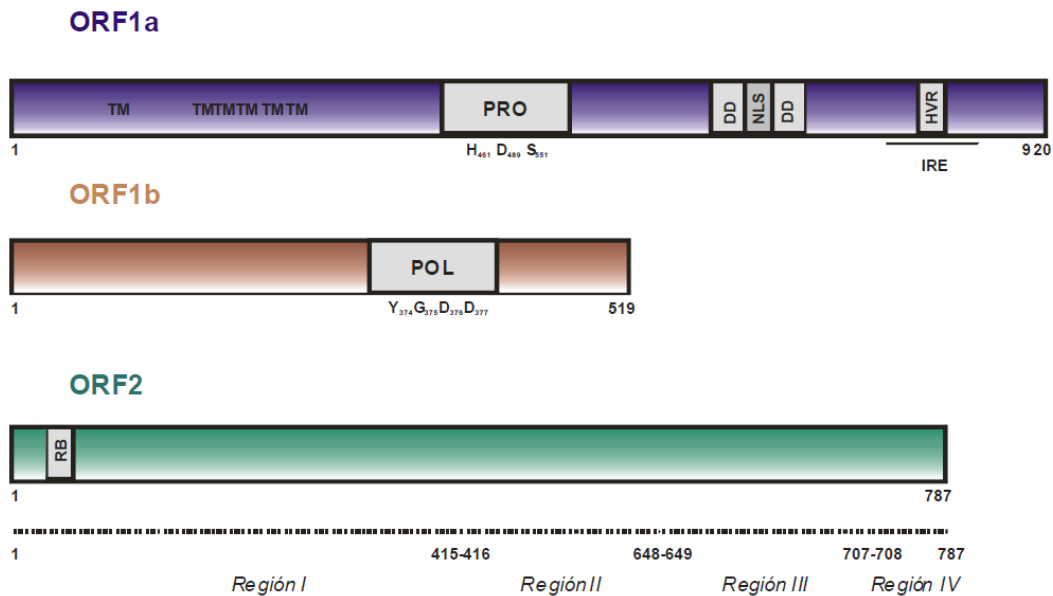
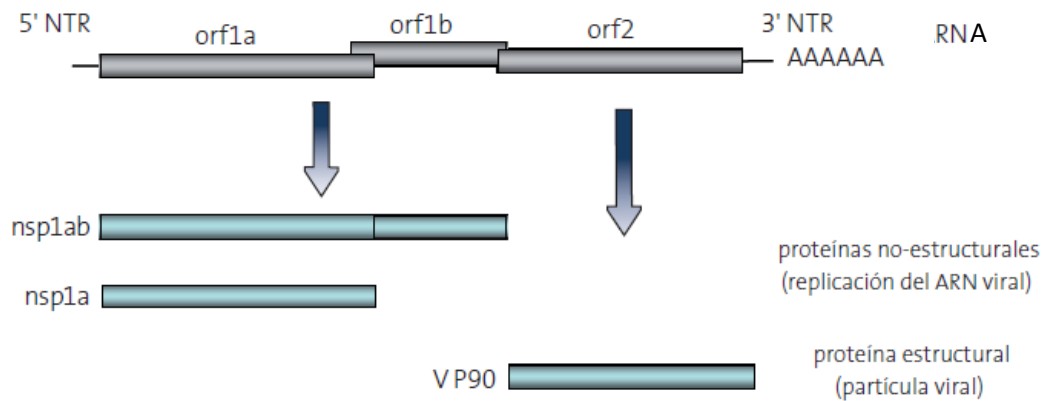


Figura 7: Esquema de los tres marcos de lectura (ORFs) de HAstVs. Destacando los dominios más característicos de cada uno de ellos: TM: dominio transmembrana; PRO: motivo de proteasa; DD: *death domain*; NLS: secuencia de localización nuclear; HVR: región hipervariable; IRE: epítipo inmunorreactivo; POL: motivo de ARN polimerasa; RB: zona rica en residuos básicos. Referencia: (Caballero, S. 2004)

En lo que respecta a la replicación viral se ha reportado que el ORF2 de HAstVs es vital para su replicación. Esta región codifica para una poliproteína (denominada VP90) que, al igual que las proteínas no estructurales, tiene varios precursores en su maduración para generar la proteína VP70, que está presente en el virión maduro que se libera de la célula.

Este procesamiento ocurre, intracelularmente en el carboxilo terminal de VP90, en una región rica en aminoácidos ácidos, y se genera después de que VP90 se ha ensamblado en partículas virales. Se ha determinado que la infección de las células CaCo-2 con HAstVs promueve la activación de las caspasas y que estas enzimas celulares son las responsables de cortar la región carboxilo terminal de VP90, para generar la cápside madura de HAstVs que contiene a la proteína VP70. Para iniciar un nuevo ciclo replicativo, la proteína VP70 presente en el virus maduro, debe de procesarse con tripsina, una enzima presente en el intestino delgado, generando productos virales más pequeños, que le dan al virus la capacidad de entrar a una nueva célula (ver figura 8)(Caballero, S. y col. 2004).

A. Esquema del genoma de los astrovirus y las poliproteínas que codifica



B. Procesamiento proteolítico de la poliproteína estructural de astrovirus

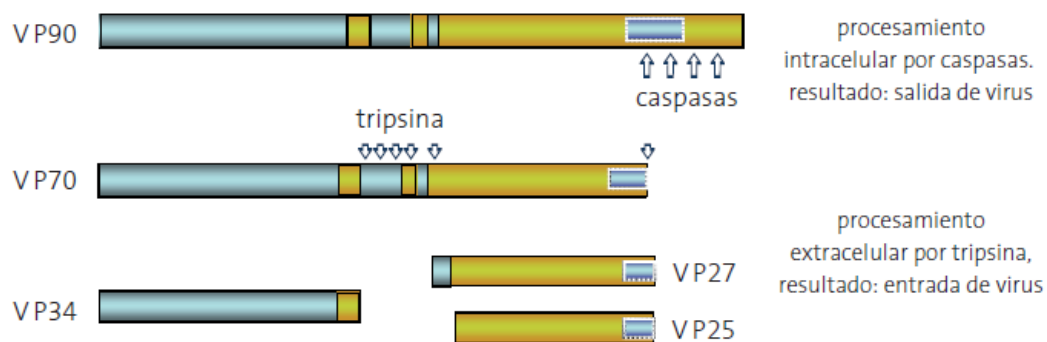


Figura 8: Esquema del genoma y procesamiento proteolítico de la lipoproteína estructural de HAstVs: A) El genoma de HAstVs está formado por una molécula de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva que codifica para las proteínas no-estructurales nsp1ab y nsp1a, y para la proteína VP90 que forma las partículas virales. B) La proteína estructural se corta en su carboxilo terminal por caspasas (activadas por la infección) para producir partículas que contienen a la proteína VP70. Estas partículas virales son las que se liberan de la célula, para procesarse posteriormente con tripsina en el lumen del intestino delgado, generando las proteínas VP34, VP27 y VP25, y adquiriendo así la capacidad para iniciar una nueva infección. Referencia: Caballero, Santiago, 2004

Aunque no se sabe el mecanismo por el que se activan las caspasas durante la infección por HAstVs, parece que las rutas extrínseca e intrínseca de la apoptosis están involucradas en este proceso, ya que se ha observado el procesamiento de proteínas que se usan como marcadores de ambas vías. La activación de la muerte apoptótica en la infección con HAstVs no tiene consecuencias negativas en la producción de progenie viral, ya que la síntesis de proteínas virales y el rendimiento total de partículas infecciosas no se afecta en presencia de moduladores (positivos y negativos) de esta respuesta celular. Sin embargo, la presencia de inhibidores de caspasas sí afecta de manera negativa tanto el procesamiento de la proteína VP90

así como de la liberación del virus al medio extracelular. La salida del virus de la célula y el procesamiento de VP90 son, por lo tanto, eventos muy relacionados, aunque no dependen del proceso de muerte en sí, ya que si la muerte celular es por necrosis, en donde no existen caspasas activas, no se favorece la liberación del virus. De esta manera, la interacción de algún(os) componente(s) de HAstVs con su célula huésped CaCo-2 (derivadas de un adenocarcinoma de colon humano) induce una respuesta en ésta, que es aprovechada por el virus para su liberación y dispersión a células vecinas, completando así su ciclo replicativo de estas células (Méndez, E. y col. 2007).

1.3.5 Serotipos y Genotipos de HAstVs.

Los HAstVs son clasificados en genotipos basados en la secuencia nucleotídica de 348 pb en la región del ORF2, y se tiene demostrado que hay una correlación directa con la clasificación por serotipos. Resultados de análisis filogenéticos basados en el dominio que codifica para la proteasa, permiten distinguir dos genogrupos claramente diferenciados: el genogrupo A (HAstV-1 al 5 y HAstV-8) y el genogrupo B (HAstV-6 y 7) (Morsy, W. y col. 2007; Caballero, S. 2004).

HAstVs-1 es el que circula con mayor frecuencia a nivel mundial y por lo tanto es el más estudiado, seguido por los serotipos HAstVs-2, HAstVs-3, HAstVs-4 y HAstVs-5. Los serotipos HAstVs-6, HAstVs-7 y HAstVs-8 son raramente detectados (Reis, H. y col. 2007).

Desde 1999 se conoce un nuevo serotipo de HAstVs, el MBL1 que fue identificado en muestras fecales recolectadas en Melbourne, Australia. Más tarde, en el 2008, una investigación en St. Louis, Missouri, USA demuestra que este serotipo de reciente descubrimiento circula en Norteamérica (Mustafa, H. y col. 2000).

1.4 Aspectos Clínicos de HAstVs.

1.4.1 Patogénesis.

La patogénesis de la enfermedad ocasionada por HAstVs no ha sido bien establecida, ya que la infección por este agente es propia de cada especie. No obstante se ha sugerido que la replicación viral ocurre en el tejido intestinal. Los

estudios en adultos voluntarios no aclaran tampoco los mecanismos patogénicos y son los realizados en animales los que aportan gran parte del conocimiento. En ellos se observa una atrofia de las vellosidades intestinales e infiltrados inflamatorios en la lámina propia, dando lugar, al igual que los rotavirus, a la disminución de la actividad de las disacaridasas y producción de diarrea osmótica. En humanos existen pocos datos sobre el mecanismo de entrada del virus en las células susceptibles del huésped, aunque el más probable parece ser el de endocitosis (Sánchez-Fauquier. y col).

Los estudios de Astrovirus en bovinos han determinado que los virus infectan las células M y a los enterocitos situados sobre la capa de las vellosidades de las placas de Peyer en el intestino delgado; mientras que estudios en borregos revelan que provoca diarrea que trasciende de manera leve siguiendo la infección de los enterocitos maduros en las dos terceras partes de la región apical de las vellosidades y en los macrófagos subepiteliales (Caballero, S. 2004; Willcocks, M. y col. 1990).

En general, los experimentos *in vivo* sugieren que los HAstVs penetran a las células a través de la superficie apical; sin embargo estudios de patogénesis viral en cultivo celular indican que penetran a través de la superficie basolateral en lugar de por la superficie apical (Caballero, S. 2004; Willcocks, M. y col. 1990).

1.4.2 Transmisión.

HAstVs se transmite principalmente por la vía fecal-oral, y brotes de gastroenteritis aguda han sido asociados con el consumo de mariscos contaminados con aguas residuales, así como a la ingestión de agua de arroyos contaminados con heces (Chapron, C., et. al. 2000).

HAstVs puede ser transmitido por la comida o por el agua, pero la transmisión de persona a persona es la principal causa de brotes en centros de trabajo. (Moe, C. y col. 1991). Es importante mencionar que HAstVs es capaz de sobrevivir en condiciones de desecación lo que ocasiona que éste virus sea viable en superficies inertes por largos periodos de tiempo, provocando que el contagio por fómites sea una causa común de contagio (Abad, F. y col. 2001; Maldonado, Y. y col 1994).

1.4.4 Manifestaciones clínicas.

El periodo de incubación de la infección por HAstVs varía de entre 3 a 4 días y se caracteriza por la presencia de fiebre, dolor de cabeza, diarrea y malestar general. En ocasiones la infección por HAstVs produce vómito, dolor abdominal e inclusive puede llegar a producir anorexia; así se demuestra que no existe diferencia con otras GA. La excreción del virus puede persistir hasta por 12 días (Moe, C. y col. 1991; Reis, H. y col. 2007). Sin embargo, existen estudios que revelan que la diarrea es más corta y menos grave que la causada por otros virus entéricos y los síntomas como la fiebre y los vómitos ocurren con menor frecuencia. También los casos producidos por HAstVs-3 suelen ser más graves (Bellido, J. 2007).}

1.4.5 Inmunidad.

La infección sintomática de HAstVs ocurre con frecuencia en niños menores de 5 años y adultos de la tercera edad, lo que sugiere una reducción de anticuerpos en los primeros y últimos años de vida; así mismo la enfermedad diarreica aguda producida por HAstVs es común en pacientes inmunocomprometidos. A pesar de esto, el factor determinante de la inmunidad no ha sido bien identificado (Caballero, S. 2004).

1.4.6 Tratamiento para la infección de *Astrovirus humano*.

Debido a que la gastroenteritis producida por HAstVs suele ser por lo general una enfermedad autolimitante, no es necesario un tratamiento específico. Los problemas de deshidratación que generan los HAstVs son solucionados por la aplicación de terapias de re-hidratación oral o intravenosa. El uso de antibióticos es inapropiado. La administración de inmunoglobulina intravenosa puede ser eficiente en pacientes con inmunodeficiencias severas que no responden a las medidas terapéuticas normales, pero todavía no se conoce con exactitud la eficacia real de este tratamiento (Caballero, S. 2004).

Según el grado de deshidratación, la Organización Mundial de la Salud (OMS) aconseja a los profesionales sanitarios que sigan uno de los 3 planes de tratamiento:

Plan A: sin deshidratación. El consejo nutricional y un aumento de la ingesta de líquidos son suficientes (caldo, arroz, agua y yogur, o incluso agua). En lactantes

menores de 6 meses que todavía no han empezado a tomar sólidos, la solución de rehidratación oral es de elección antes de tomar leche. La leche materna o la leche en polvo de vaca se administran sin restricciones concretas. En caso de alimentación mixta con lactancia materna/artificial, hay que aumentar la proporción de lactancia materna.

Plan B: deshidratación moderada. Cualquiera que sea la edad del niño, se aplica un plan de tratamiento de 4 horas para evitar problemas a corto plazo. Inicialmente, no se debe proveer la alimentación. Se recomienda enseñar a los padres cómo administrar unos 75 ml/kg de una solución de rehidratación oral con una cucharilla durante un período de 4 horas, y se sugiere que los padres observen la tolerabilidad al principio del tratamiento. Se puede administrar una mayor cantidad de solución si el niño sigue presentando deposiciones frecuentes. En caso de vómitos, se debe suspender la rehidratación durante 10 minutos y después se reanuda a una menor velocidad (aproximadamente una cucharadita cada 2 minutos). El estado del niño debe ser reevaluado a las 4 horas a fin de decidir sobre el tratamiento posterior más adecuado. La solución de rehidratación oral se debe seguir ofreciendo una vez la deshidratación haya sido contenida, mientras el niño siga teniendo diarrea.

Plan C: deshidratación grave. Es necesaria la hospitalización, pero la prioridad más urgente es iniciar la rehidratación. En el hospital (o donde sea), si el niño puede beber, hay que administrar solución de rehidratación oral mientras llega, e incluso durante, la infusión intravenosa (20 ml/kg cada hora por vía oral antes de la infusión, después 5 ml/kg cada hora por vía oral durante la rehidratación intravenosa). Para el suplemento intravenoso, se recomienda que una solución compuesta de lactato sódico (véase la sección 26.2) se administre a una velocidad adaptada a la edad del niño (lactante menor de 12 meses: 30 ml/kg durante 1 hora, después 70 ml/kg durante 5 horas; niños mayores de 12 meses: las mismas cantidades durante 30 minutos y 2,5 horas respectivamente). Si no es posible la vía intravenosa, una sonda nasogástrica también es adecuada para administrar la solución de rehidratación oral, a una velocidad de 20 ml/kg cada hora. Si el niño vomita, se reduce la velocidad de administración de la solución oral.

Sales de rehidratación oral

Solución glucosalina

cloruro sódico 2,6 g/litro de agua limpia

citrato trisódico 2,9 g/litro de agua limpia

cloruro potásico 1,5 g/litro de agua limpia

glucosa (anhidra) 13,5 g/litro de agua limpia

Cuando no se dispone de glucosa ni de citrato trisódico, se pueden sustituir por

sucrosa (azúcar normal) 27,00 g/litro de agua limpia

bicarbonato sódico 2,5 g/litro de agua limpia

NOTA. La solución se puede preparar con mezclas de azúcar/sal empaquetados o de sustancias a granel y agua. Las soluciones deben ser recién preparadas, preferiblemente con agua recién hervida y enfriada. Es importante el peso y la mezcla completa cuidadosa, y la disolución de los ingredientes en el volumen correcto de agua limpia. La administración de soluciones más concentradas puede producir hipernatremia. (OMS 2004)

1.4.7 Vacunas.

Actualmente no existe una vacuna contra el HAstVs. Estudios recientes sobre HAstVs van encaminados a evaluar con exactitud cuáles son las principales características epidemiológicas de estos virus y su importancia médica real en la población mundial. Una vez que se disponga de esta información para diferentes regiones del mundo y se haya profundizado también en el conocimiento del grado de variabilidad antigénica entre los distintos serotipos, podrá seguirse con el desarrollo de una vacuna para prevenir la infección de HAstVs. Por otra parte, los datos de los que se disponen hasta ahora parecen indicar que la mayoría de infecciones por HAstVs tienen lugar en niños menores de 2 años de edad; lo que implica que uno de los requerimientos de la futura vacuna es que fuera capaz de inducir inmunidad en niños pequeños (Guix, S. y col. 2005).

1.4.8 Prevención.

Debido a que se trata de una enfermedad de transmisión fecal-oral, la prevención de la infección se basa fundamentalmente en interrumpir las vías de transmisión del virus entre personas, por lo que es especialmente importante lavar y manipular los alimentos cuidadosamente y desinfectar de manera adecuada el agua que se destina al consumo humano. La descontaminación de superficies y fomites debe tenerse en cuenta. Se ha observado que los HAstVs son bastante resistentes a la desinfección por alcohol y concretamente parece que las soluciones de metanol al 70% serían más efectivas que concentraciones equivalentes de isopropanol o etanol o que el metanol al 90% (Bellido, J. 2007; Guix, S. y col. 2005).

1.5 Técnicas de diagnóstico para Astrovirus humanos.

Microscopia electrónica.

HAstVs fue detectado por primera vez en el año de 1975 por medio de Microscopía Electrónica (ME). Sin embargo esta técnica presenta 2 grandes limitantes: su límite de sensibilidad, estimado en aproximadamente $10^6 - 10^7$ virus/gr de heces, y la dificultad de diferenciar entre HAstVs y otros virus de morfología similar, como los Norovirus y los Sapovirus (Appleton y Higgins, 1975).

Inmunofluorescencia.

La propagación del virus por medio del cultivo celular y la detección de esta infección por medio de inmunofluorescencia (IFA), dieron pie al descubrimiento de anticuerpos específicos contra HAstVs por lo que la sensibilidad y especificidad de la microscopía electrónica se incrementó y, en consecuencia, logró mejorar las técnicas de microscopía en fase sólida (SPIEM) en las que las rejillas de microscopía electrónica eran recubiertas con el anticuerpo específico frente al virus. (Herrmann, J. y col. 1991).

Al igual que el resto de los virus que producen la enfermedad diarreica aguda, con excepción del Rotavirus, el cultivo celular de HAstVs es difícil y laborioso, pues a veces requiere pases seriados y líneas celulares de uso poco común en la mayoría de laboratorios hospitalarios.

Cultivo Celular.

Dos años después de su identificación, Lee y Kurts demostraron, por Inmunofluorescencia, la infección primaria en células HEK con extractos fecales de humanos infectados con HAstV-1. Sin embargo, no fue hasta 1981 que se logró el pase serial en células primarias de HEK con la incorporación de tripsina en el medio de crecimiento libre de suero. La concentración óptima de tripsina de 10 µg/mL proporcionó un título viral de 10^4 a 10^7 virus/mL en aproximadamente 48 horas posteriores a la infección. Después de seis pases en células HEK, líneas celulares como la PBK (*primary baboon kidney*) y líneas celulares continuas de LLCMK2 (*rhesus monkey kidney cells*), se observó la lisis celular (efecto citopático), demostrando así que se había dado la infección de HAstVs en éstas células (Kurts, J. y col. 1987).

Willcocks y colaboradores infectaron directamente la línea celular de carcinoma de colon humano (CaCo-2) con extracto fecal que contenía HAstV-1 de un brote de gastroenteritis en Reino Unido en el año de 1988. En este caso, la concentración óptima de tripsina fue de 5 µg/mL y el efecto citopático, que consiste en la lisis celular y en consecuencia la formación de huecos en la monocapa, apareció al segundo día de infección. Los serotipos 6 y 7 fueron exitosamente propagados en ésta línea celular, ya que permite un aislamiento más rápido y una propagación subsecuente de los diferentes tipos de HAstVs (Willcocks, M. y col. 1990).

Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).

En un estudio realizado en Tailandia en 1991 utilizando la técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA), se comprobó la importancia médica de éste agente viral en las gastroenteritis agudas, probando que era la segunda causa más común de diarreas en niños menores de 5 años (Brown, D. et. al. 2008). Estos ensayos se basaban en una ELISA tipo sándwich que propone el uso de un anticuerpo monoclonal (8E7) que reconoce un epítipo común a todos los serotipos y un segundo anticuerpo policlonal para la detección (Herrmann, J. y col. 1991).

En general, los ensayos inmunoenzimáticos presentan una sensibilidad mayor que las técnicas microscópicas y su especificidad puede llegar a alcanzar hasta el 98%.

En la actualidad existen kits comerciales de diagnóstico de HAstVs equivalente al ensayo enzimático de Herrmann y colaboradores.

Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa) RT-PCR).

Un estudio comparativo para el diagnóstico de HAstVs, demostró que la RT-PCR es un método de detección mucho más sensible que la ME o la ELISA, ya que su uso reveló la presencia de HAstVs en pacientes infectados durante y después de las manifestaciones clínicas por un tiempo mucho mayor al que la ELISA y la EM (Le Cann. y col. 2004). Por esta razón, la RT-PCR refleja sus ventajas sobre el resto de las otras técnicas de diagnóstico comunes: alta especificidad y sensibilidad, además de la no limitación de reactivos, como el caso de los ensayos inmunoenzimáticos.

La implementación de la RT-PCR como técnica básica en los laboratorios de investigación y diagnóstico para cualquier tipo muestra, ya sea de origen fecal o ambiental, ha abierto las puertas a la realización de estudios tanto epidemiológicos como filogenéticos con base al análisis de las secuencias de los genomas de los virus detectados (Manual de pruebas de diagnóstico, 2006).

RT-PCR Tiempo Real

En Francia, se dieron a la tarea de buscar un método de diagnóstico que identificara concentraciones muy bajas de HAstVs; como es el caso de la presencia de éste agente en aguas residuales. Diseñaron un conjunto de iniciadores y una sonda fluorogénica localizada en el extremo 3' del genoma de HAstVs. La región amplificada fue clonada y el plásmido fue transcrito para generar patrones de calibración para la cuantificación. Después, el método fue evaluado en las muestras contaminadas artificialmente. Para validar el método en muestras contaminadas de forma natural, las muestras de aguas residuales y tratadas fueron recolectadas mensualmente durante un año en una planta de tratamiento de aguas residuales. El genoma de HAstVs se detectó en todas las muestras colectadas en la entrada a la planta de tratamiento de aguas residuales, con un valor medio de $4,1 \times 10^6$ genomas/100 ml. Los efluentes presentaron un valor medio de $1,01 \times 10^4$ genomas de HAstVs. La alta

prevalencia de HAstVs en los efluentes de aguas residuales de plantas de tratamiento indica que estas plantas no eliminan eficientemente el virus. Se trata de un problema de salud pública y las nuevas técnicas de depuración son necesarias (Le Cann, P. y col. 2003)

En China desarrollaron una RT-PCR tiempo real y una RT-PR anidada para la detección del agente causal de las gastroenteritis agudas en la ciudad de Jiangmen así como su prevalencia y la circulación de los diferentes genotipos (Dai, Y., y col 2010)

Microarreglos.

El conocimiento de la epidemiología molecular de HAstVs es considerado como un punto clave en salud pública y a pesar de que la RT-PCR proporciona un método de diagnóstico muy sensible para HAstVs en heces, los microarreglos han demostrado ser especialmente útiles como complemento de los métodos de detección viral en la participación de chips de amplificación de ácidos nucleicos. Esta técnica permite la identificación de los 8 serotipos existentes de HAstVs utilizando un sólo par de iniciadores de baja degeneración en una misma RT-PCR. Los productos amplificados se identifican con el tipo de hibridación a un microarreglo compuesto de oligonucleótidos cortos. El uso de sondas de oligonucleótidos cortos, permite la identificación por tipo usando las secuencias amplificadas de diversidad limitada (Brown, D. y col. 2008).

Recientemente se ha trabajado en un sistema que combina una RT-PCR multiplex con microesferas basadas en la detección de fluorescencia para la identificación de Norovirus GI y GII, Rotavirus, Astrovirus, Sapovirus y Adenovirus. En Japón se utilizó esta técnica para identificar los agentes causales de los brotes de gastroenteritis aguda durante el periodo que comprende de julio de 2007 a mayo del 2010; obteniendo que Norovirus estaba presente en el 96.7% de los casos, Sapovirus en el 3.3% y Astrovirus 0% (Shigemoto, N. y col. 2011; Liu, J y col. 2011)

1.6 Epidemiología de las infecciones por Astrovirus humano.

1.6.1 A Nivel Mundial

Durante mucho tiempo han sido escasos los datos sobre la epidemiología de las infecciones por HAstVs, dado la escasa disponibilidad de métodos de diagnóstico disponibles para su identificación. Gracias al avance de las técnicas diagnósticas, actualmente se ha logrado identificar la incidencia de HAstVs en niños con gastroenteritis aguda, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, varía entre el 2 y 9% (Reis, H. y col. 2007).

Los estudios epidemiológicos realizados en distintos lugares del mundo han informado tasas de prevalencia de Astrovirus del 2 al 16% entre los niños hospitalizados con diarrea y de 5 a 17% entre los niños con diarrea en los estudios comunitarios. La distribución de estos virus es de tipo cosmopolita y se ha detectado en personas de todos los grupos de edad en países como China, Japón, Tailandia, Australia, Sudáfrica, Malawi, Italia, Suecia, Reino Unido, Estados Unidos, Guatemala, Canadá y México.

Oshi y colaboradores reportaron un brote de gastroenteritis aguda que afectó a estudiantes y personal de cocina de 10 primarias y cuatro escuelas privadas en la ciudad de Katano, Japón. Los datos obtenidos demostraron la presencia de HAstVs en 10 de un total de 38 muestras analizadas (Oishi, I. y col. 1994). En el mismo año, Herrmann y colaboradores utilizaron la técnica de ELISA la cual es capaz de detectar del serotipo 1 al 5 de HAstVs para llevar a cabo estudios controlados en Tailandia comparando la incidencia de Astrovirus, Rotavirus y Adenovirus entéricos entre pacientes externos pediátricos con gastroenteritis. Los HAstVs fueron detectados en un 8.6% de los niños que sufrían gastroenteritis. Los rotavirus y adenovirus entéricos fueron detectados en un 19% y un 2.6% de estos con gastroenteritis, respectivamente (Herrman, J. y col. 1991).

En 1994, Utagawa y colaboradores identificaron a HAstVs como el agente etiológico de gastroenteritis aguda en tres brotes por separado. En el primer brote, durante diciembre de 1989, 22 (67%) de 33 personas desarrollaron gastroenteritis. El segundo brote, afectó a un total de 1,419 personas, incluyendo personal de cocina

así como estudiantes de una escuela en la Prefectura Yamaguchi quienes llegaron a enfermar después de comer almuerzos contaminados de la escuela. De las 28 muestras fecales obtenidas (22 de las personas de cocina y seis de los niños de la escuela), seis muestras de adultos fueron positivas mediante ELISA y todas las muestras de los niños fueron negativas tanto por ME como por ELISA. En el tercer brote, febrero de 1992, 45 de 66 estudiantes de una escuela superior presentaron un cuadro de GA, siendo la causa de la enfermedad: HAstVs (Utagawa y col. 1994).

En un estudio realizado en Melbourne Australia en niños hospitalizados por GA se confirmó, por ensayos de northern blot, la presencia de en 4.2% de las muestras (Palombo. 1995). Otro estudio realizado posteriormente por Koopmans y colaboradores (1998) indicaron una prevalencia extremadamente alta de Astrovirus entre algunas poblaciones como la provincia de Utrech, Países Bajos (Koopmans, M. y col. 1998).

Un estudio de GA en el Reino Unido, publicado en 1999, determinó una tasa de incidencia de 3,8/1000 pacientes infectados por HAstVs al año en la comunidad, determinando así que HAstVs era el cuarto agente causal más común de gastroenteritis viral. Los primeros estudios llevados a cabo en Glasgow, Escocia, han demostrado que un porcentaje significativo de los bebés excretan partículas del virus; mientras que el 12%, no presentan síntomas gastrointestinales (Glass, R. y col. 1996).

Para el año 2009, Finkbeiner y su grupo de trabajo, a través de técnicas de RT-PCR y secuenciación, logran identificar a un nuevo serotipo, el MLB-1 en una población de niños menores de 2 años en Melbourne Australia (Finkbeiner, S. y col. 2008). En un estudio retrospectivo, realizaron la recolectaron de 254 muestras proporcionadas por el hospital infantil de St. Louis, Missouri, USA en el año de 2008, 4 fueron positivas a HAstVs MLB-1, confirmando que éste serotipo se encontraba circulando en norte América (Finkbeiner, S. y col. 2009).

En lo que respecta a la seroprevalencia, numerosos estudios indican que el HAstV-1 es el serotipo más predominante a nivel mundial. En 1994, Lee y colaboradores obtuvieron muestras fecales del laboratorio de salud pública de Oxford de niños

menores de 6 años de edad los cuales presentaron cuadros de gastroenteritis aguda. Las muestras fueron examinadas previamente por microscopía electrónica y fueron serotipificadas usando inmunomicroscopía electrónica (IEM). De 291 muestras fecales positivas a HAstVs colectadas durante un periodo de 17 años de 1976-1992, 64.9% (n=189 muestras) contenían HAstVs-1, 1.3% (n=33 muestras) HAstVs-2, 9.3% (n=27 muestras) HAstVs-3, 1.3% (n=33 muestras) HAstVs-4, 2.1%(n=6 muestras) HAstVs-5, 0.3%(n=1 muestra) HAstVs-6 y 0.7% (n=2 muestras) HAstVs-7 (Lee, T. y col. 1994).

En 1994, Noel y colaboradores recolectaron 162 muestras fecales positivas a HAstVs de niños con diarrea durante el periodo de 1981-1993. Los virus aislados de estas muestras fueron tipificados usando un ELISA e inmunomicroscopía electrónica (IME) y se encontró que 66% (n=107) de los virus aislados fueron serotipo 1, 0.6% (n=1) fueron serotipo 2, 6.2% (n=10) fueron serotipo 3, 4.3% (n=7) fueron serotipo 4 y 0% (n=10) fueron serotipo 5. No hubo información provista para Astrovirus serotipos 6 y 7 (Trayner, J. 1998).

En otro estudio realizado por el mismo grupo de investigación en el año 1995, se analizó una colección de 64 muestras positivas a HAstVs, provenientes de 7 países diferentes, y se determinó que 52% (n=32 muestras) fueron Astrovirus serotipo 1, 11% (n=7 muestras) fueron Astrovirus serotipo 2, 16% (n=10 muestras) fueron serotipo 3, 10% (n=6 muestras) fueron Astrovirus serotipo 4, 2% (n=1 muestra) fueron Astrovirus serotipo 5, 2% (n=1 muestra) fueron Astrovirus serotipo 6 no hubo fueron Astrovirus serotipo 7 (Noel y col. 1995).

En el estudio de Koopmans, se encontró que el porcentaje total de personas con anticuerpos neutralizantes de Astrovirus fue mayor para HAstVs-1 (91%), seguido por 69% del serotipo 3, 56% del serotipo 4, 36% del serotipo 5, 31% del serotipo 2, 16% del serotipo 6 y 10% del serotipo 7 (Koopmans, M. y col. 1998).

1.6.2 A Nivel Nacional y Latinoamérica.

Aún cuando en México poco se conoce acerca de la epidemiología de este agente, se ha reportado al serotipo 2 (HAstVs-2) como el de mayor prevalencia, seguido del serotipo 4 (HAstVs-4). Entre los años 1988 – 1991, Guerrero y colaboradores

realizaron un estudio en México, donde se llevó a cabo el seguimiento de los episodios de diarrea en 214 niños menores de dos años de edad y se detectó HAstVs en 26 (5%) de los 510 episodios de diarrea (Guerrero, M. y col. 1998).

En 1992, Cruz y colaboradores realizaron un ELISA similar al realizado por Herrman, donde detectaron Astrovirus en un 38.6% en niños de la zona rural de Guatemala de 0-3 años de edad (Cruz, J. y col. 1992).

En el año de 1998, Maldonado y colaboradores, identificaron por ELISA y RT-PCR a HAstVs como el patógeno entérico más común en una población rural de infantes Mayas de la sierra de Chiapas, México. Los HAstVs fueron detectados en 164 de los 271 niños (61%) inscritos en un estudio de inmunogenicidad de una vacuna oral contra la polio (OPV por sus siglas en inglés oral poliovirus vaccine) esta es la más alta prevalencia reportada entre infantes de cualquier región del mundo. (Maldonado, Y. y col 1998).

En el año 2000, Mendez – Toss y colaboradores pusieron de manifiesto la existencia de un nuevo serotipo identificado en el estado de Yucatán México, el HAstVs serotipo 8 (Yuc8) (Mendez-Toos. y col. 2003)

Por lo tanto en éste trabajo se pone de manifiesto la importancia del uso de métodos moleculares, como la RT-PCR, para la detección de HAstVs a partir de muestras fecales y se destaca la importancia de ésta herramienta molecular en los laboratorios lo que permite ampliar la cobertura de los agentes virales causantes de la EDA de la población infantil mexicana.

1.6.3 Estacionalidad.

Como en la mayoría de las causas de gastroenteritis viral, hay un pico de incidencia en el invierno. Esto contrasta en las regiones tropicales, donde la prevalencia es más alta durante la temporada de lluvias. Esta distribución estacional de la infección en climas templados es bastante desconcertante pero se explica por el impacto de la lluvia sobre los servicios de saneamiento en los países en desarrollo lo que propicia la infección del HAstVs (Glass, R. y col. 1996; Maldonado, Y. y col 1994).

Tabla 1: Epidemiología de HAstVs.

Estudio / Año	País	Edad (años)	Método de Detección.	Prevalencia de HAstVs.
Guerrero y Col. (1988-1991)	México	0 – 2	ELISA	5%
Utagawa y col (Dic 1989)	Nagano, Japón	25 – 45	ME y ELISA	67%
Oshi y Col (1991)	Osaka Japón	4 – 59	ME, ELISA, PCR	26%
Herrmann y Col. (1991)	Thailandia	0 – 5	ELISA	8.6%
Utagawa y col (Feb 1992)	Nagano, Japón	14 – 19	ME y ELISA	68%
Cruz y Col. (1992)	Guatemala	0 – 3	ELISA	38.6%
Lee y Col. (1994)	Oxford, EUA	0 – 6	IME	HAstV-1: 64.9%; HAstV-2: 11.3%; HAstV-3: 9.3%; HAstV-4: 11.3%; HAstV-5: 2.1%; HAstV-6: 0.3%, HAstV-7: 0.7%
Palombo y Col. (1995)	Melbourne, Australia	0 – 5	Northern Dot Blot (ARN)	4.2%
Méndez-Toss y col (1994-1995)	México	S/D	RT-PCR / Secuenciación	7.3%
Noel y col (1995)	Diferentes países (Australia, Israel, Japón, Korea, Perú, Reino Unido)	S/D	ELISA de serotipos	HAstV-1: 52%; HAstV-2: 11%; HAstV-3: 16%; HAstV-4: 10%; HAstV-5: 2%; HAstV-6: 2%, HAstV-7: 0%
Glass y Col (1996)	EE. UU	0 – 9	ELISA	90% poseen anticuerpos.
Koopmans y Col. (1998)	Holanda	1 – 79	Ensayo de Neutralización.	HAstV-1: 91%; HAstV-2: 33%; HAstV-3: 69%; HAstV-4: 56%; HAstV-5: 36%; HAstV-6: 16%, HAstV-7: 10%
Maldonado y Col. (1998)	Chiapas, México	0 – 3	ELISA y RT-PCR	61%
Utagawa y col (Dic 1999)	Yamaguchi, Japón	S/D	ELISA Y ME	23%
Finkbeiner y Col (2009)	Melburne, Australia	0 – 2	RT-PCR y Secuenciación	Presencia del MBL1

2. Justificación.

En la actualidad la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) es un problema de Salud Pública y representa una causa común de morbilidad y mortalidad en la población infantil a nivel mundial. Reportes por la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que se producen unos dos millones de casos de diarrea, causando la muerte de 1.5 millones de niños menores de cinco años por año.

En los países desarrollados, las muertes por gastroenteritis aguda no son frecuentes, pero la deshidratación secundaria al síndrome diarreico es una causa importante de morbilidad y de demanda de ingresos hospitalarios. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo es una causa importante de morbilidad y mortalidad

En México existen escasos estudios sobre el papel que juega *Astrovirus Humano* en la diarrea aguda en la población infantil; por lo que se propone el uso de técnicas de biología molecular, como la reacción de retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la detección de *Astrovirus humanos* asociados con la gastroenteritis aguda infantil y lo que permitirá un mayor conocimiento acerca de la epidemiología de este agente viral.

3. Hipótesis.

Si Astrovirus humanos (HAstVs) es un virus causante de cuadros de gastroenteritis aguda infantil asociada con deshidratación, entonces es muy probable que se encuentre afectando a pacientes menores de 5 años que presentan cuadros de gastroenteritis aguda viral que no estén asociados con Rotavirus.

4. Objetivo General.

Detectar la presencia de Astrovirus Humanos en niños menores de 5 años con cuadros de gastroenteritis aguda de diversas zonas geográficas del país mediante el método molecular de RT-PCR.

5. Objetivos Particulares.

- 1) Identificar la presencia de Astrovirus humanos por el método de Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) en muestras diarreicas.
- 2) Optimizar la técnica de RT-PCR para el diagnóstico de Astrovirus humanos.
- 3) Determinar por RT-PCR la presencia de HAstVs en muestras clínicas.
- 4) Conocer la epidemiología de éste virus en México.
- 5) Realizar el análisis comparativo entre la RT-PCR y la ELISA como métodos de análisis.
- 6) Realizar el análisis filogenético de las cepas encontradas en México.

6. Materiales y Métodos.

6.1 Diagrama general de trabajo.

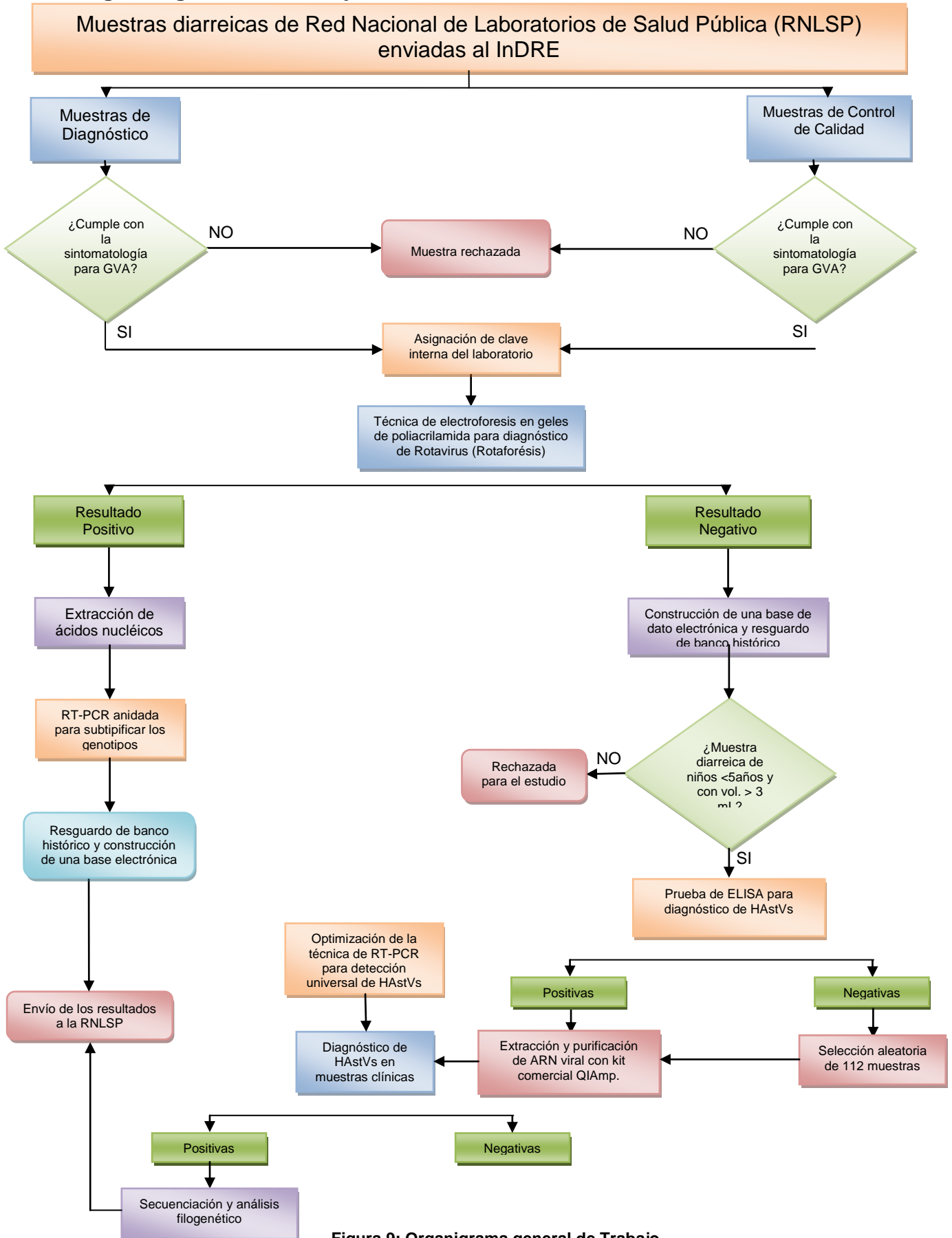


Figura 9: Organigrama general de Trabajo

6.2 Material biológico y controles del ensayo.

- 812 muestras diarreicas de niños con edad \leq a 5 años procedentes de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública en México (RNLSP), del periodo comprendido de diciembre del 2007 a octubre del 2009.
- Control de reacción de RT-PCR: agua calidad PCR.
- Control negativo: muestra clínica con clave 613, negativa a Rotavirus, Calicivirus y HAstVs por ELISA y por PCR.
- Control positivo: muestra diarreica con clave 1852 positiva la HAstVs a ELISA y confirmada por secuenciación.

6.3 Preparación de las muestras primarias para el diagnóstico de *Astrovirus humano*.

Se procesaran y organizaran muestras negativas a Rotavirus mediante la técnica de rotaforesis [electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) para diagnóstico de Rotavirus] y procedentes de a RNLSP durante el periodo diciembre del 2007 a octubre del 2009 de tres regiones geográficas de la República Mexicana en donde se presentaron brotes de gastroenteritis aguda, como Tamaulipas, Michoacán e Hidalgo.

Se construyó una base de datos de todas las muestras negativas a Rotavirus por rotaforesis; lo cual debe contener: el número asignado por la red *Infolab* (clave del InDRE), cantidad y fecha de toma de la muestra, estado de la república del cual proviene la muestra, edad y sexo; todos estos datos con el fin de llevar a cabo un posterior análisis epidemiológico.

6.4 Criterios de inclusión y exclusión para las muestras clínicas primarias.

Criterios de inclusión:

- Muestras diarreicas asociadas con EDA y que presenten cuadros de deshidratación severa.

- Niños con edades \leq a 5 años con un cuadro de diarrea aguda asociada con deshidratación severa.
- Muestras diarreicas con diagnóstico negativo a Rotavirus por la técnica de PAGE.
- Muestras con volumen en existencia igual o superior a los 3 mL.

Criterios de exclusión:

- Muestras que no cumplan con los requisitos anteriormente descritos.

6.5 Diagnóstico de HAstVs por Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).

Fundamento

El estuche Amplified IDEIA™ de OXOID utiliza un anticuerpo policlonal y un conjugado de polímero de dextrán con una alta incorporación de enzima y moléculas de anticuerpo en una fase sólida para la detección del antígeno de HAstVs.

Cada uno de los pozos está recubierto con un anticuerpo policlonal específico del género de HAstVs. Una suspensión al 10% de heces es adicionada al pozo y el antígeno de HAstVs presente en la muestra se une a la fase sólida.

El dextrán conjugado con los anticuerpos monoclonales específicos del género de HAstVs se unen a los antígenos capturados en la fase sólida, lo que une el complejo del polímero conjugado incorporando múltiples moléculas de enzima.

Para detectar la unión de la enzima, se utiliza un cromógeno que da como resultado un cambio de coloración que es detenido con la adición de un ácido. La intensidad del color de fondo es significativamente proporcional a la presencia del antígeno de HAstVs en la muestra.

Procedimiento del Ensayo Inmunoenzimático.

1. Sacar el kit de 20 a 30 minutos antes de su uso para que los reactivos alcancen la temperatura ambiente.
2. Realizar una dilución al 10% de las muestras fecales con el diluyente de la muestra proporcionado en el kit.
3. Colocar 100 μ L de la muestra blanco, del control positivo y negativo, así como de la dilución de cada una de las muestras en la placa de ELISA.
4. Adicionar 100 μ L del conjugado. Mezclar suavemente.
5. Incubar por 1 hora a temperatura ambiente (20-30° C).
6. Realizar 5 lavados de 350 μ L de buffer de lavado en cada pozo.
7. Adicionar 100 μ L del sustrato.
8. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Detener la reacción adicionando 100 μ L de la solución de paro (H_2SO_4 0.46 M).
10. Leer la absorbancia fotométricamente a 450 nm (La coloración del pozo es amarilla).
11. Interpretación de resultados.

Criterios de interpretación de resultados:

Valor de corte (VC): Valor de DO del Control Negativo (CN) + 0.10

Zona Gris: VC +/- 0.10

Valor Positivo: > VC + 0.10

Valor Negativo: < VC – 0.10

DIAGRAMA DE ELISA PARA HAstVs

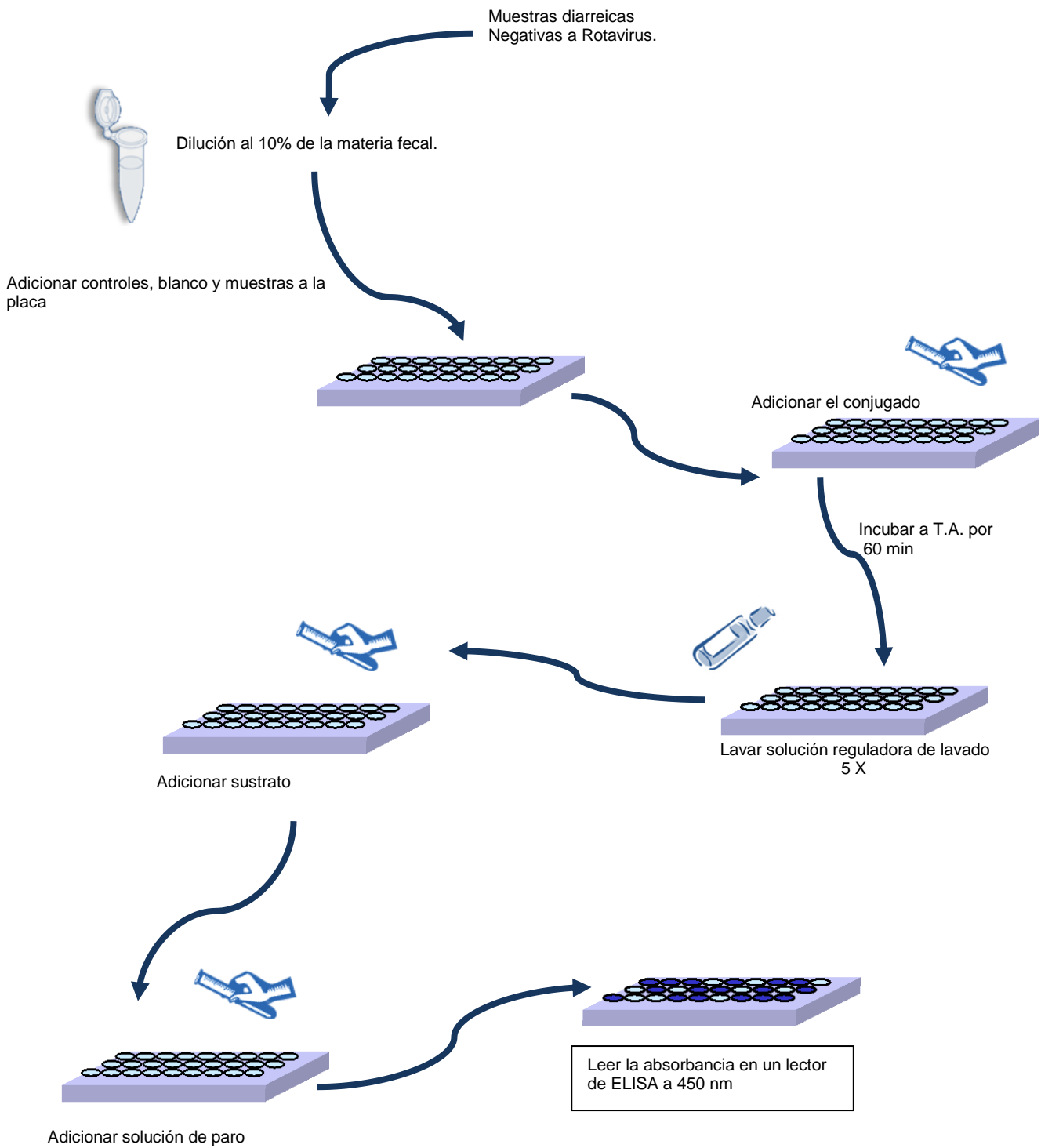


Figura 10: Diagrama del Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para la detección de HAstVs.

6.6 Extracción y purificación de ARN viral.

Fundamento.

La extracción purificación de ARN se lleva a cabo por medio del estuche comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (250) de QIAGEN (cat. 52906) según las instrucciones del fabricante. Este estuche combina las propiedades de unión selectiva de la sílica gel unida a una membrana, con la rapidez de la tecnología de extracción del estuche y es usado idealmente para el procesamiento simultáneo de varias muestras (figura 11).

La muestra, primero es lisada en condiciones altamente desnaturalizantes para inactivar a las RNAsas, asegurando el aislamiento del ARN intacto. Las condiciones de la solución reguladora son posteriormente ajustadas para propiciar la unión óptima del ARN y la membrana de QIAamp, esta unión provoca que el ARN quede con una carga en la columna. Los contaminantes que llegaran a quedar, son lavados en dos pasos usando dos diferentes soluciones reguladoras de lavado. El ARN con una alta pureza, es eluido en un buffer especial libre de RNAsas y está listo para su uso directo o para ser almacenado. El ARN obtenido está libre de proteínas nucleasas y de otros contaminantes e inhibidores.

Procedimiento.

1. Preparar los reactivos de acuerdo a lo indicado en el inserto.
2. En el caso de la solución AVL con acarreador, sacar de 10-15 minutos antes de su uso para que alcance la temperatura ambiente. Si es necesario colocarlo en un baño de agua a 80° C hasta que se disuelva el precipitado.
3. Colocar en un tubo eppendorf de 1.5 mL, limpio y estéril, colocar 560 µL del buffer AVL con acarreador de ARN y adicional 140 µL de muestra. Homogenizar y dejar incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Adicionar 560 µL de etanol grado biología molecular, agitar y centrifugar a 13 200 rpm por 5 min.
5. Tomar 630 µL del sobrenadante y colocarlos en la columna de extracción, con su respectivo tubo de recolección. Centrifugar a 1 minuto a 8 000 rpm.

Se desecha el tubo con el filtrado y la columna se coloca en un tubo de recolección nuevo.

6. Depositar 630 μL del sobrenadante de la muestra clínica y repetir el paso anterior.
7. Adicionar 500 μL del buffer AW1 y centrifugar 1 minuto a 8 000 rpm. Se descarta el tubo de recolección con el filtrado.
8. Adicionar 500 μL de buffer AW2 y centrifugar a 13 200 rpm por 5 minutos. Se descarta el tubo de recolección con el filtrado.
9. Colocar la columna de extracción a un tubo tipo eppendorf nuevo, estéril y previamente identificado.
10. Adicionar a la columna, 60 μL de buffer AVE, incubar 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar a 8 000 rpm por 1 minuto.
11. Descartar la columna de extracción. El filtrado contiene el ARN listo para su uso. En caso contrario, el ARN puro se conserva estable por un año si se mantiene a una temperatura de entre -20° a -70° C

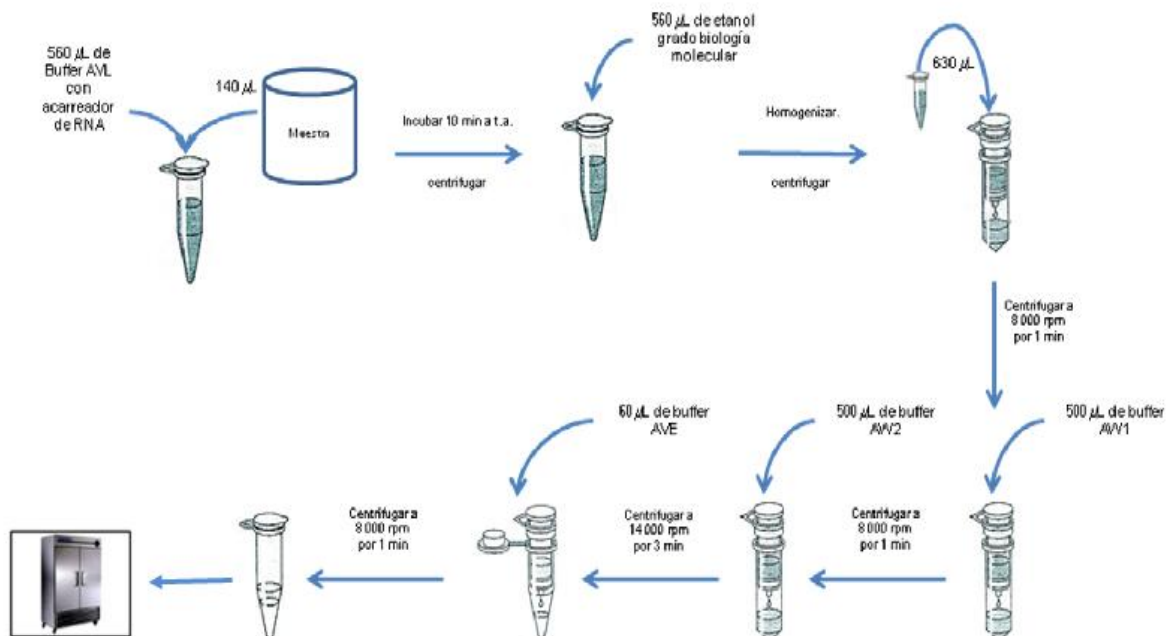


Figura 11: Diagrama de la técnica de Extracción y Purificación viral por medio del kit comercial Qlamp.

6.7 Selección de los iniciadores para la detección de HAstVs.

Para la selección de los iniciadores, se llevó a cabo una revisión bibliográfica de diferentes autores que trabajaron la RT-PCR para la identificación de Astrovirus y se encontró que los iniciadores Mon 269/Mon 270, Mon 244/Mon245 y Mon 340/Mon348 eran los que presentaban una mayor especificidad y sensibilidad. Finalmente, los iniciadores seleccionados para la detección universal de HAstVs fueron Mon340 y Mon348, ya que se encontró que eran utilizados tanto a nivel mundial como en estudios que se llevaron a cabo en México (Walter, y col., 2001; Papaventis, D., y col., 2008; Liu, M-Q, y col., 2007; Myrmel, M., y col., 2006). Dichos iniciadores amplifican una región del genoma del virus donde se encuentra el dominio catalítico de la serin proteasa del virus (ORF1a) la cual es altamente conservada entre los diferentes serotipos dando como resultado un producto de cADN de 289 pares de bases (pb) (Belliot y col., 1997) y corresponden a la posición 1182 – 1470. La RT-PCR, como nueva metodología molecular, ha sido ampliamente utilizada en diversos estudios epidemiológicos (Traore y col., 2000; Cunliffe y col., 2002, Papaventsis, D. et. al, 2008).



Figura 12: Ubicación de los iniciadores MON 340 / MON 348 para la detección universal de HAstVs. Destacando los dominios más característicos: TM: dominio transmembrana; PRO: motivo de proteasa; DD: *death domain*; NLS: secuencia de localización nuclear; HVR: región hipervariable; IRE: epítipo inmunorreactivo Referencia: (Caballero, Santiago., 2004)

Tabla 2: Iniciadores para detección de HAstVs.

Iniciador	Secuencia (5' a 3')	Detección	Polaridad	Producto Esperado (pb)	Etapas
Mon 340	CGTCATTGTTTGTGTCATACT	Serin Proteasa de ORF1a (Detecta todos los tipos antigénicos de HAstVs)	Positiva	289	RT-PCR
Mon 348	ACATGTGCTGCTGTTATATC		Negativa		

6.8 Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la detección de HAstVs.

Fundamento.

Los genomas de muchos agentes virus contienen ácido ribonucleico (ARN) que no se puede amplificar directamente mediante PCR. Para la esto, se necesita un ADN diana de doble cadena; el cual no se encuentra presente en los virus de ARN. Ese problema puede resolverse mediante la introducción de un estadio previo antes de comenzar la PCR. Mediante la utilización de la transcriptasa inversa, es posible transcribir el ARN a ADN complementario (cADN) que es ADN de doble cadena, y por ello puede utilizarse en ensayos de PCR. Tradicionalmente, la reacción de la transcriptasa inversa se realiza en un tubo aparte, y el cADN producido se transfiere después a un tubo nuevo para la reacción de PCR. Sin embargo, ya se dispone de - polimerasas estables y con actividad de transcriptasa inversa como la enzima Titán, One Step, Super Script, entre otras. La utilización de estas enzimas en soluciones reguladoras específicas posibilita que la reacción de RT-PCR tenga lugar en el mismo tubo en secuencia directa, sin manipulación adicional. (Manual de pruebas de diagnóstico 2006)

Para la estandarización de la reacción de amplificación, se utilizó como referencia el protocolo propuesto por Walter y colaboradores 2001., el volumen de los reactivos para la mezcla de reacción fueron determinados por el uso de la enzima Titán, donde las condiciones son: regulador 5x RT-PCR enzima Titán: 10 μ L; mezcla de dNTP's (1mM): 2 μ L; solución DTT (ditiotritol): 2.5 μ L; inhibidor de RNAsa (2000 U): 0.5 μ L; iniciadores MON 340/348 (25 pmoles/ μ L): 1 μ L de c/u; agua calidad PCR: 33.5 μ L; enzima TITAN: 0.5 μ L. A 45 μ L de la mezcla de reacción se le adiciona 5 μ L de ARN muestra o control, según corresponda. Dicha mezcla se somete al siguiente programa de termociclado: retrotranscripción de 60 minutos a 42°C; desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C; 30 ciclos de: desnaturalización de 1 minuto a 94°C, alineamiento de 1 minuto a 55°C y extensión de 1 minuto a 72°C; y una extensión final de 7 minutos a 72°C.

La observación del producto de amplificación de 289 pb, correspondiente a HAstVs, se determinó en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio (EtBr) y fueron visualizados con luz ultravioleta (UV).

6.9 Electroforesis en geles de agarosa.

Fundamento

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica de separación de moléculas, basada en la migración diferencial de especies cargadas al ser sometidas a un campo eléctrico. Los ácidos nucleicos tienen carga negativa debido a su esqueleto de grupos fosfato, lo cual provoca que se alejen del polo negativo (ánodo) y se dirijan al polo positivo (cátodo). La migración de las moléculas se afecta por el tamaño, forma, carga eléctrica (tipo y número) de las moléculas, así como por la intensidad de corriente, voltaje y resistencia del campo eléctrico, entre otros. Para la visualización de la electroforesis en geles de agarosa de las moléculas analizadas, se utilizan sustancias que se intercalan en el ácido nucleico y fluorescen con luz ultravioleta, tal es el caso del EtBr.

Procedimiento para la preparación y corrimiento de geles de agarosa.

1. Pesar 0.75 g de agarosa para un gel grande (20 pozos) o 0.375 g para un gel pequeño (8 pozos).
2. Colocar en un matraz Erlenmeyer exclusivo para preparar geles con bromuro de etidio.
3. Agregar 50 mL o 25 mL de TBE 1X, dependiendo del tamaño del gel.
4. Calentar en el microondas hasta fusión completa de la agarosa.
5. Dejar enfriar a una temperatura media en la que ya no se desprendan vapores.
6. Adicionar EtBr a una concentración de 1 µg/mL.
7. Equilibrar la base del gel con ayuda de una base de nivelación.
8. Depositar la solución de agarosa con EtBr en la base del gel.
9. Colocar el peine para los pozos (20 u 8 pozos).
10. Dejar de 30 a 40 minutos para que el gel polimerice totalmente.
11. Colocar la base del gel en la cámara de electroforesis.
12. Adicionar la cantidad suficiente de TBE para cubrir el gel.

13. Llevar a cabo una mezcla de 2 μ L colorante de naranja de acridina con 8 μ L del cADN obtenido y depositarlo en cada pozo.
14. Colocar 2 μ L del marcador de peso molecular VIII al inicio y final del gel.
15. Programar la fuente de poder a 85 V por 60 minutos.
16. Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder y esperar a que finalice el programa.
17. Visualizar en un transiluminador de luz UV o en un fotodocumentador.
18. Visualizar los fragmentos esperados de 289 pb. Interpretar de resultados e imagen.

6.10 Secuenciación y análisis filogenético de los productos de cADN obtenidos.

La secuenciación de los productos de amplificación obtenidos de la RT-PCR, se lleva a cabo mediante métodos automatizados utilizando el equipo ABI PRISM 310 Genedoc Analyzer. La edición de las secuencias obtenidas se realiza mediante la plataforma Bioedit y posteriormente se realiza un alineamiento múltiple junto con secuencias tipo reportadas en el GenBank mediante el programa Clustal X versión 1.83 y MEGA 4. Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el modelo del vecino más cercano (Neighbor joining) a partir de una matriz de distancias evolutivas calculadas por el método del p-distancia. Con este procedimiento se pretende caracterizar, tipificar y establecer las relaciones filogenéticas existentes entre las cepas detectadas de HAstVs asociadas a cuadros diarreicos en la población infantil en México.

7. Resultados.

En éste estudio, las muestras diarreicas se analizaron mediante la técnica de Ensayo inmunoenzimático (ELISA) debido a que es una técnica mucho menos costosa que la RT-PCR y presenta una alta sensibilidad y especificidad (100 y 98.3 % respectivamente para la detección de HAstVs. La referencia de estos datos se encuentra en el inserto del kit).

Por éste método se procesaron 812 muestras diarreicas negativas a Rotavirus y con diagnóstico probable de GA para la detección de HAstVs, de las cuales se obtuvieron los siguientes datos: 28 muestras fueron positivas a HAstVs, lo cual representa el 3.4% de positividad, 5 indeterminadas para HAstVs y el resto fueron negativas para HAstVs, como se puede observar en la **tabla 3**.

En la **figura 13** se muestra una microplaca de ELISA para la detección de HAstVs y se pueden apreciar 17 muestras de coloración amarilla que indica que son positivas.

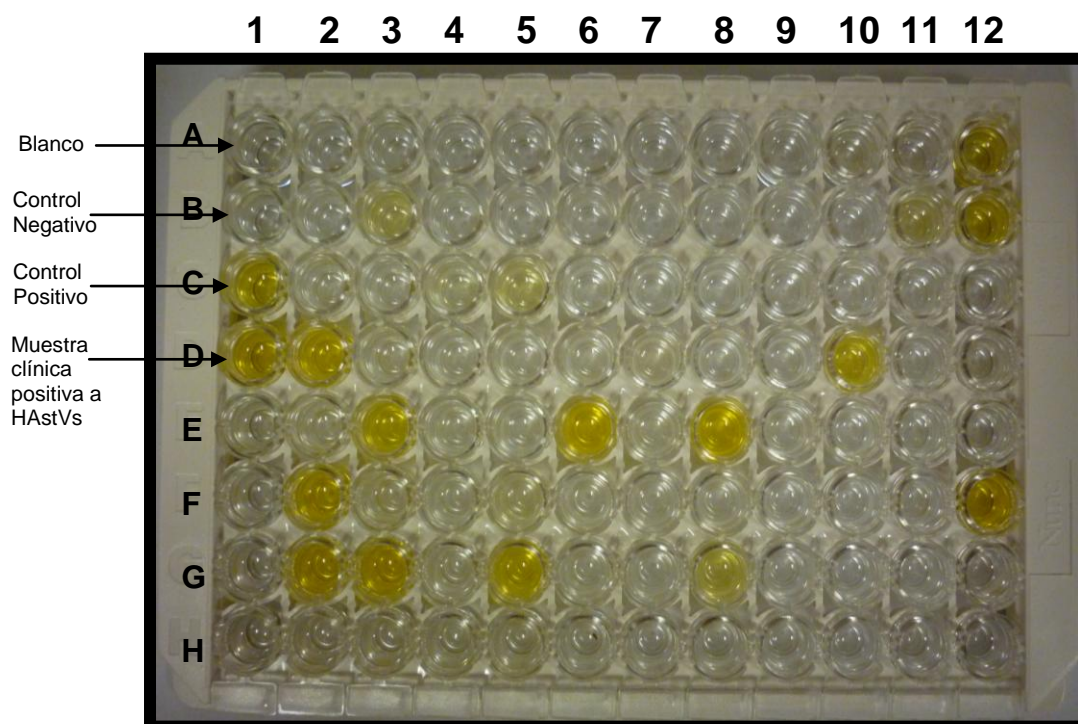


Figura 13: Identificación de muestras positivas a HAstVs mediante la técnica de ELISA. Se muestra la coloración amarilla que caracteriza a las muestras positivas a HAstVs. En la posición A1: blanco; A2: control Negativo; A3: control Positivo; de la posición A4 a la H12 son muestras clínicas durante el periodo de estudio.

Tabla 3: Resultado de las muestras procesadas por ELISA para la detección de HAstVs.

Total de muestras procesadas negativas a Rotavirus: 812				
Muestras Positivas 28 (3.5%)		Muestras Indeterminadas 5 (0.7%)		Muestras Negativas 779 (95.8%)
No. identificación	D.O	No. identificación	D. O.	
0464	0.995	0201	0.099	
0535	0.209	0661	0.103	
0808	0.429	2345	0.087	
1477	1.205	1353	0.110	
1026	0.339	0537	0.095	
1469	0.949			
1906	0.305			
1852	2.469			
2049	2.646			
2147	0.925			
2163	1.592			
0025	1.312			
0264	1.452			
0293	0.114			
0294	0.354			
0451	1.774			
0457	0.127			
0491	0.250			
0466	0.152			
0663	0.898			
0729	2.576			
0888	1.224			
0923	0.161			
0923	0.237			
0922	2.095			
0073	0.478			
0510	0.161			
0511	0.780			

De acuerdo con los resultados obtenidos del ensayo de ELISA, se decidió utilizar como control positivo la muestra con clave 1852, cuyo valor inicial de densidad óptica alta (D.O.) fue de 2.469 y con un volumen inicial superior a los 15 mL.

Para llevar la RT-PCR, se procedió a la extracción y purificación del ARN viral a partir de la materia fecal con el kit QIAMP[®] Viral RNA de la marca QIAGEN. Se realizó la extracción de ARN viral de 145 muestras diarreas negativas a Rotavirus, seleccionadas de manera aleatoria y dependiendo del volumen en existencia de los brotes más representativos en el año; y previamente procesadas por ELISA de HAstVs, de pacientes que presentaron cuadros de gastroenteritis aguda (incluidas las 28 positivas a HAstVs, las 5 indeterminadas y 112 negativas a HAstVs y con volumen suficiente, obtenidas por ELISA). El ARN extraído y purificado se conservó en alícuotas a -20 y -70°C, hasta su uso.

Se realizó una búsqueda bibliográfica para la selección de iniciadores para la RT-PCR, donde los iniciadores MON 340/348 son los de mayor uso para la detección general de HAstVs, ya que a partir del producto de amplificación, se puede realizar una segunda PCR para la subtipificación del genotipo de HAstVs (Walter, y col., 2001; Papaventis, D., y col., 2008; Liu, M-Q, y col., 2007; Myrmel, M., y col., 2006)

Se seleccionó la enzima Titán de la marca ROCHE para llevar a cabo la reacción de RT-PCR en un solo paso, ya que una de sus características es no ser termolábil, y actuar como una retrotranscriptasa y polimerasa al mismo tiempo.

La estandarización de la RT-PCR se realizó a partir del análisis de dos muestras positivas de acuerdo a lo reportado por Walter y colaboradores: a) una con una D.O. alta (con clave 1852), y b) otra con una D.O. baja (con clave 1026); además se incluye como control de reacción agua grado biología molecular. El equipo utilizado fue el termociclador Veriti[®] (Applied Biosystems by Life technologies, México).

Con los productos obtenidos, se llevó a cabo una electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y teñidos con EtBr para observar los amplicones de cADN obtenidos utilizando como referencia el marcador de tamaño molecular VIII. Los resultados se muestran en la figura 14.

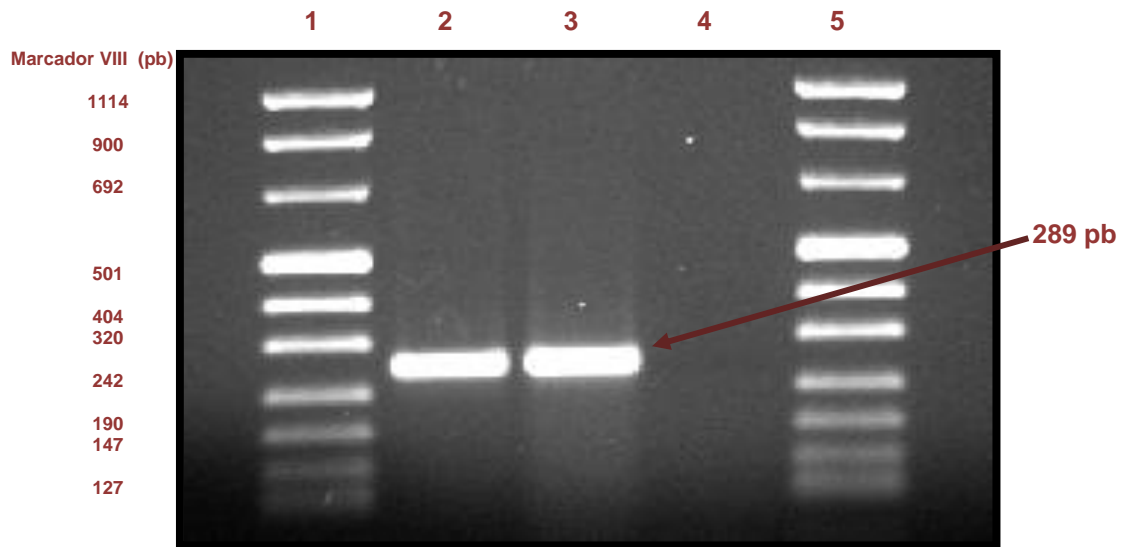


Figura 14: Gel de agarosa al 1.5% para la detección de HAstVs. Se muestran los amplicones de 289 pb correspondientes al tamaño esperado de la región de la proteasa de HAstVs. En el carril 1 y 5 se encuentra el marcador de tamaño molecular VIII; en el carril 4 se encuentra el control negativo de la reacción; en el carril 2 la muestra con clave 1026 con una D.O. de 0.339 y en el carril 3 la muestra con clave 1852 con una D.O. de 1.42.

Los amplicones que se obtuvieron fueron de 289 pb, tamaño descrito por los autores que utilizaron los iniciadores MON340/MON348 para la identificación de HAstVs. Se observa que en el carril 3 el amplicón presenta una mayor intensidad, lo que indica que se encuentra en mayor concentración. Dicha muestra se eligió para ser secuenciada. El resultado de secuenciación confirma que la muestra con clave 1852 pertenece al género HAstVs serotipo 8, razón por la cual la muestra se utilizó como control positivo para los ensayos subsecuentes (Figura 15).

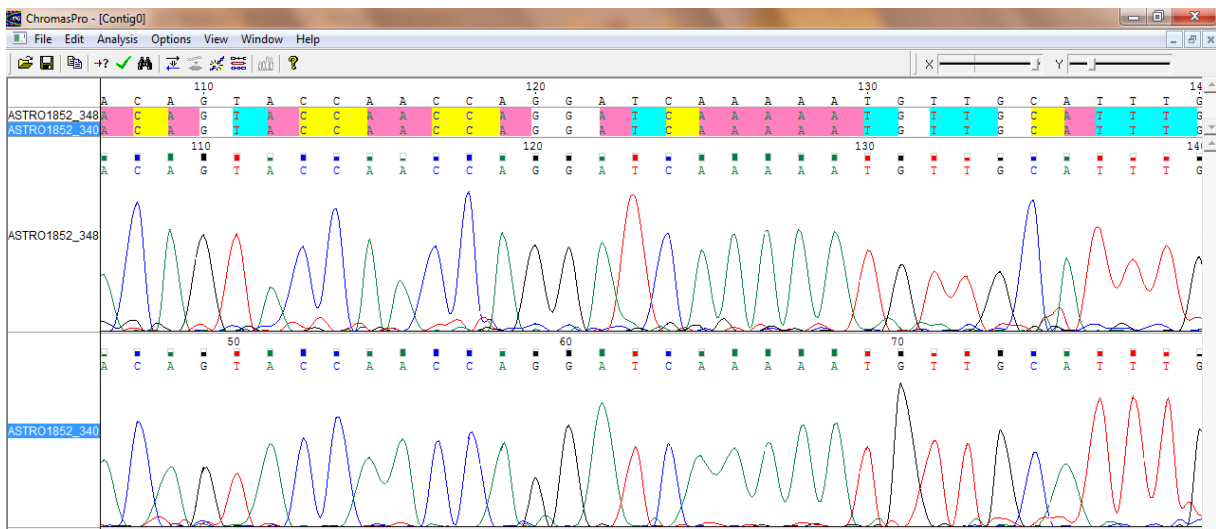


Figura 15: Electroferograma obtenido de la secuenciación del control positivo de HAstVs. Muestra del banco negativo de Rotavirus con clave 1852, positiva a ELISA para HAstVs y secuenciada para confirmación del género *Astrovirus*.

Prueba de Reactividad cruzada de los iniciadores MON34/MON348 con otros virus Gastrointestinales.

Esta prueba se realizó para verificar que los iniciadores seleccionados son específicos para HAstVs y no producen amplicones con otros virus gastrointestinales, tales como Rotavirus, Adenovirus humano y Norovirus humano, los resultados se observan en la **figura 16**.

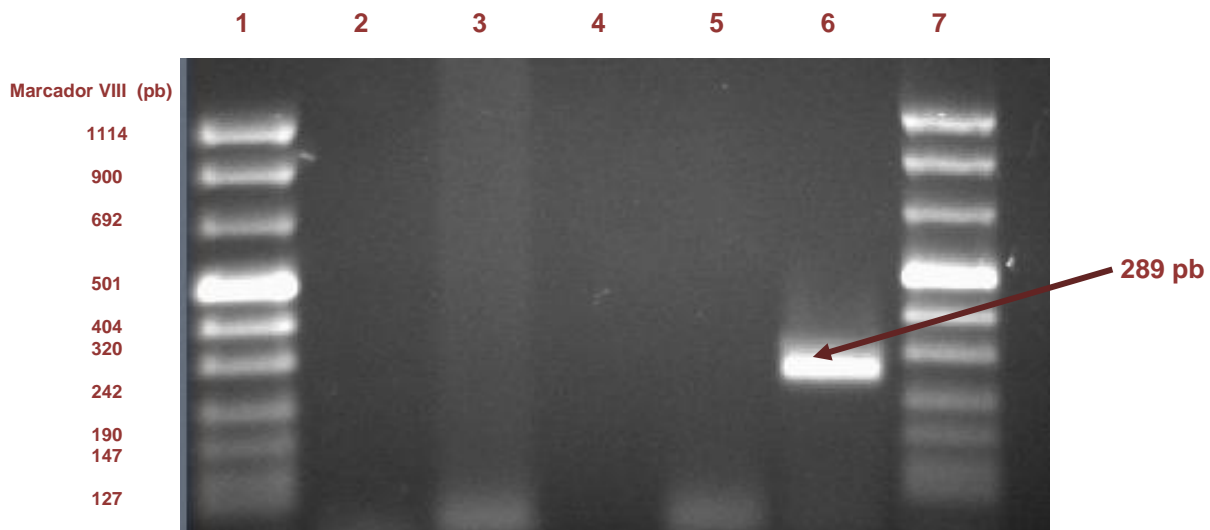


Figura 16: Gel de agarosa al 1,5% para la prueba de reactividad cruzada de los iniciadores MON 340/348 en la identificación de HAstVs. Los oligonucleótidos se probaron con otros agentes virales causantes de gastroenteritis aguda: carril 3: cepa prototipo PRICE de Rotavirus; carril 4: muestra positiva a Adenovirus; carril 5: muestra positiva a Norovirus; carril 6: control positivo de HAstVs; carril 2: control negativo de la reacción; carriles 1 y 7: Marcador de peso molecular VIII.

- **OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR.**

Límite de cuantificación.

Para llevar a cabo la prueba de límite de detección de ARN viral, se realizaron diluciones seriadas de la muestra control con un factor de 2, dichas diluciones se leyeron en el equipo NanoDrop ND-2000 de la marca ThermoScientific que cuantifica ácidos nucleicos, ya sea ARN o ADN, además de proteínas. Dicho instrumento es un espectrofotómetro que permite realizar medidas en un amplio rango de longitudes de onda sin necesidad de utilizar cubetas o capilares; tan sólo requiere un volumen de muestra de 0.5 a 2 μ l (según el tipo de muestra); además el software asociado al equipo incorpora una serie de aplicaciones específicas para el tipo de medición que se desee realizar (ácidos nucleicos, proteínas a 280 nm, Bradford, Lowry, cuantificación de marcajes fluorescentes, etc.).

En este caso el equipo se utilizó para la cuantificación de ARN total. Posteriormente se realizó la RT-PCR a cada muestra, los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la **tabla 4** y en la **figura 17**:

Tabla 4: Valores de concentración del control positivo en la prueba del límite cuantificación

FACTOR DE DILUCIÓN	Control positivo ng/ μ L
1×2^0	23.3
1×2^{-1}	11.7
1×2^{-2}	5.9
1×2^{-4}	2.3
1×2^{-8}	1.1
1×2^{-16}	0.4
1×2^{-32}	0.4
1×2^{-64}	0.6
1×2^{-128}	0.4
1×2^{-256}	0.1
1×2^{-512}	0.3
1×2^{-1024}	0.3

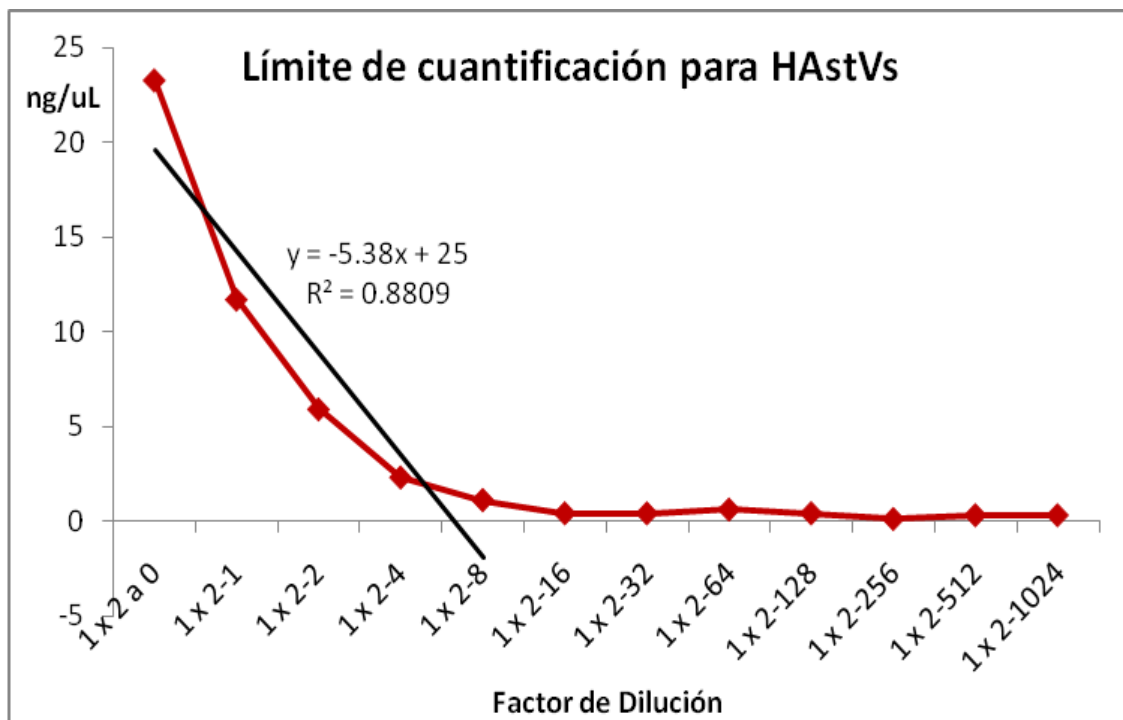


Figura 17: Gráfica del límite de cuantificación para el control positivo de HAstVs.

Límite de detección

El límite de detección es la cantidad mínima de material genético presente en una muestra que se requiere para que se pueda apreciar su amplificación. Los resultados de las diluciones que se utilizaron para el límite de cuantificación, se ilustran en la figura 18.

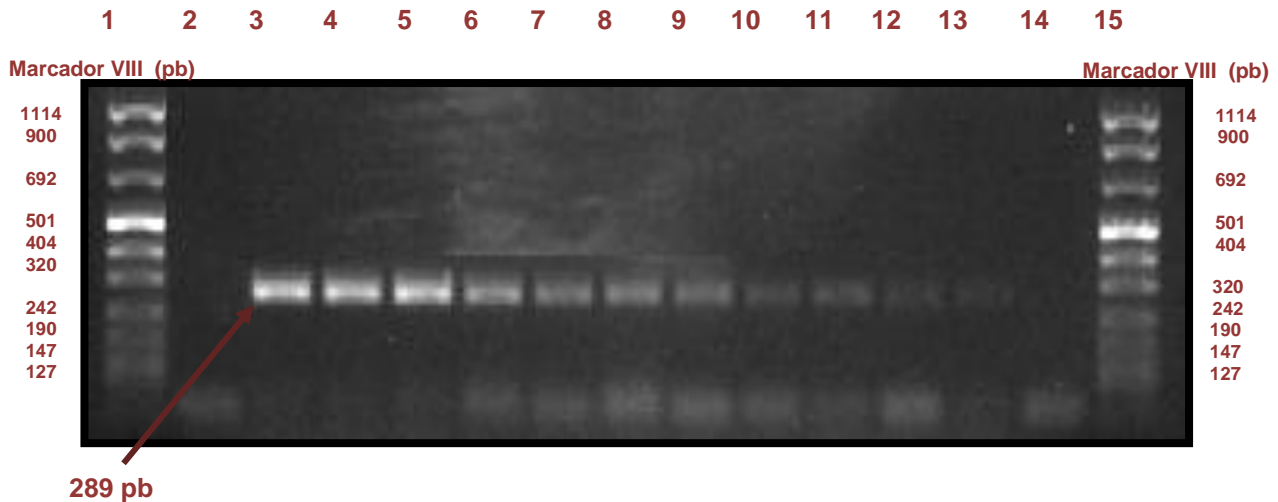


Figura 18: Gel de Agarosa al 1.5% para la prueba de límite de detección de cADN de HAstVs, donde el carril 1 y 15 corresponden al marcador de peso molecular VIII; carril 2: control negativo de reacción; carril 3: control positivo; del carril 4 al 15 corresponden a las diluciones seriadas de 2^0 , 2^2 , 2^4 , 2^8 , 2^{16} , 2^{32} , 2^{64} , 2^{128} , 2^{256} , 2^{512} , 2^{1024} y 2^{2048} , respectivamente.

Una vez establecidas las condiciones para la detección de HAstVs, se realizaron modificaciones en: a) la cantidad de enzima en la mezcla de reacción; b) la cantidad de ARN molde para la RT-PCR, para que con estos resultados se pudiera obtener un resultado óptimo con una cantidad mínima de reactivos y de ARN molde.

Variación en la cantidad de Enzima Titán

La cantidad de enzima en la mezcla de reacción para cualquier PCR influye en la cantidad de copias obtenidas en el mismo, como consecuencia, la cantidad y concentración adecuada de la enzima nos permitirá la obtención de un amplicón con buena intensidad, por otro lado, el exceso de ella puede originar la inhibición de la reacción lo que originaría falsos negativos, y finalmente, una concentración baja de enzima provocaría que al no haber la cantidad suficiente de ella, no se amplifique el producto deseado, obteniendo un falso negativo.

Se seleccionaron 3 cantidades de enzima: 0.3, 0.5 y 1.0 μL . Por especificaciones del fabricante la cantidad a utilizar de una enzima es de 1 μL ; sin embargo lo que se ha observado que la actividad de la enzima sigue siendo óptima en volúmenes

menores, por lo que se puede dar un ahorro de insumos. Bajo condiciones idénticas de cantidades de mezcla de reacción y termociclado que las pruebas anteriores, los resultados se encuentran resumidos en la **tabla 5** y en la **figura 19**.

Tabla 5: Variación en la cantidad de Enzima Titán en la mezcla de reacción de RT-PCR para HAstVs.

Cantidad de enzima	Resultado
0.3 μL	Positiva 2+
0.5 μL	Positiva 3+
1.0 μL	Positiva 1+

NOTA: La intensidad de cruces es proporcional a la cantidad “teórica” de copias del ADN blanco.

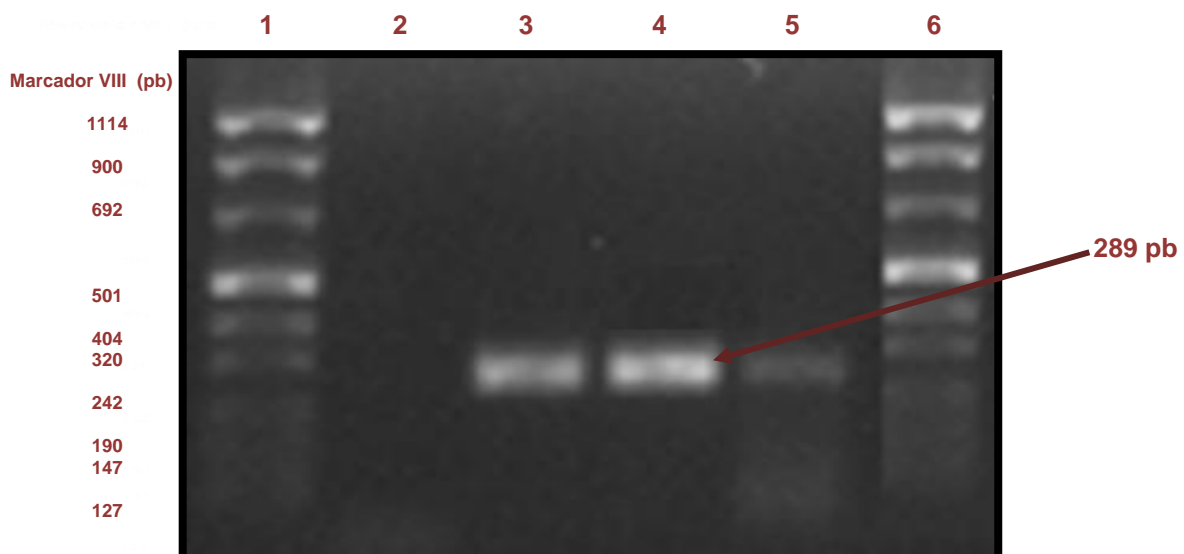


Figura 19: Gel de agarosa al 1.5% para la prueba de variación en la cantidad de enzima Titán en la RT-PCR de HAstVs. El carril 1 y 6 corresponden al marcador de peso molecular VIII; carril 2: control negativo de reacción; carril 3: producto de amplificación con 0.3 μL de enzima; carril 4: producto de amplificación con 0.5 μL de enzima; carril 5: producto de amplificación con 1.0 μL de enzima.

- **Variación en el volumen de ARN molde.**

Se seleccionaron 4 cantidades diferentes de ARN molde, partiendo de la premisa de que 5 μL de extracto son suficientes para una amplificación adecuada de acuerdo a la cantidad que muestra que fue utilizada por el autor Walter y colaboradores. bajo condiciones idénticas en el resto de los reactivos de la mezcla de reacción y las mismas condiciones de termociclado, los resultados se encuentran resumidos en la **tabla 6** y en la **figura 20**.

Tabla 6: Variación en la cantidad de ARN molde en la mezcla de reacción para la identificación de HAstVs.

Cantidad de templado	Resultado
1 μL	1+
3 μL	3+
5 μL	3+
10 μL	3+

La intensidad de cruces es proporcional a la cantidad “teórica” de copias del ADN blanco

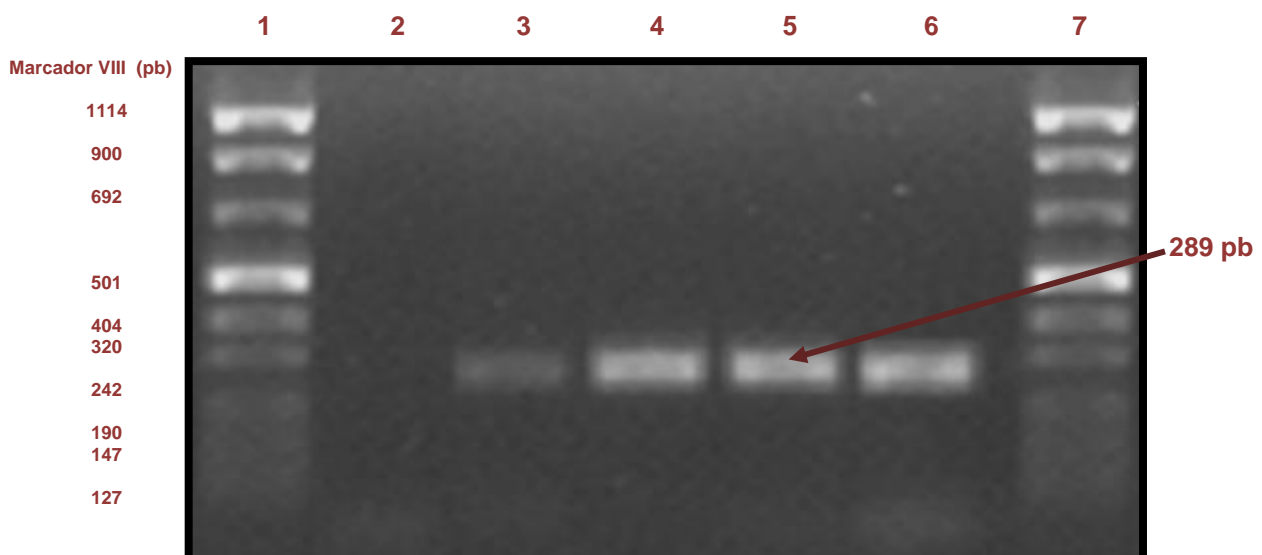


Figura 20: Gel de agarosa al 1,5% para la detección de HAstVs con diferentes volúmenes de ARN molde. El carril 1 y 7 corresponden al marcador de peso molecular VIII; carril 2: control negativo de reacción; carril 3: producto de amplificación con 1 μL de ARN molde; carril 4: producto de amplificación con 3 μL de ARN molde; carril 5: producto de amplificación con 5 μL de ARN molde; carril 6: producto de amplificación con 10 μL de ARN molde.

- **Temperatura de almacenamiento de los extractos de ARN.**

A lo largo del estudio se observó que la intensidad del amplicón de la muestra control disminuía paulatinamente, por lo que se realizó una nueva extracción de la muestra con clave 1026 y del control positivo (1852). Se hicieron 2 alícuotas de cada una de las extracciones y se sometieron a diferentes temperaturas de almacenamiento (-20°C y -70°C). Los resultados se muestran en la **figura 21**.

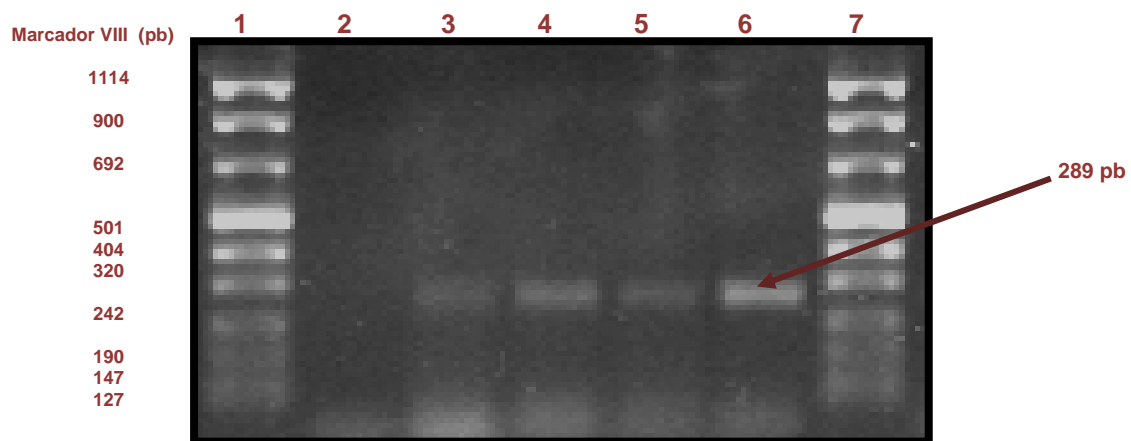


Figura 21: Amplificación de la región de la polimerasa de HAstVs utilizando ARN molde almacenado a diferentes temperaturas. El carril 1 y 7 corresponden al marcador de peso molecular VIII; carril 2: control negativo de reacción; carril 3: producto de amplificación de la muestra 808 almacenada a -20°C; carril 4: producto de amplificación de la muestra 808 almacenada a -70°C; carril 5: amplificación del control positivo almacenado a -20°C; carril 6: producto de amplificación del control positivo almacenado a -70°C.

- **Detección de HAstVs en muestras clínicas por medio de la técnica de RT-PCR.**

Una vez optimizada la técnica de RT-PCR para el diagnóstico de HAstVs, se procedió al análisis de 145 muestras clínicas: las 28 muestras positivas a ELISA, 5 indeterminadas y 112 negativas a la misma técnica. Del total de muestras procesadas por RT-PCR, 39 muestras resultaron positivas a HAstVs y 106 negativas, dando un 27% de positividad para la detección de HAstVs. La figura 21 corresponde a un gel de agarosa representativo de las muestras positivas por RT-PCR, donde se incluyen los controles positivos y negativos, así como una muestra negativa que corresponde a una muestra indeterminada por ELISA (figura 22).

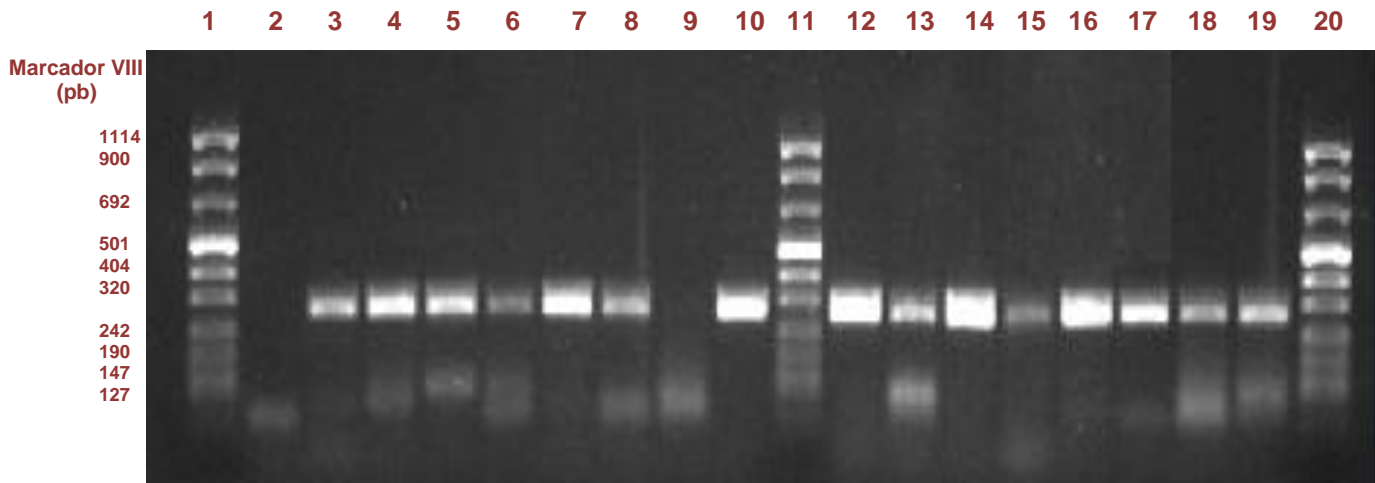


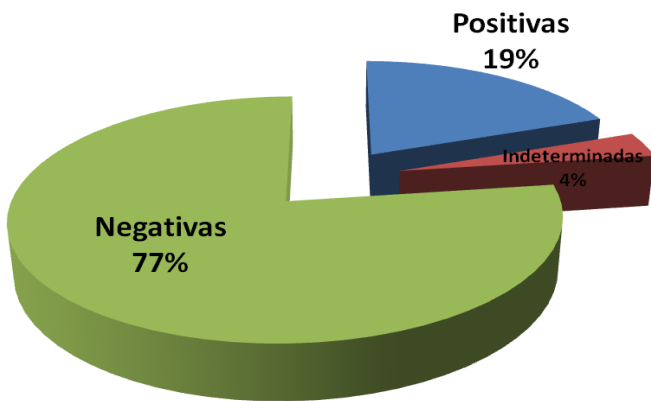
Figura 22: Gel de agarosa al 1.5% representativo de las muestras clínicas analizadas por RT-PCR para el diagnóstico de HAstVs. El carril 1, 11 y 20 corresponden al marcador de peso molecular VIII; carril 2: control negativo de reacción; carril 3: control positivo; del carril 4 al 19 corresponden a las muestras clínicas. En el carril 9 corresponde a una muestra indeterminada a ELISA y que por ésta técnica es negativa.

Dentro de éstos resultados se tienen datos interesantes en cuanto a la comparación de las técnicas diagnósticas: se corroboró el resultado de las 28 muestras positivas a ELISA; se obtuvo que las 5 muestras con resultado indeterminado a ELISA por RT-PCR fueron negativas; y lo más importante, que 11 muestras negativas por ELISA resultaron ser positivas por RT-PCR, demostrando que ésta última técnica de diagnóstico es mucho más sensible y específica que la ELISA (**Tabla 7**). En la figura 23 se aprecia una comparación de las técnicas de diagnóstico para HAstVs en %.

Tabla 7: Comparación de las técnicas de diagnósticas para la identificación de HAstVs en muestras clínicas

Método de diagnóstico \ Resultado	Muestras seleccionadas de la Técnica de ELISA	RT-PCR
Positivas	28	28
Indeterminadas	5	5 negativas
Negativas	112	101 negativas
		11 positivas
Total	145	145

% en el diagnóstico de HAstVs por la técnica de ELISA



% en el diagnóstico de HAstVs por la técnica de RT-PCR

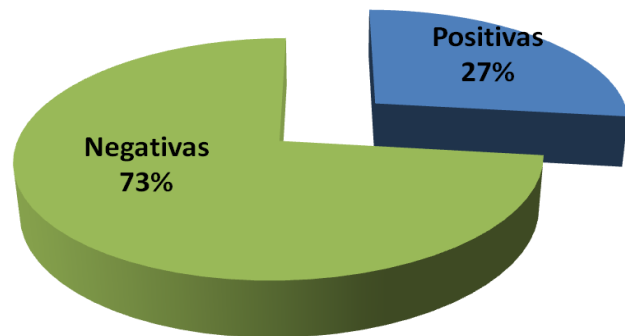


Figura 23: Gráficas comparativas, en %, de las técnicas diagnósticas para HAstVs.

Se observa un aumento en el número de muestras positivas por la técnica de RT-PCR

En la **tabla 8** se enlistan las muestras positivas a HAstVs que se obtuvieron en éste estudio. Se puede observar las 11 muestras que resultaron negativas a la técnica de ELISA y que fueron positivas por medio de la técnica de RT-PCR.

De acuerdo a la recopilación de los datos de las muestras positivas a HAstVs, se contabilizó el número de muestras por entidad federativa, mostrando que los estados con un mayor número de casos de EDA causada por HAstVs son Tamaulipas (31%) y Michoacán (23%), como se puede apreciar en la **figura 24**. De igual manera se aprecia que la mayoría de los pacientes que fueron positivos a HAstVs fueron niños en el rango de 7 a 18 meses, como lo muestra la **figura 25**.

Tabla 8: Datos Generales de las muestras clínicas positivas a la identificación de HAstVs por la técnica de RT-PCR

No.	Clave InDRE	FTM	ESTADO	EDAD	SEXO	RESULTADO ELISA	Resultado RT-PCR
1	0023	04/01/2008	Michoacán	1 ^a	F	Negativo	3+
2	0026	09/01/2008	Michoacán	8m	M	Negativo	½+
3	0060	12/01/2008	Tamaulipas	1a 2m	F	Negativo	3+
4	0084	21/01/2008	Michoacán	11m	F	Negativo	2+
5	0104	01/02/2008	Michoacán	9m	M	Negativo	3+
6	0464	24/02/2008	Tamaulipas	1a 6m	F	0.995	3+
7	0535	10/03/2008	Tamaulipas	5a 8m	M	0.209	1+
8	0808	30/03/2008	Michoacán	1a 3m	F	0.429	3+
9	1477	30/03/2008	Hidalgo	1a 6m	F	1.205	½+
10	1026	15/04/2008	Tamaulipas	3a 5m	F	0.339	3+
11	1469	20/05/2008	Hidalgo	1a 11m	F	0.949	1+
12	1906	27/07/2008	Tamaulipas	8 ^a	F	3.05	1+
13	1852	04/08/2008	Tamaulipas	2a 10m	M	2.469	3+
14	2049	10/09/2008	Veracruz	1a 6m	F	2.646	3+
15	2147	11/11/2008	Tamaulipas	2a 1m	M	0.925	3+
16	0019	09/12/2008	Michoacán	8m	M	Negativo	3+
17	2163	10/12/2008	Quintana Roo	1 ^a	M	1.592	3+
18	0018	10/12/2008	Michoacán	11m	F	Negativo	3+
19	0025	18/12/2008	Michoacán	5m	M	1.312	3+
20	0086	21/12/2008	Yucatán	1a 9m	M	Negativo	1/8+
21	0005	22/12/2008	Durango	9m	F	Negativo	1+
22	0068	09/01/2009	Michoacán	1a 5m	F	Negativo	1+
23	0085	23/01/2009	Campeche	3a	M	Negativo	1+
24	0264	15/02/2009	Yucatán	2a	F	1.452	3+
25	0293	11/03/2009	Campeche	1a 3m	F	0.114	3+
26	0294	12/03/2009	Campeche	6m	M	0.354	2+
27	0451	16/03/2009	San Luis Potosí	1a 3m	M	1.774	3+
28	0457	24/03/2009	San Luis Potosí	1a 7m	F	0.127	1+
29	0491	25/03/2009	Tamaulipas	2a 5m	M	0.25	3+
30	0466	21/04/2009	Hidalgo	1a 10m	M	0.152	3+
31	0663	27/04/2009	Tamaulipas	1a 4m	F	0.898	3+
32	0729	11/06/2009	Tamaulipas	1a	F	2.576	3+
33	0888	02/09/2009	Campeche	1a	M	1.224	3+
34	0920	15/09/2009	Quintana Roo	2a 10m	M	0.161	½+
35	0923	05/10/2009	Distrito Federal	1a	M	0.237	1+
36	0922	05/10/2009	Distrito Federal	1a	M	2.095	3+
37	0073	/	Nuevo León	7m	M	0.478	2+
38	0510	/	Tamaulipas	10m	F	0.161	½+
39	0511	/	Tamaulipas	1a 1m	F	0.781	2+

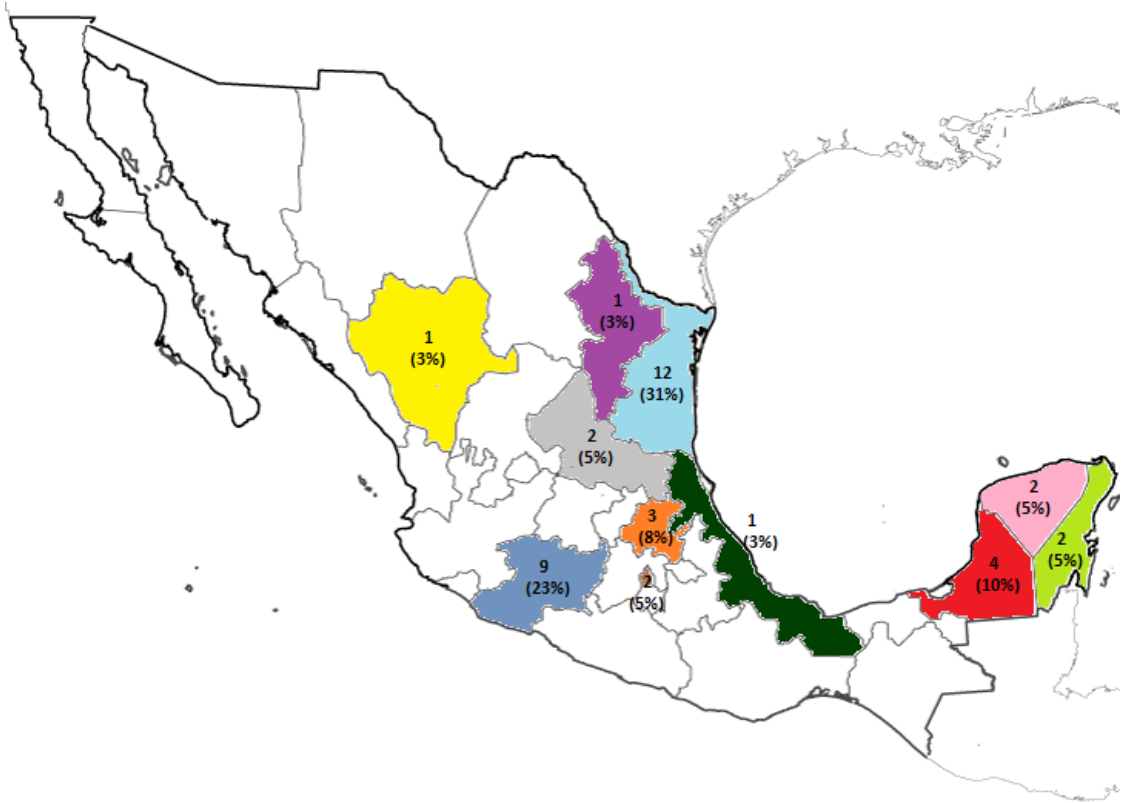


Figura 24: Distribución de casos positivos a HAsTVs en México. Donde se puede apreciar las entidades con presencia de casos de GAV causada por HAsTVs.

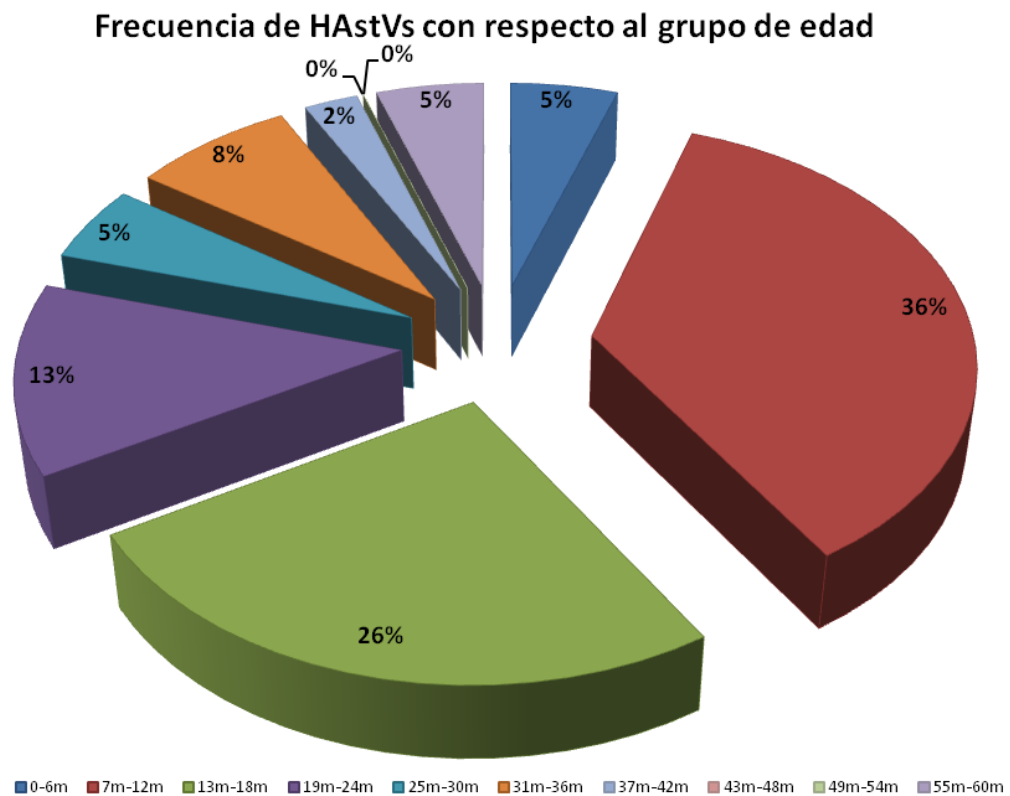


Figura 25: Frecuencia de los casos Positivos a HAsTVs con respecto al grupo de edad

En lo que respecta al sexo, no se observaron cambios significativos por lo que podemos decir que la enfermedad causada por HAstVs afecta a ambos sexos por igual, como se muestra en la **figura 26**.

HAstVs con respecto al género de la población

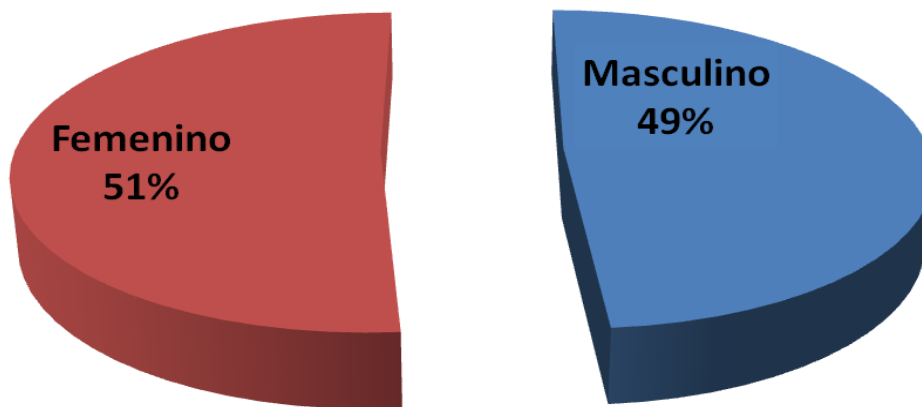


Figura 26: Frecuencia de casos positivos con respecto al género de la población del estudio.

- **Presencia de HAstVs durante el tiempo de estudio.**

El total de casos que se procesaron por la técnica de ELISA y RT-PCR se ilustra en la **figura 27**. Se puede apreciar que existe un mayor número de muestras procesadas por la técnica de ELISA (línea azul) ya que es una técnica menos costosa y con alta sensibilidad y especificidad, además de que nos permite hacer un tamizaje de muestras para la RT-PCR (barra verde). Se observa que al inicio del estudio hay un ligero aumento de las muestras que fueron procesadas por RT-PCR con respecto a las de ELISA, esto debido a que en ese momento no se contaban con los kits para realizar la ELISA y por lo tanto, sólo quedaba el recurso de la RT-PCR; no obstante, observamos que en su mayoría las muestras fueron negativas, razón por la cual se decidió primero hacer el tamizaje por medio de la técnica de ELISA y posteriormente seleccionar, de manera aleatoria, muestras negativas a ELISA para su procesamiento por RT-PCR. En la misma figura se aprecia un incremento de muestras positivas de HAstVs en los meses de enero-marzo 2008, diciembre 2008 – marzo 2009; aunque también se tienen casos esporádicos en los meses de lluvia (julio – octubre de ambos años).

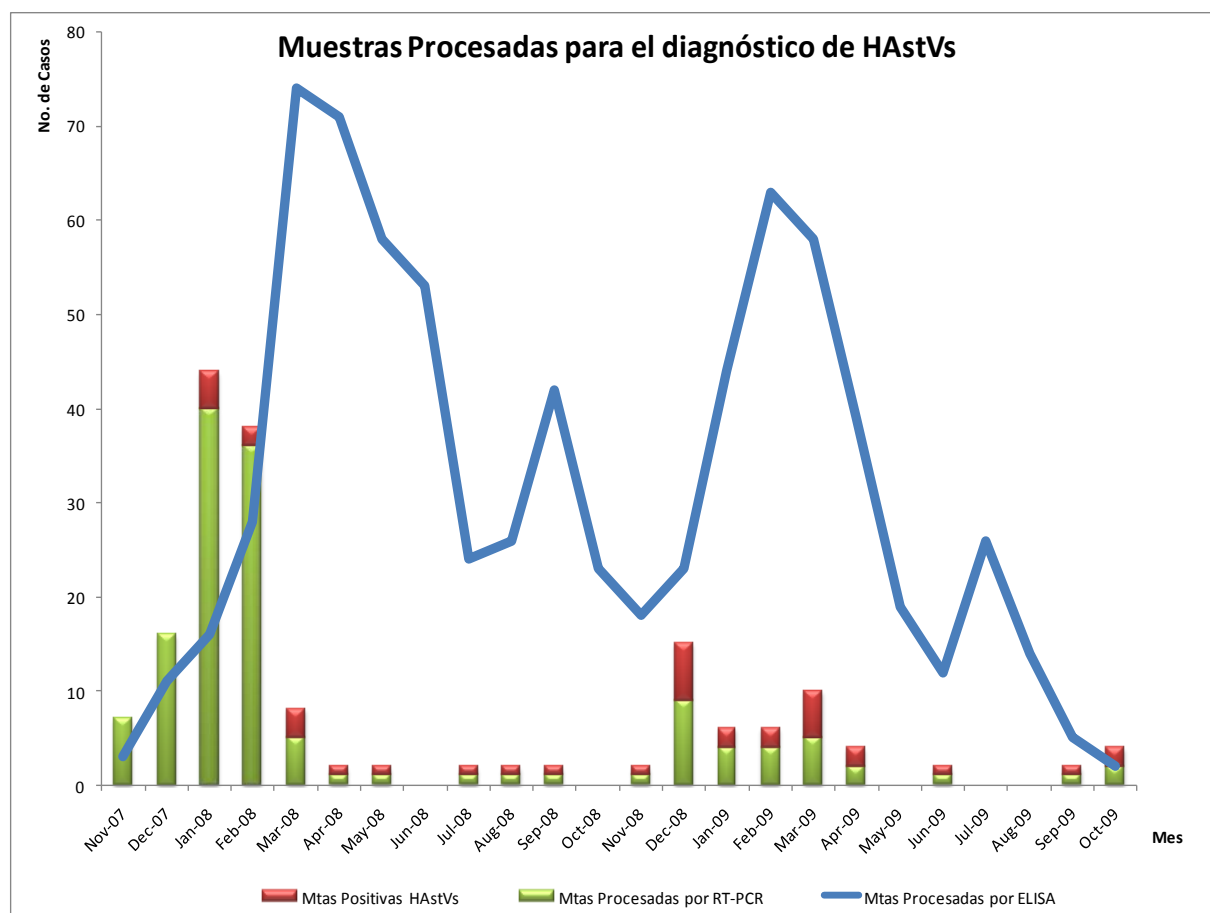


Figura 27: Estacionalidad de HAstVs durante el periodo de estudio, con respecto al total de muestras procesadas por mes.

• **Secuenciación**

Para el análisis de secuencia se seleccionaron 12 muestras positivas a HAstVs determinadas por RT-PCR y utilizando como criterio arbitrario de selección la intensidad de bandas de amplificación. Los resultados indican la relación existente entre las 12 secuencias obtenidas y las secuencias tipo del serotipo 4 y 8, según se indica en la figura 28.

Existe un grupo de 4 muestras que no se agrupan dentro de las secuencias tipo consultadas, sin embargo, ahora sabemos que existe un nuevo serotipo, el MLB1, en el que suponemos se encuentran estas cepas.

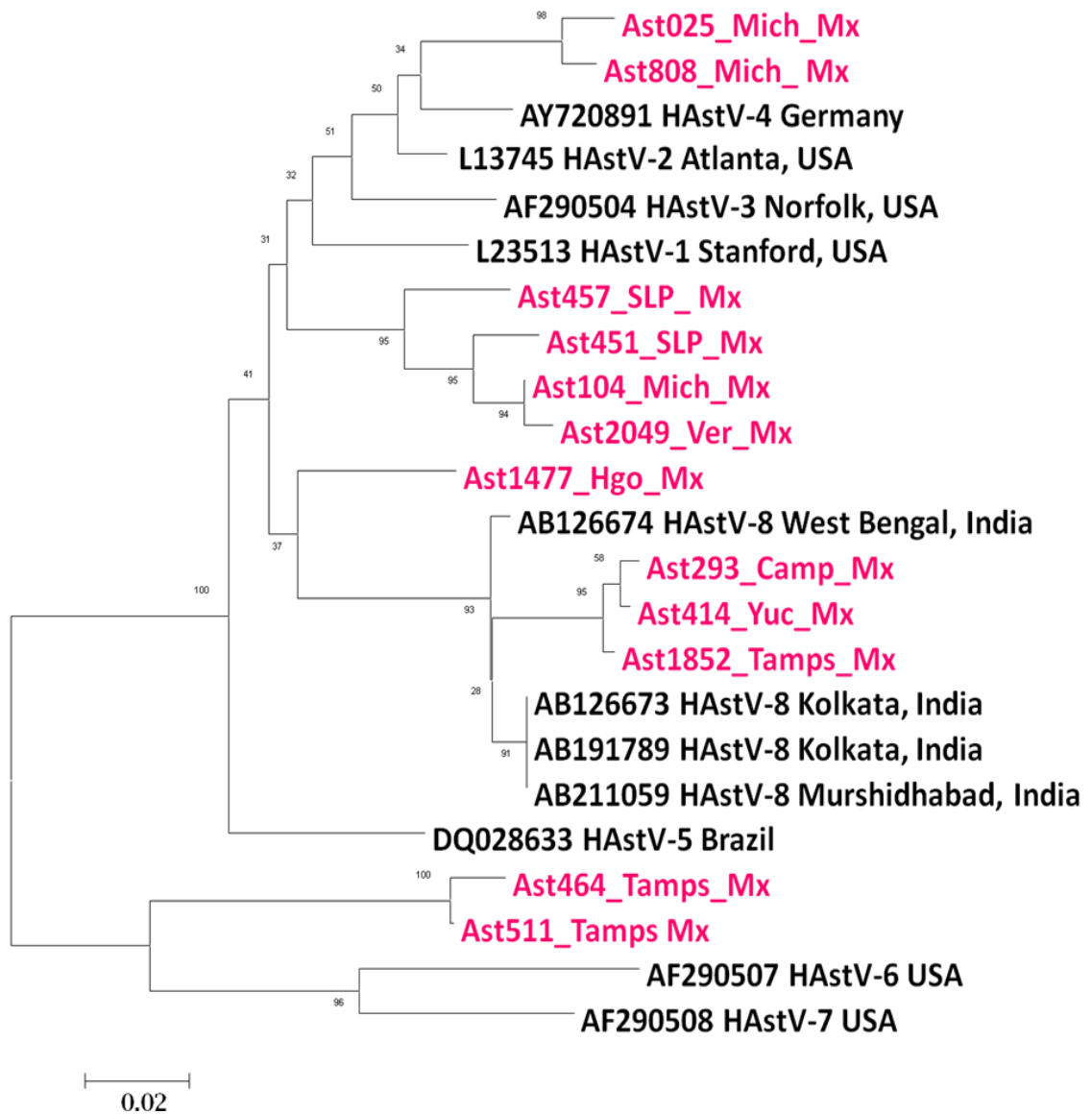


Figura 28: Árbol filogenético de las cepas de HAstVs circulantes en México. Análisis filogenético de 12 secuencias nucleotídicas parciales de la región ORF1b de HAstVs detectadas en este estudio junto con secuencias tipo reportadas en el GenBank. Los números en las ramas indican los valores de Bootstrap, indicados como el porcentaje de 1000 réplicas usando el método del vecino más cercano junto con el modelo de p-distancia. La escala de distancia evolutiva muestra el número de sustituciones nucleotídicas por posición.

8. Discusión.

Los agentes causales de la gastroenteritis aguda han sido de difícil identificación dado que cada día existe un mayor número de agentes etiológicos para este padecimiento; entre estos agentes se encuentran las bacterias, los virus, los parásitos y los protozoarios.

Las enfermedades diarreicas son una causa principal de mortalidad y morbilidad en la población infantil a nivel mundial, y por lo general son consecuencia de la exposición a alimentos o agua contaminados con heces. A nivel mundial, alrededor de mil millones de personas carecen de acceso a fuentes de agua mejoradas y unos 2500 millones no tienen acceso a instalaciones básicas de saneamiento, por lo que la diarrea causada por este tipo de infecciones es más frecuente en países en desarrollo.

El presente trabajo se basó en la optimización de la técnica de RT-PCR como método diagnóstico para HAstVs con el fin de conocer un poco más acerca de su epidemiología en México.

Se utilizó la técnica de inmunensayo enzimático (ELISA) como prueba tamiz, esto con el fin de localizar muestras positivas a HAstVs. Dicha técnica se basa en la detección del antígeno del virus, y a pesar de que la especificidad y sensibilidad de la técnica son altas (98.3 y 100% respectivamente, de acuerdo a las especificaciones del fabricante) tiene la enorme desventaja de que la partícula viral tiene que estar bien conservada para que se pueda detectar el antígeno de la cápside; y existen factores como la temperatura de transporte y almacenamiento de la muestra, los ciclos de congelación-descongelación y la cantidad excretada de virus, que no son óptimos y destruyen la cápside, impidiendo que sea identificada por éste método.

Mediante el método de ELISA fue posible procesar 812 muestras negativas a Rotavirus, de las cuales 28 muestras fueron positivas, 5 indeterminadas y 779 negativas; dando un 3.5% de positividad, lo que coincide con lo reportado en la literatura mundial.

Una vez identificadas las muestras positivas a HAstVs por la técnica de ELISA, se seleccionaron 2 muestras: la primera con clave 1852 que mostró una lectura de D.O. de 2.469 (alta); y una segunda muestra con clave 1026 y con una lectura de D.O. de 0.339 (baja), ambas con un volumen en existencia superior a los 15 mL. A partir de estas muestras se llevó a cabo la extracción de ARN con el kit comercial QIAmp con el objetivo de estandarizar la RT-PCR de acuerdo a lo reportado por Walter y colaboradores (2001)

El protocolo de termociclado de Walter y colaboradores (2001) fue elegido para la identificación de HAstVs porque utilizaba los iniciadores MON 340/ MON 348 y consistía en un estudio realizado con muestras de pacientes mexicanos; la enzima que se utilizó fue la enzima Titán de la marca ROCHE, que es una enzima con función de retrotranscriptasa y polimerasa en un solo paso y finalmente los volúmenes de los reactivos para la mezcla de reacción fueron determinados por el fabricante de la enzima.

Como prueba inicial se procesaron las 2 muestras positivas seleccionadas y como control negativo se utilizó agua grado biología molecular. Los productos de cADN se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV. Se obtuvo un amplicón de 289 pb que correspondía al tamaño de amplicón que generaban los iniciadores teóricamente (figura 14).

Para corroborar que el producto obtenido pertenecía al género HAstVs, se procedió a secuenciar la muestra 1852, ya que era la que tenía una mayor carga viral (por la intensidad del amplicón en el gel de agarosa) y de ese momento en adelante se ocuparía como control positivo. El resultado de secuenciación confirmó que la muestra pertenecía al género HAstVs y específicamente se trataba del genotipo 8 (HAstV-8), genotipo que sólo se ha identificado escasamente a nivel mundial, pero que se sabía de ante mano que circulaba en México (figura 15).

Además, para corroborar la especificidad del ensayo de RT-PCR se probó la amplificación de los iniciadores frente a otros virus gastrointestinales, como lo son: Rotavirus (prototipo: PRICE), Norovirus y Adenovirus Entérico, además del control de HAstVs y se sometieron al mismo protocolo para la identificación de HAstVs

(prueba de reactividad cruzada, figura 16). El resultado obtenido fue que los iniciadores solo amplificaron la muestra que contenía el virus de HAstVs, indicador de que los iniciadores son específicos para éste género y que por lo tanto no existe el riesgo de amplificar el ARN de otro virus gastrointestinal.

Una vez identificado un control positivo a HAstVs, habiendo comprobado que los iniciadores no cruzaban con otro tipo de virus y que la mezcla de reacción era la adecuada; se procedió a la optimización de la técnica de RT-PCR, el primer paso fue detectar los límites de cuantificación (cuánto puedo cuantificar del virus) y el límite de detección (cuál es la cantidad o volumen mínimo que se requiere de ARN molde para poder observar el producto de amplificación).

Para la prueba del límite de detección, se llevaron a cabo diluciones seriadas con factor de 2 del control positivo y se cuantificaron en el equipo NanoDrop™ (ThermoFisher Scientific). Se realizó una gráfica con los resultados obtenidas (figura 17) que muestra que a partir de la dilución 1×2^{-16} la cuantificación de ARN viral se mantiene prácticamente con “valores constantes”, esto se debe que la cantidad de ARN no es lo suficientemente alta como para obtener una lectura mayor a 0.6 – 0.4 ng/ μ L; por lo tanto podemos decir que para el control el límite de cuantificación se establece en la dilución 1×2^{-16} .

Para el límite de detección se analizaron las diluciones que se llevaron a cabo previamente. Dichas muestras se procesaron por medio de RT-PCR y los productos de la amplificación se corrieron en un gel de agarosa y se obtuvo la figura 18; donde se puede apreciar que el límite de detección, que se define como la concentración mínima de ARN molde requerido para que la amplificación por la técnica de RT-PCR sea visible, fue en la dilución 2^{-1024} . Esto resulta ya que una de las características más atractivas de la PCR es que la cantidad y calidad de la muestra de ADN sujeta a amplificación no necesita ser alta; sólo basta una sola célula, un lisado celular o especímenes con una longitud promedio de unos pocos cientos de pares de bases para que sean adecuadas para una amplificación exitosa. El criterio esencial es que la muestra contenga al menos una cadena de ADN intacta (en este caso ARN) que abarque la región que va a ser amplificada para poder observar el producto de amplificación. En consecuencia, aunque a dilución 2^{-1024} no se tenga un valor

cuantificable, existe una mínima cantidad de material genético suficiente para que sea amplificado y visualizado por medio del gel de agarosa.

Otras variables en el estudio fueron la variación en la cantidad de enzima y del templado. El objetivo del ensayo de variación de la cantidad de enzima es optimizar la técnica de tal forma, que con la mínima cantidad de reactivos se pueda dar un resultado confiable. En este sentido, se considera un rango óptimo entre 1 y 2.5 unidades por 100 μL de reacción, sin embargo, los requerimientos de la enzima pueden variar con respecto a la secuencia blanco o los iniciadores. Además se debe tener en cuenta que si la concentración de la enzima es muy alta se acumulan productos inespecíficos, y si es muy baja se formara una cantidad insuficiente del producto deseado, dando falsos negativos.

Para el ensayo se utilizaron los volúmenes de: 1, 0.5 y 0.3 μL para identificar una cantidad óptima de enzima. En la figura 16 se observa que tanto el producto de amplificación con 0.3 y 0.5 μL de enzima es de una alta intensidad (3+), lo cual indica que la RT-PCR se llevó a cabo de manera correcta y con el óptimo funcionamiento de la enzima; sin embargo, al observar el producto con 1 μL de enzima, se aprecia una notable disminución en la amplificación (1+) lo que sugiere que al llegar a ésta cantidad de enzima la reacción se puede llegar a inhibir por la saturación de la misma en la mezcla de reacción y en consecuencia se puede llegar a presentar un falso negativo. Por éstos motivos, se decidió utilizar la cantidad de 0.5 μL para asegurar que existe una óptima concentración de la misma para que la reacción se lleve a cabo de manera satisfactoria sin caer en falsos negativos o en productos inespecíficos.

Una de las características más atractivas de la PCR, como ya se había mencionado, es que la cantidad y calidad de la muestra de ADN sujeta a amplificación no necesita ser alta. El criterio primordial es que la muestra contenga al menos una cadena de ADN intacto que abarque la región que va a ser amplificada y que las impurezas sean suficientemente diluidas como para no inhibir la polimerización. Por éste motivo se llevó a cabo la optimización en la cantidad de ARN molde en la mezcla de reacción para asegurar un resultado confiable con la cantidad mínima de extracto, la

figura 19 representa el resultado obtenido en la prueba de variación en la cantidad de ARN molde. Se aprecia que los productos de amplificación con 3, 5 y 10 μL , tienen la misma intensidad (3+), indicativo de que a estas concentraciones relativamente altas de carga viral, la reacción no se inhibe por exceso de ARN molde, Por otra parte cuando se utiliza 1 μL , el producto de amplificación es menos intenso (1/2+), indicativo de que no existe una cantidad suficiente de la secuencia diana para que el número de copias obtenidas en la PCR sean suficientes para que se observe un amplicón adecuado. Este dato es relevante, porque de llegar a contar con una muestra con una carga viral baja, 1 μL de templado no sería suficiente para que amplifique de manera correcta, dando como resultado un falso negativo.

Este resultado es de gran importancia, ya que una de las premisas que debemos considerar en los laboratorios es la de obtener resultados confiables con la menor cantidad de reactivos posible, razón por la cual no podríamos utilizar 1 μL de templado porque no aseguraríamos la confiabilidad del resultado; por otra parte, se tiene la información de que un exceso en la cantidad de ARN molde puede llegar a inhibir la reacción, motivo suficiente para no utilizar la cantidad de 10 μL a pesar de que nos dé una amplificación de 3+.

Durante la optimización de la técnica de RT-PCR, se observó que el control positivo presentaba una degradación de ARN durante los ciclos congelación-descongelación a los que se sometía, lo que condujo a realizar otra prueba. Una vez extraídas las muestras, se tomaron alícuotas de 30 μL del extracto y se almacenaron a -70°C , mientras que la otra se conservaba a -20°C , después de 2 meses de almacenamiento, se comprobó que la alícuota conservada en congelación presentaba una intensidad menor que la que se había guardado en ultracongelación, probando de ésta manera que el ARN de éste virus es muy lábil; premisa que conlleva al almacenamiento de los extractos de las muestras -70°C (figura 21).

Al finalizar la optimización de la técnica, se observó que a pesar de que se habían modificado las cantidades en la mezcla de reacción, el resultado obtenido fue óptimo al comprobar que la reacción no presentaba productos inespecíficos y que podíamos

asegurar una amplificación correcta (sin inhibiciones o restricciones de reactivos) sin comprometer el resultado.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de la RT-PCR (0.5 µL de enzima, 5 µL de ARN molde y temperatura de almacenamiento de los extractos de ARN total a -70°C), se procedió al análisis de muestras clínicas.

Se seleccionaron las 28 muestras positivas a ELISA, las 5 indeterminadas y 112 muestras negativas seleccionadas indistintamente (tomando en cuenta los brotes de diarrea que se presentaban en México) y se analizaron por RT-PCR.

Se confirmó el resultado de las 28 muestras positivas a HAstVs, las 5 indeterminadas fueron negativas, pero lo más importante, 11 de las 112 muestras negativas a HAstVs determinadas por ELISA, fueron positivas por RT-PCR. Este último resultado es muy relevante porque demuestra que la técnica de RT-PCR es mucho más sensible que los ensayos inmunoenzimáticos. Esto se atribuye a que la RT-PCR puede detectar cantidades bajas del genoma del agente viral, mientras que en la ELISA se detecta antígenos de la cápside del virus, la cual puede verse afectada por varias razones, entre ellas, la conservación de la muestra.

En la tabla 7 se aprecia un comparativo entre las técnicas, observamos que si bien por ELISA se tiene un 3.5% de positividad por la población del estudio, al comparar los porcentajes sólo con las muestras procesadas por RT-PCR, hay una diferencia del 8% en la positividad, valor considerable en el proceso.

Este análisis de muestras clínicas (n=145) permite sugerir que HAstVs es causa el 27% de gastroenteritis viral aguda en pacientes negativos a Rotavirus. Dicho porcentaje no concuerda con lo reportado frecuentemente a nivel mundial, donde varían del 3 al 15%; sin embargo concuerda con los estudios realizados en México (con una positividad de más del 60%) y uno en España (37% de positividad). Maldonado y col, demuestran que éste agente causal está presente con mayor frecuencia en las gastroenteritis agudas.

Con los resultados obtenidos en ésta comparación, resalta el resultado de esas 11 muestras que por ELISA fueron negativas y por RT-PCR resultaron positivas. Dicho resultado era de esperarse ya que esta última técnica se utilizan iniciadores específicos para la identificación de material genético, el cual no depende de la integridad de los antígenos de la cápside del virus, como es el caso de la ELISA y otras técnicas de diagnóstico como la inmunofluorescencia o la microscopia, y por ello es mucho más específico. Además se sabe, en teoría, que con tan sólo una copia de ARN basta para tomarla de molde y que amplifique el número de copias, pudiendo identificar al agente viral con mucho menos cantidad de muestra, lo que conlleva a una mayor sensibilidad.

Esencialmente la técnica RT-PCR permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de ADN, conociendo las secuencias que lo flanquean. Las aplicaciones de la PCR y de sus numerosas variantes son prácticamente ilimitadas:

- Simplifica muchos experimentos de ingeniería genética.
- Permite muchos estudios de expresión genética.
- Secuenciación directa de secuencias amplificadas.
- Detección de mutaciones.
- Seguimiento de la efectividad de tratamiento de enfermedades.
- Diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas.
- En la ciencia forense: identificación de restos biológicos, determinación de paternidad, pruebas periciales en criminalística.
- E incluso tiene aplicaciones en arqueología y paleontología.

A pesar de que la técnica implica equipo medianamente costoso, el beneficio para los laboratorios de salud pública es muy grande, dado que pueden implementar diversos diagnósticos de agentes infecciosos con una sensibilidad y especificidad alta, sin gastar en metodologías más costosas como microarreglos o las sondas para la PCR tiempo real. Así mismo, los resultados obtenidos mediante éstas técnicas en los laboratorios de salud pública, tienen un alto impacto en la epidemiología de diversos agentes infecciosos, puesto que se puede deducir con una mayor confiabilidad diferentes aspectos como son: la población de riesgo de la enfermedad

(sexo o edad), la estacionalidad del agente, % de incidencia, etc., para tener un panorama mucho más amplio de que y como afecta a la población en nuestro país.

La distribución estacional de HAstVs a lo largo del estudio (figura 27) muestra un ligero aumento en los meses de invierno (diciembre-principios de marzo) aunque podemos observar que, en casos esporádicos, HAstVs se encuentra presente a lo largo del año. A nivel mundial, diversos autores como Glass, R. y colaboradores, Maldonado, Y. y colaboradores, Caballero S y colaboradores; entre otros, reportan que la presencia de HAstVs se asocia con los meses de invierno en climas templados, mientras que en climas tropicales, tiene un pico de incidencia en los meses de verano; lo que concuerda con lo identificado en este estudio.

El criterio de selección de la población de muestras se basó de acuerdo a lo reportado en la literatura a nivel mundial que indica que la población de 0 a 3 años de edad era la más afectada (Morsy, W. y col. 2007, Glass, R. y col 1996; Caballero, S. 2004). En la figura 26 muestra que la GA causada por HAstVs abarca a los niños entre 7 meses a 2 años de edad. Dicho comportamiento se atribuye a que durante los primeros años de vida, el sistema inmune de los niños no se encuentra maduro y por lo tanto son más propensos a adquirir cualquier tipo de enfermedad. Posteriormente crean anticuerpos y, aunque no se da la inmunidad heterotípica, es más difícil que adquieran o desarrollen la infección.

En lo que respecta al sexo, no existe una diferencia significativa del grupo al que afecta preferentemente HAstVs (figura 26). Aunque se observa un ligero aumento en la población del sexo femenino, no es motivo suficiente para suponer que existen factores que promuevan la infección de HAstVs en las féminas, ya que en la actualidad, la población en México es en su mayoría del sexo femenino y por lo tanto no es sorpresa de que las mujeres representen ser un grupo mayoritario en diversas enfermedades.

En la figura 24, se observa la circulación de HAstVs las entidades donde fue identificado. Los datos muestran un aumento en el número de casos asociados a la infección por HAstVs en 2 entidades: Tamaulipas y Michoacán. Este suceso se puede atribuir a que en estos estados, las temperaturas durante el invierno son muy

bajas y por lo tanto los niños son más propensos a contraer diversas enfermedades virales, entre ellas, gastroenteritis aguda por HAstVs. A pesar de ello, en las regiones tropicales también se observa la presencia de casos positivos a HAstVs, concordante con lo reportado en la literatura ya que en climas de esta naturaleza, el saneamiento de estos lugares por las lluvias, es difícil y propicia las infecciones gastrointestinales.

En lo que respecta a la construcción del árbol filogenético, se seleccionaron aleatoriamente 12 muestras positivas a HAstVs por RT-PCR, de las cuales 2 muestras se agruparon dentro del serotipo 4, y 4 se agruparon en regiones muy cercanas al serotipo 8. Con los datos anteriores, no podemos dar un dato de seroprevalencia, ya que no se identificaron las 39 muestras positivas y por lo tanto no sería un dato representativo, pero si podemos mencionar que por lo menos el 33% de las muestras que se mandaron a secuenciar pertenecen al HAstVs-8, serotipo circulante en México (Méndez-Toos).

Finalmente se puede apreciar que la técnica de RT-PCR es una herramienta bastante eficiente en el ámbito de la epidemiología de cualquier agente infeccioso, porque permite conocerla de manera mucho más sensible que otros métodos diagnósticos los métodos inmunoenzimáticos donde se tiene que conservar los antígenos de las partículas virales, y con una sensibilidad mucho mayor, puesto que se utilizan iniciadores específicos.

Además se sabe que ésta técnica es de fácil acceso para los diferentes niveles de diagnóstico en el país porque su costo es mucho más bajo que una RT-PCR en tiempo real, microchips o sistemas combinados de RT-PCR con perlas marcadas con fluorescencia; por otro lado, la técnica no requiere de personal altamente especializado, como lo es el caso de la microscopía o la inmunofluorescencia, sino de que siga las buenas prácticas de laboratorio para obtener buenos resultados.

Por otro lado, esta línea de investigación todavía posee grandes retos, entre los que destacan:

- La optimización de la técnica de RT-PCR punto final para la detección de genotipos de HAstVs.
- Detección de co-infecciones de HAstVs con otro virus gastrointestinales, principalmente con Rotavirus y Norovirus.
- Proponer un protocolo para la detección de HAstVs por RT-PCR tiempo real y microarreglos.
- Seguir con la identificación molecular por medio de secuenciación.
- Indagar más sobre la epidemiología molecular a través de los estudios realizados por secuenciación.

Todo ello con el propósito de tener un panorama amplio sobre la epidemiología de éste agente etiológico en nuestro país porque, como se demostró en éste trabajo experimental, cada día va adquiriendo una mayor importancia debido al incremento de casos en la población infantil mexicana.

9. Conclusiones

- Se logró optimizar la técnica de RT-PCR para la detección de HAstVs.
- La técnica de RT-PCR tiene una mayor sensibilidad y especificidad que el ensayo inmunoenzimático, en una proporción 1:1.4.
- Se determinó que la incidencia de HAstVs en la población infantil mexicana es del 26.9%.
- El rango de edad asociado con la infección de HAstVs fue de 7 meses a 2 años.
- HAstVs presenta una mayor incidencia en los meses de invierno y algunos casos esporádicos en el resto del año.
- Los estados de Michoacán y Tamaulipas presentan un mayor número de casos positivos a HAstVs, demostrando que los climas fríos son propicios para el desarrollo de una gastroenteritis ocasionada por HAstVs.
- La técnica de RT-PCR es una herramienta útil, de alta sensibilidad y especificidad y de fácil acceso, en el diagnóstico de HAstVs en cuadros de gastroenteritis aguda en los laboratorios de Salud Pública en México.

10. Bibliografía

- Abad F., Villena C., Guix S., Caballero S, Pintó RM., Bosch A. 2000. Potential Role of Fomites in the Vehicular Transmission of Human Astrovirus. *Appl. Envir. Microbiol.* **67 (9)**: 3904 – 07.
- Appleton H., Higgins PG. 1975. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet.* i:1297
- Bass, D., Qiu S. 2000. Proteolytic processing of the Astrovirus capsid. *J. Virology.* **74**: 1810 – 14.
- Belliot G., Laveran H., Monroe S. 1997. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch. Virol.* **142**: 1323 – 34.
- Brown DW., Gunning K., Henry DM., Awdeh ZL., Brinker JP., Tzipori S., Herrmann JE. 2008. A DNA oligonucleotide Microarray for Detecting Human Astrovirus Serotypes. *J. Virol Methods.* **147(1)**: 86 – 92.
- Caballero S. 2004 Ph. D. thesis. Replicación y Morfogénesis de Astrovirus. Universidad de Barcelona, España
- Chapron C., Ballester N., Fontaine, J., Frades C., Margolin A. 2000. Detection of Astroviruses, Enteroviruses, and Adenovirus types 40 and 41 in Surface Waters Collection Rule and Integrated Cell culture-Nested. *Appl Envir Microbiol.* **66 (6)**: 2520 – 2525.
- Chen SY., Chang YC., Lee YS., Chao HC., Tsao KC, Lin TY., Ko TY., Tsai CN., Chiu CH. 2007. Molecular Epidemiology and Clinical Manifestations of Viral Gastroenteritis in Hospitalized Pediatric Patients in Northern Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* **45 (6)**: 2054 – 2057.
- Cruz, J., Bartlett A., Herrmann, JE., Cáceres P., Blacklow NR., Cano F. 1992. Astrovirus-Associated Diarrhea among Guatemalan Ambulatory Rural Children. *J. Clin. Microbiol.* **30 (5)**: 1140 – 1144.
- Cunliffe NA., Dove W., Bunn JE., Ben Ramadan M., Nyangao JW., Riveron RL. 2001. Expanding global distribution of rotavirus serotype G9: detection in Libya, Kenya, and Cuba. *Emerg Infect Dis.* **7**:890–2


- 📄 Dai, Y., Xu, Q., Wu, X., Hu, G., Tang, Y., Li, J., Chen, Q., Nie, J. 2010. Development of real-time and nested RT-PCR to detect Astrovirus and one-year survey of Astrovirus in Jiangmen City, China. *Arch. Virol.*
- 📄 Eiros, J., Ortiz R., Luquero, FJ., Bachiller MR., Solís P., Castrodeza J. 2007. Etiología viral de las gastroenteritis pediátricas. Análisis de una serie temporal de 20 años. *An Pediatr.* **66**: 92 –93.
- 📄 Eiros J.; Bachiller, M.; Ortiz, R. 2003. Astrovirus en la etiología de las gastroenteritis pediátricas. *An Pediatr.* **58**: 196 – 197.
- 📄 Finkbeiner S., Le B-M., Holtz R., Storch G., Wang D., 2009. Detection of Newly Described Astrovirus MLB1 in Stool Samples from Children. *Emerging Infectious Diseases.* **15 (3)**: 441 – 444.
- 📄 Finkbeiner SR., Allred AF., Tarr PI., Klein EJ., Kirkwood CD., Wang D. 2008. Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery. *PLoS Pathog.* **4**:e1000011. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000011
- 📄 Gabbay, Y., Linhares A., Cavalcante-Pepino E., Nakamura L., Oliveira D., Damascena da Silva L., Mascarenhas J. 2007. Prevalence of Human Astrovirus Genotypes Associated With Acute Gastroenteritis Among Children in Belém, Brazil. *J. Med. Virol.* **79**: 530 – 538.
- 📄 Geigenmuller U., Chew T., Ginzton N., Matsui M. 2002. Processing of nonstructural protein 1a of Human Astrovirus. *J. Virol.* **76**:2003–2008.
- 📄 Glass RI., Noel J., Mitchell, D., Herrmann JE., Blacklow NR., Pickering LK., Dennehy P., Ruiz-Palacios G., De Guerrero ML., Monroe SS. 1996. The Changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch. Virol. Suppl.* **12**: 287–300.
- 📄 Guerrero ML., Noel JS., Mitchell DK., Calva JJ., Morrow AL., Martínez J., Rosales G., Velázquez FR., Monroe SS., Glass RI., Pickering LK., Ruiz-Palacios GM. 1998. A Prospective Study of Astrovirus Diarrhea of Infancy in Mexico City. *Pediatric Infect Dis J.* **17**: 723-727

- Guix, S. 1999 Ph. D. thesis. La proteína nsP1a/4 y el ciclo biológico de Astrovirus: Aplicación en Epidemiología Molecular. Universidad de Barcelona, España.
- Guix S., Bosch A., Pintó RM. 2005. UNDER THE MICROSCOPE. Human Astrovirus diagnosis and typing: current and future prospects. Letters in Applied Microbiology. **41**: 103-105.
- Guix S., Caballero S., Villena C., Latorre C., Rabella N., Simó M., Bosch A., Pintó RM. 2002. Molecular Epidemiology of Astrovirus Infection in Barcelona, Spain. J. Clin Microbiol **40 (1)**: 133 –139.
- Herrmann, J.; Taylor, D.; Echeverría, P.; Blacklow, R. 1991 Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. N. Engl. J. Med. **324**: 1757 – 1760.
- Jiang, B.; Monroe, S.; Koonin, E.; Glass, R. 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. Proc Natl Acad Sci USA. **90**: 10539 – 10543.
- Koopmans MP, Bijen MH, Monroe SS, Vinjé J. 1998. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **5(1)**: 33–7
- Kurtz, J.; Lee, T. (1987) Astroviruses: human and animal. Novel diarrhoea viruses. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium) ed. by G. Bock and J. Whelan. 92 – 107.
- Lee TW., Kurtz JB. 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976–92, with evidence for two new serotypes. Epidemiol. Infect. **112**: 187-193
- Le Cann P., Ranarijaona S., Monpoeho S., Le Guyader F., Ferré V. 2004. Quantification of human Astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. Res. Microbiol. **155 (1)**: 11 – 15.
- Le Guyader F., Le Saux JC., Ambert-Balay K., Krol J., Serais O., Parnaudeau S., Giraundon H., Delmas G., Pommepuy M., Pothier P., Atmar R. 2008. Aichi Virus, Norovirus, Astrovirus, Enterovirus, and Rotavirus Involved in Clinical

- Cases from French Oyster-Related Gastroenteritis Outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **46 (13)**: 4011 – 4017.
- 📄 Liu M-Q., Yang B-F., Peng J-S., Zhou D-J., Tang L., Liu Y., Sun S-H., Ho W-Z. 2007. Molecular Epidemiology of Astrovirus Infection in Infants in Wuhan, China. *J. Clin. Microbiol.* **45 (4)**: 1308 – 1309.
- 📄 Liu J, Kibiki G, Maro V, Maro A, Kumburu H, Swai N, Taniuchi M, Gratz J, Toney D, Kang G, Houpt E. 2011. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis.
- 📄 Maldonado Y., Cantwell M., Old M., Hill D., Sánchez ML., Logan L., Millan – Velasco F., Valdespino JL., Sepulveda J. 1998. Population-Based Prevalence of Symptomatic and asymptomatic Astrovirus Infection in Rural Mayan Infants. *J. Infect. Dis.* **178**: 334 – 339.
- 📄 Manual de pruebas de diagnostico para los animales acuáticos. 2006. Capítulo 1. 1. 3. Validación y Control de Calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. 25 – 32.
- 📄 Méndez E., Salas-Ocampo E., Arias CF. 2004. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J Virol.* **78(16)**:8601-8
- 📄 Méndez-Toss M., Griffin D., Calva J., Contreras JF., Puerto FI., Mota F., Guiscafré H., Cedillo R., Muñoz O., Herrera I., López S., Arias CF. 2004. Prevalence and Genetic Diversity of Human Astroviruses in Mexican Children with Symptomatic and Asymptomatic Infections. *J. Clin. Microbiol.* **42 (1)**: 151–157.
- 📄 Méndez-Toss M., Romero-Guido P., Munguía ME., Mendez E., Arias CF. 2000. Molecular analysis of serotipe 8 human astrovirus genome. *J. Gen. Virol.* **81**: 2891– 2897.
- 📄 Moe CL., Allen JR., Monroe SS., Gary HE., Humphrey Cd., Herrmann JE., Blacklow NR., Carcamo C., Koch M., Kim KH. 1991. Detection of Astrovirus in Pediatric Stool Samples by Immunoassay and RNA Probe. *J. Clin. Microbiol.* **29 (11)**: 2390 – 2395.

- ☞ Monroe SS., Jiang B., Stine SE., Koopmans M., Glass RI. 1993. Subgenomic RNA Sequence of Human Astrovirus Supports Classification of Astroviridae as a New Family of RNA Viruses. *J. Virol.* **67 (6)**: 3611 – 3614.
- ☞ Morsy W., Guix S., Abid I., Pintó RM., Bosch A. 2007. Removal of Astrovirus from Water and Sewage Treatment Plants, Evaluated by Competitive Reverse Transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol* **73 (1)**: 164 – 167.
- ☞ Mustafa H., Palombo EA., Bishop RF. 2000. Epidemiology of Astrovirus Infection in Young Children Hospitalized with Gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a Period of Four Consecutive Years, 1995 to 1998. *J. Clin. Microbiol.* **38 (3)**: 1058 – 1062.
- ☞ Myrmel M., Berg E., Grinde B., Rimstad E. 2006. Enteric viruses in inlet and outlet samples from sewage treatment plants. *J. Water & Health.* **04(2)**: 197–209.
- ☞ Noel JS., Lee TW., Kurtz JB., Glass RI., Monroe SS. 1995. Typing of human Astroviruses from Clinical Isolates by Enzyme Immunoassay and Nucleotide Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **33 (4)**: 797 – 801.
- ☞ Oishi I., Yamazaki K., Kimoto T., Minekawa Y., Utagawa E., Yamazaki S., Inouye S., Grohmann GS., Monroe SS., Stine SE., Carcamo C., Ando T., Glass RI. 1994. A large Outbreak of Acute Gastroenteritis Associated with Astrovirus among Students and Teachers in Osaka, Japan. *J. Infect. Dis.* **170**: 439 – 443.
- ☞ OMS. 2004. Formulario Modelo de la OMS 2004 <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js5422s/30.html>.
- ☞ Papaventsis DC., Dove W., Cunliffe, NA., Nakagomi O., Combe P., Grosjean P., Hart A. 2008. Human Astrovirus Gastroenteritis in children, Madagascar, 2004-2005. *Emerg. Infect. Dis.* **14(5)**: 844 – 846.
- ☞ Reis H., Munford V., Galera J., Schimich H., Ramos TA., Rácz ML. 2007. Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in Sao Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* **102 (8)**: 969 – 974.

- 📄 Rodriguez N., O'Brien R., Qiu S., Bass D. 2002. Astrovirus, Adenovirus, and Rotavirus in Hospitalized Children: Prevalence and Association With Gastroenteritis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **36**: 64 – 68.
- 📄 Rohayem J., Berger S., Juretzek T., Herchenröder O., Mogel M., Poppe M., Henker J., Rethwilm A. 2004. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. *J. Virol. Methods.* **115 (1)** 49 – 59.
- 📄 Shigemoto N, Fukuda S, Tanizawa Y, Kuwayama M, Ohara S, Seno M. 2011. Detection of norovirus, sapovirus, and human astrovirus in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *J. Clin Virol.* **50(4)**:308-13
- 📄 Traoré O, Belliot G, Mollat C, Piloquet H, Chamoux C, Laveran H, Monroe SS, Billaudel S. 2000. RT-PCR identification and typing of astroviruses and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections. *J Clin Virol.* **17(3)**:151-8.
- 📄 Trayner J. 1998 The epidemiology of Astroviruses. *Human Biology* 115B. The Vaccine Revolution.
- 📄 Utagawa ET., Nishizawa S., Sekine S., Hayashi Y., Ishihara Y., Oishi I., Iwasaki A., Yamashita I., Miyamura K., Yamazaki S. 1994. Astrovirus as a Cause of Gastroenteritis in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **32 (8)**: 1841 – 1845.
- 📄 Walter JE., Mitchell DKL., Guerrero ML., Berke T., Matson DO., Monroe SS., Pickering LK., Ruiz-Palacios G. 2001. Molecular Epidemiology of Human Astrovirus Diarrhea among Children from Periurban Community of Mexico City. *J. Infect. Dis.* **183**: 681 – 686.
- 📄 Wang QH., Kakizawa J., Wen LY., Shimizu M., Nishio O., Fang ZY, Ushijima H. 2001. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. DOI: 10.1002/jmv.1043
- 📄 Wilhelm I., Roman E., Sánchez-Fauquier A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.* **9**: 247 – 262.

-  Willcocks MM., Carter JM., Laidler FR., Madeley CR. 1990. Growth and characterization of human fecal astrovirus in a continuous cell line. Arch Virol. **113**: 73 – 81.